

Aus der Abteilung für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Prof. Dr. Dr. Lukas Prantl  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Differenzierung von Fettstammzellen zu Gliazellen/Schwannschen Zellen und deren Einfluss  
auf das Neuritenwachstum

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Nicolas Hammer

2025



Aus der Abteilung für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Prof. Dr. Dr. Lukas Prantl  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Differenzierung von Fettstammzellen zu Gliazellen/Schwannschen Zellen und deren Einfluss  
auf das Neuritenwachstum

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Nicolas Hammer

2025

|                             |                            |
|-----------------------------|----------------------------|
| Dekan:                      | Prof. Dr. Dirk Hellwig     |
| 1. Berichterstatter:        | Prof. Dr. Dr. Lukas Prantl |
| 2. Berichterstatter:        | Prof. Dr. Dr. Tobias Ettl  |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 04.02.2026                 |

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                    |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1. Einleitung .....                                                                                                | - 1 -  |
| 1.1 Problematik durchtrennter Nervenstrukturen in der Plastischen-, Hand- und<br>Wiederherstellungschirurgie ..... | - 1 -  |
| 1.2 Anatomie und Physiologie des peripheren Nerven .....                                                           | - 1 -  |
| 1.3 Derzeit etablierte Behandlungsmethoden bei durchtrennten Nervenstrukturen.....                                 | - 6 -  |
| 1.4 Rolle von Schwann-Zellen bei peripheren Nervenläsionen .....                                                   | - 12 - |
| 1.5 Rolle von Neurotrophen und neurotrophen Faktoren bei der Nervenregeneration<br>.....                           | - 15 - |
| 1.6 Stammzellbasierte Nervenregeneration .....                                                                     | - 16 - |
| 2. Zielsetzung .....                                                                                               | - 19 - |
| 3. Material und Methoden.....                                                                                      | - 20 - |
| 3.1 Isolierung und Kultivierung der adipogenen Stammzellen .....                                                   | - 20 - |
| 3.2 Differenzierung von adipogenen Stammzellen zu Schwann-like-cells .....                                         | - 21 - |
| 3.2.1 Differenzierungsprotokoll 1 .....                                                                            | - 22 - |
| 3.2.2 Differenzierungsprotokoll 2 .....                                                                            | - 22 - |
| 3.2.3 Differenzierungsprotokoll 3 .....                                                                            | - 23 - |
| 3.3 RNA-Isolierung .....                                                                                           | - 24 - |
| 3.4 Reverse Transkription .....                                                                                    | - 25 - |
| 3.5 Q-PCR .....                                                                                                    | - 26 - |
| 3.6 Proteinisolierung.....                                                                                         | - 27 - |
| 3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration .....                                                                      | - 28 - |
| 3.8 Western Blot.....                                                                                              | - 28 - |
| 3.9 ELISA.....                                                                                                     | - 30 - |
| 3.10 Scratch Assay .....                                                                                           | - 31 - |
| 4. Ergebnisse .....                                                                                                | - 34 - |

|     |                                                                                                                         |        |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 4.1 | Morphologische Veränderungen nach Differenzierung der adipogenen Stammzellen .....                                      | - 34 - |
| 4.2 | Q-PCR nach Differenzierung der adipogenen Stammzellen .....                                                             | - 36 - |
| 4.3 | Western Blot.....                                                                                                       | - 41 - |
| 4.4 | ELISA.....                                                                                                              | - 42 - |
| 4.5 | Scratch Assay .....                                                                                                     | - 44 - |
| 5.  | Diskussion .....                                                                                                        | - 45 - |
| 5.1 | Adipogene Stammzellen lassen sich zu verschiedenen Schwannzell-Phänotypen differenzieren .....                          | - 45 - |
| 5.2 | Die nach Protokoll 1 differenzierten Schwann-like-cells ähneln adulten Gliazellen .....                                 | - 46 - |
| 5.3 | Die nach Protokoll 2 differenzierten Schwann-like-cells ähneln myelinisierenden Schwannzellen .....                     | - 47 - |
| 5.4 | Die nach Protokoll 3 differenzierten Schwann-like-cells ähneln aktivierten, nicht myelinisierenden Schwannzellen .....  | - 49 - |
| 5.5 | Die Wachstumsfaktoren im konditionierten Medium haben einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Schwannzellen ..... | - 52 - |
| 6.  | Schlussfolgerung .....                                                                                                  | - 56 - |
| 7.  | Abkürzungsverzeichnis .....                                                                                             | - 57 - |
| 8.  | Literaturverzeichnis .....                                                                                              | - 59 - |
| 9.  | Abbildungsverzeichnis.....                                                                                              | - 72 - |
| 10. | Tabellenverzeichnis .....                                                                                               | - 75 - |
|     | Danksagung.....                                                                                                         | - 76 - |
|     | Lebenslauf .....                                                                                                        | - 77 - |

# **1. Einleitung**

## **1.1 Problematik durchtrennter Nervenstrukturen in der Plastischen-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie**

Ein bislang nur unzureichend gelöstes Problem in der Plastischen, Hand- und Wiederherstellungschirurgie besteht in der adäquaten Wiederherstellung von Nervenstrukturen. Während sich bei der Behandlung von Weichteilstrukturen und Knochen durch verbesserte Operationstechniken und progressive Entwicklungen bei den Osteosyntheseverfahren zunehmend gute Ergebnisse erzielen lassen, führen Verletzungen von Nervenstrukturen, insbesondere nach Durchtrennung oder Entfernung von Nervenaxonen mit resultierenden Kontinuitätsdefekten, häufig zu unbefriedigenden Heilungsergebnissen mit irreversiblen Funktionsausfällen an den Erfolgsorganen, welche mit Einschränkungen der Motorik und Sensibilität sowie chronisch-neuropathischen Schmerzen verbunden sind (1–3). In der Folge bestehen bei betroffenen Patienten oft beträchtliche Schwierigkeiten bei der selbstständigen Versorgung im Alltag, der Ausübung von Freizeitaktivitäten sowie der beruflichen Tätigkeit (2). Dies resultiert nachweislich in einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität einhergehend mit dauerhaften psychosozialen Folgen wie Stress, Schlafstörungen, Problemen bei persönlichen Beziehungen bis hin zur Depression (2,4). Von einem gesellschaftlichen Standpunkt betrachtet führen unzureichende Langzeitergebnisse nach peripheren Nervenverletzungen in vielen Fällen zu dauerhafter körperlicher Behinderung, Berufsunfähigkeit bzw. einer schlechten beruflichen Wiedereingliederung sowie steigenden Kosten des Gesundheitssystems (5,6).

## **1.2 Anatomie und Physiologie des peripheren Nerven**

Die kleinste funktionelle Einheit des peripheren Nervensystems ist das Neuron (7). Es besteht aus einem Zelleib (Perikaryon), der im Rückenmark lokalisiert ist und von dem aus zwei grundlegend verschiedene Arten von zytoplasmatischen Ausläufern als Fortsätze ausgehen: Die Dendriten stellen das Rezeptorsegment des Neurons dar, da an ihnen die Synapsen anderer Neurone enden, und besitzen keine Myelinscheide (7). Ein Neuron besitzt häufig mehrere Dendriten mit teils sehr komplexen Verzweigungen zur Oberflächenvergrößerung (7). Im Gegensatz dazu geht von jedem Neuron nur ein Axon aus, welches das „projizierende Segment“ dessen darstellt und mit dem Zielorgan in Verbindung tritt (7).

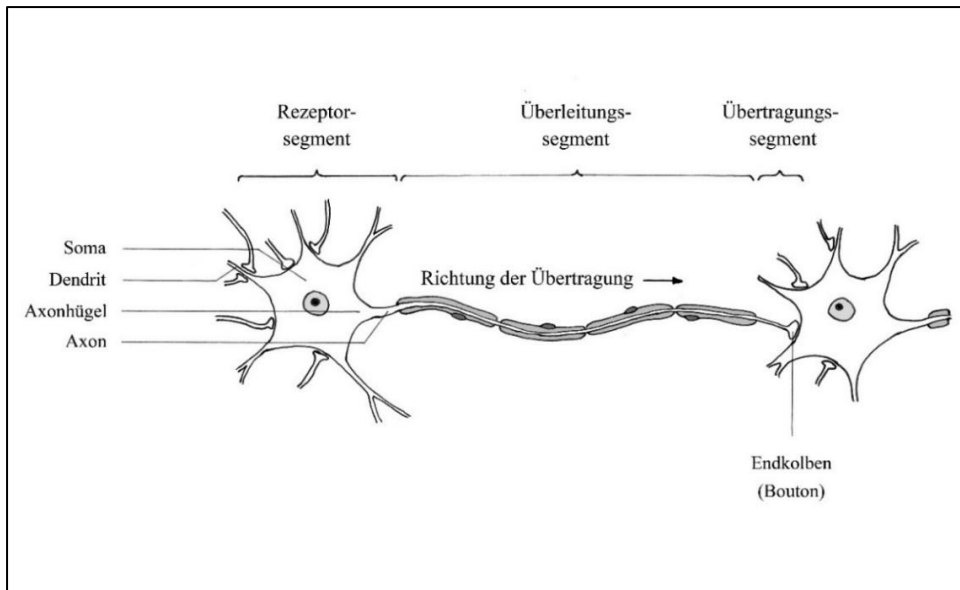


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Nervenzelle; eigene Darstellung in Anlehnung an (7)

Im peripheren Nervensystem sind Axone, die für schnelle Reaktionen benötigt werden (z.B. zur Kontraktion von Skelettmuskelzellen), von myelinisierenden Schwannzellen umgeben (8,9). Die Myelinscheide setzt sich aus zahlreichen, spiralförmig eng um das Axon gewundenen Lagen der Schwannzellmembran zusammen und umhüllt das Axon in internodalen Segmenten, welche in regelmäßigen Abständen vom myelinarmen Bereichen, die als Ranvier-Schnürring bezeichnet werden, unterbrochen werden (8,9).

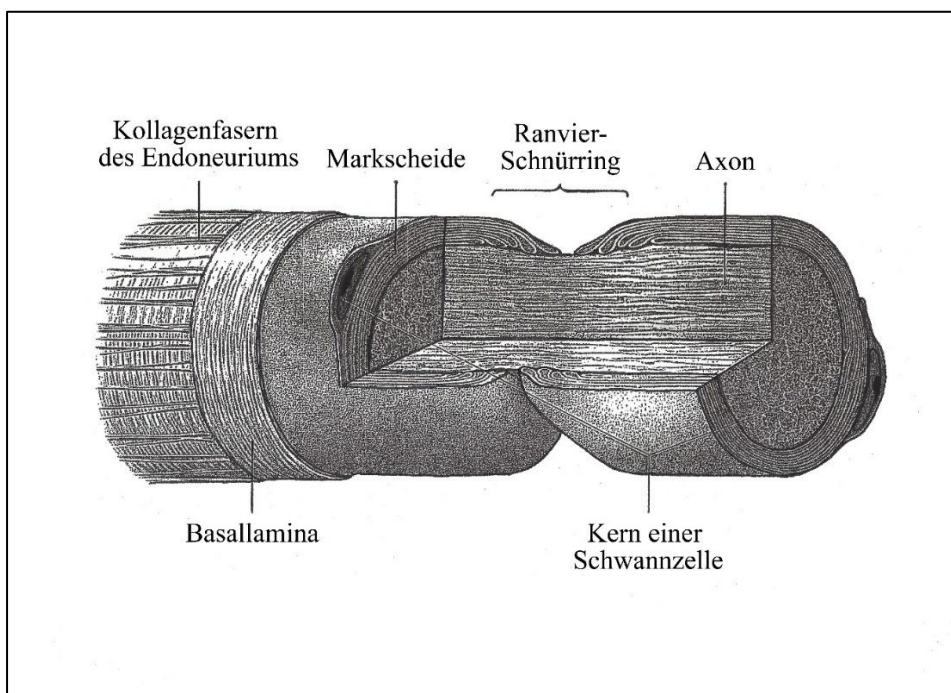
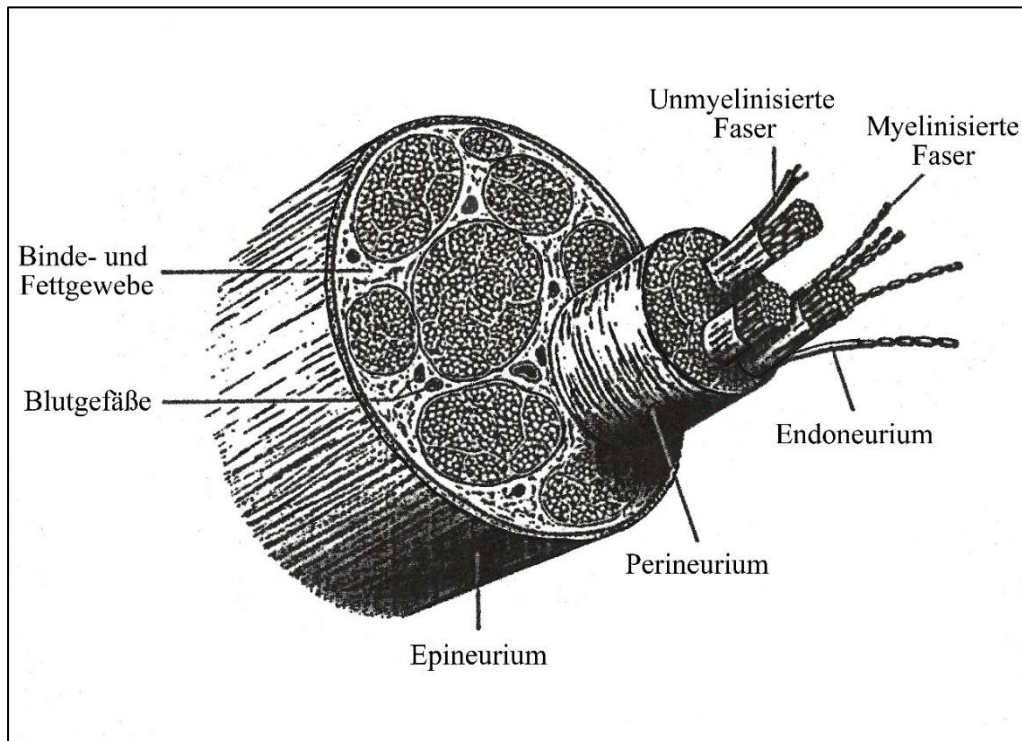


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines myelinisierten Axons im peripheren Nervensystem; eigene Darstellung in Anlehnung an (7)

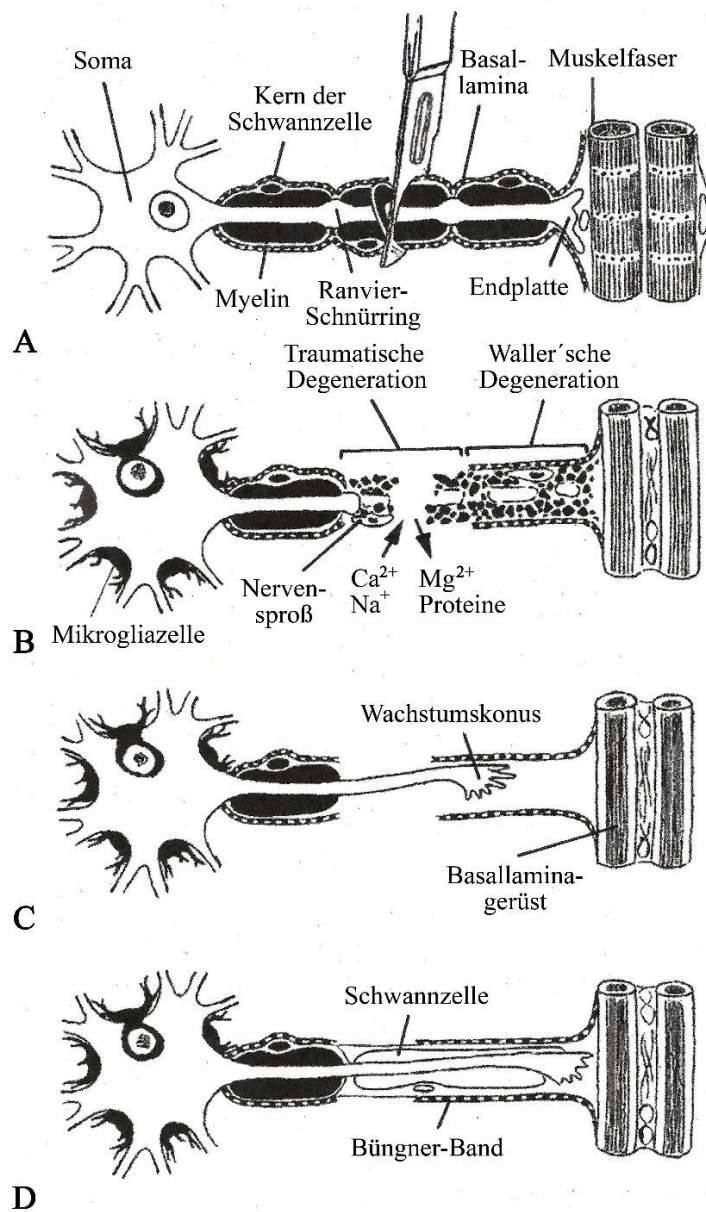
Die Aufgaben der Myelinscheide bestehen vor allem in der Ernährung und dem Schutz des Axons sowie der bioelektrischen Isolation und der Beschleunigung der Erregungsleitung (9). Periphere Nerven bestehen aus Bündeln von Axonen und der diese umgebenden Myelinscheide, welche mittels verschiedener Bindegewebsschichten zu Gruppen organisiert werden (7). Individuelle Axone sind vom Endoneurium umhüllt und werden durch das Perineurium zu motorischen und sensorischen Bündeln zusammengefasst, welche als Faszikel bezeichnet werden (7). Diese bilden insbesondere distal in peripheren Nerven spezielle Muster aus, wobei es bei der Nervenreparatur für eine optimale Nervenregeneration besonders wichtig ist, dass die entsprechend Faszikel miteinander übereinstimmen (10). Die Faszikel sind schließlich vom Epineurium umhüllt, welches den Nerv anatomisch definiert und Bindegewebssepten zwischen die Nervenfaserbündel entsendet (7). Das Epineurium wird vom Mesoneurium umgeben, welches ein feines Kapillargeflecht enthält und für die Blutversorgung des Nervens zuständig ist (7). Diese fragile Gewebsschicht wird häufig durch Trauma oder Spannung bei der Nervenrekonstruktion geschädigt, weshalb sich bei einer Versorgung mittels Nerveninterponat häufig ein besseres Ergebnis erzielen lässt als bei einer Neuroraphie unter Spannung (11).



*Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anatomie eines peripheren Nerven im Querschnitt; eigene Darstellung in Anlehnung an (7)*

Im Inneren eines Neurons herrscht wie bei allen Zellen eine genau regulierte Homöostase verschiedener Elektrolyte (10). Mittels ante- und retrogradem axoplasmatischen Transport werden Neurotransmitter und strukturelle Elemente der Zelle zwischen dem Perikaryon und der Axonspitze transportiert (10). Kommt es zur Unterbrechung der axonalen oder neuronalen Doppellipidmembran, resultiert diese, falls nicht umgehend wiederhergestellt, zu einer irreversiblen Kaskade des programmierten Zelltods (12). Bei proximalen Verletzungen des Axons breitet sich die axonale Degeneration, ähnlich wie bei Verletzungen von Haut und Muskelgewebe, von der Defektzone nach proximal und distal aus und führt schließlich binnen 24-48 Stunden zum Untergang des gesamten Neurons (13,14). Bei distalen Axonverletzungen ist das Auftreten einer anterograden Degeneration des Axons im Rahmen der Wallerschen Degeneration ebenfalls obligat, da das distale Axonsegment aufgrund des fehlenden direkten Kontakts zum Perikaryon nicht mehr versorgt werden kann. Es kommt jedoch nur zum Untergang des proximalen Axonsegments bis zum nächstgelegenen Ranvier-Schnürring, von welchem aus eine konsekutive Regeneration des distalen Axons möglich ist (15). In der Folge kommt es zur Phagozytose der axonalen und myelinischen Residuen, bis schließlich lediglich ein leeres Endoneuralrohr verbleibt (16). Von Schwannzellen und Makrophagen sezernierte Wachstumsfaktoren stimulieren die Proliferation von Schwann-Zellen und Fibroblasten (17). Das leere Endoneuralrohr wird von Schwann-Zellen in organisierten longitudinalen Säulen, die als Büngner-Bänder bezeichnet werden, ausgefüllt, welche ein unterstützendes Milieu schaffen, das für eine erfolgreiche axonale Regeneration entscheidend ist (18). Vom distalsten Ranvier-Schnürring aus entwickeln sich zwischen 50 und 100 nodale Aussprossungen, welche sich zu einem Konus vereinigen und schließlich in Antwort auf unmittelbare Signale aus dem umgebenden Gewebe sowie der denervierten motorischen und sensorischen Rezeptoren selektiv Richtung distaler Nervenstumpf verlängern (18). Schließlich sprießen zahlreiche axonale Ausläufer aus dem Wachstumskonus aus, die sich mit einem Rezeptor verbinden (18). Lässt sich kein Rezeptor oder Endoneuralrohr erreichen, kommt es durch ein fortgesetztes, zunehmend ungeordnetes Wachstum der Ausläufer zur Ausbildung eines Neurinoms, welches sich klinisch als schmerzhafter Knoten manifestieren kann (11). Dabei lässt sich nachweisen, dass die axonale Regeneration mit zunehmender Schwere der Nervenverletzungen vermehrt ungeordnet verläuft, was letztlich darin resultiert, dass weniger Axone ihr distal gelegenes motorisches und sensorisches Ziel erreichen (19). In der Folge schrumpft die kortikale Repräsentation dieser Region in der ipsilateralen Hemisphäre, woraufhin sich benachbarte Regionen in der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre kompensatorisch vergrößern

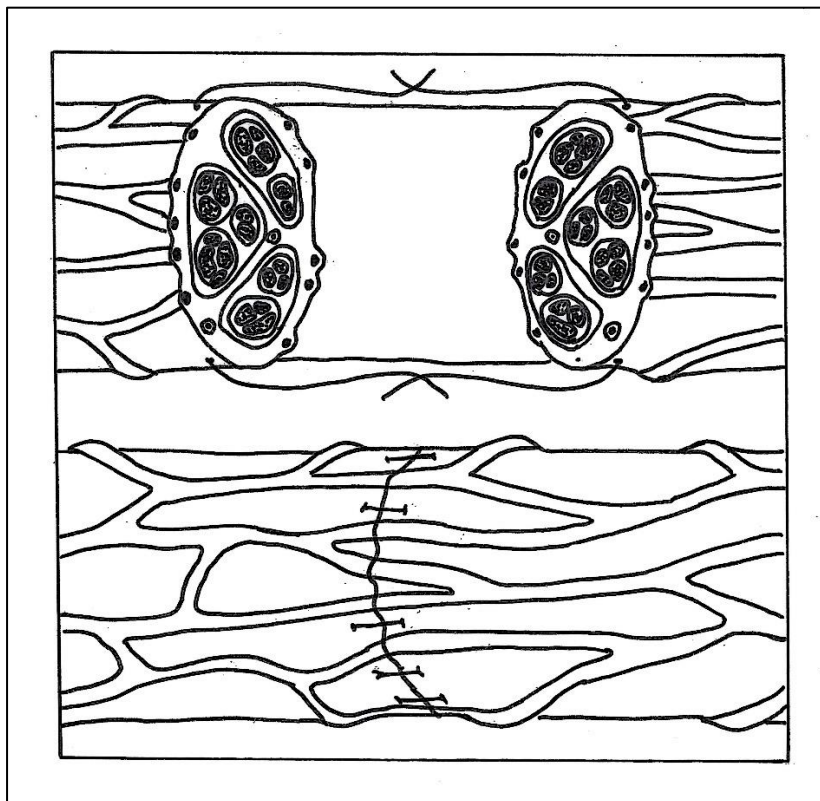
(20). Dabei kann es durch Missinterpretation von Stimuli zwischen verletztem und intaktem Gewebe zu Phantomempfindungen und neuropathischen Schmerzen kommen (21).



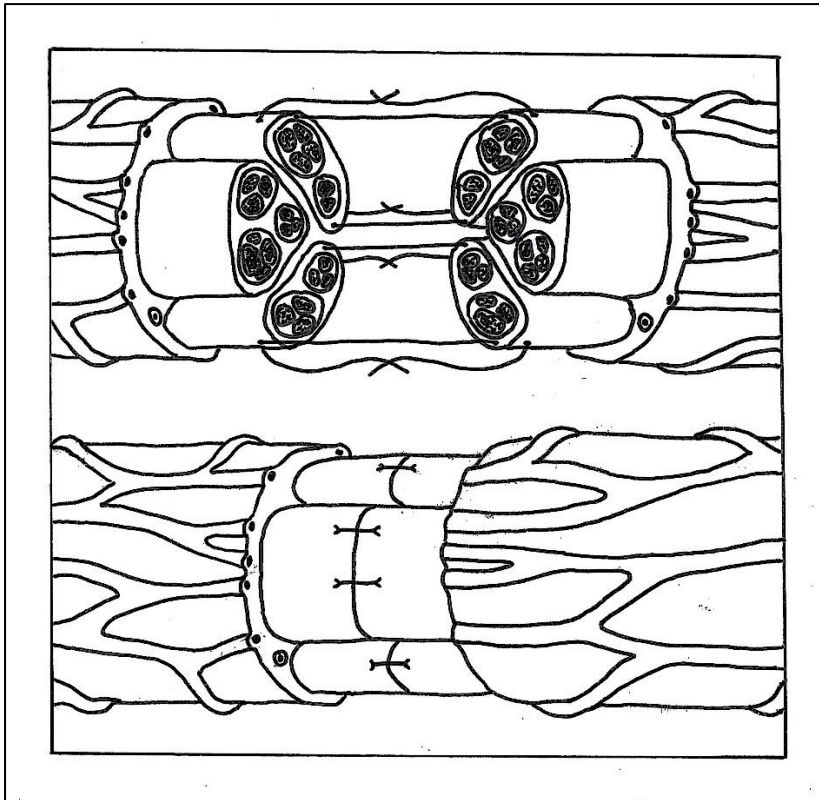
**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Degeneration und Regeneration nach peripheren Nervenverletzungen: A: Durchtrennung des Axons, B: Traumatische Degeneration am Ort der Verletzung und Waller'sche Degeneration nach distal, C: Regeneration des Wachstumskonus entlang des Basallamina-Gerüsts, D: Einwandern der Schwannzellen mit Ausbildung der Büngner-Bänder; eigene Darstellung in Anlehnung an (22)

### 1.3 Derzeit etablierte Behandlungsmethoden bei durchtrennten Nervenstrukturen

In Abhängigkeit vom Verletzungsmuster haben sich folgende Therapieoptionen zur Rekonstruktion durchtrennter Nervenstrukturen etabliert: Als derzeitiger Goldstandard wird die unmittelbare Koaptation der Nervenstümpfe mittels mikrochirurgischer, epineuraler End-zu-End-Naht angesehen, welche auch als Neuroraphie bezeichnet wird (10). Diese Methode kann jedoch nur durchgeführt werden, wenn eine traktionsfreie Nervennaht bei guter Vaskularisation erreicht werden kann (10). Dabei wird auf eine grobe Übereinstimmung der intraneuralen Faszikel sowie der oberflächlichen epineuralen Blutgefäße zwischen dem proximalen und distalen Nervenstumpf geachtet (23,24). Insbesondere bei größeren peripheren Extremitätennerven besteht alternativ auch die Möglichkeit nach intraneuraler Dissektion die einzelnen, zusammengehörigen Faszikelgruppen zu koaptieren, wobei die theoretischen Vorteile einer besseren fazikulären Übereinstimmung bei dieser Methode häufig durch das zusätzliche Trauma sowie die durch das Vorhandensein permanenter Nähte bedingte Narbenbildung am heilenden Nerven wieder aufgehoben werden (25).



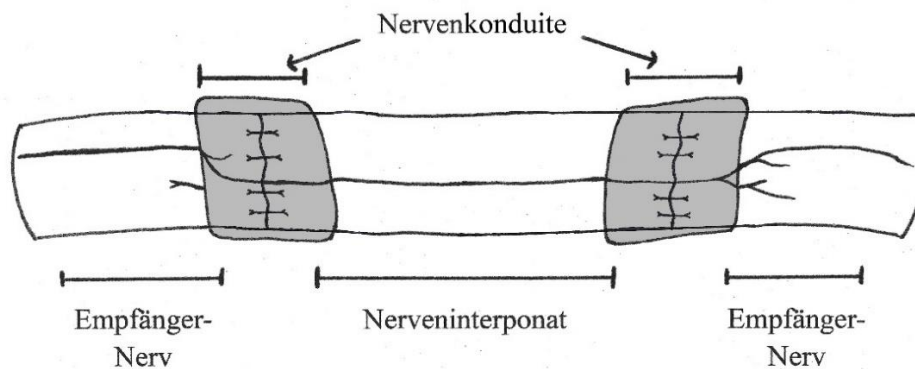
*Abbildung 5: Schematische Darstellung der Koaptation der Nervenstümpfe eines peripheren Nerven mittels epineuraler Neuroraphie; eigene Darstellung in Anlehnung an (26)*



*Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rekonstruktion eines peripheren Nerven mittels Neuroraphie mit Koaptation der Faszikelgruppen; eigene Darstellung in Anlehnung an (26)*

Ist eine spannungsfreie Koaptation nicht zu bewerkstelligen, kann der Defekt durch die Interposition eines autologen Spendernervensegments (sog. Nerveninterponat) verschlossen werden (17,27). Die Spendernervensegmente werden von entbehrlichen sensorischen Nerven wie z.B. dem N. cutaneus antebrachii medialis, dem N. saphenus und dem N. suralis mit einer Länge von bis zu 40 cm und einem Durchmesser von bis zu 2 – 3 mm entnommen und in umgekehrter Richtung transplantiert, um die Anzahl der erfolgreich regenerierenden Axone durch das trichterförmige Zulaufen nach distal zu maximieren und dem Verlust durch Abzweigung in Seitenäste vorzubeugen (10,28,29). Spendernerven mit ähnlichem Durchmesser wie der geschädigte Nerv können unmittelbar einzeln transplantiert werden (30). Um den Defekt eines Nerven mit größerem Durchmesser zu überbrücken, können auch mehrere Spendernervensegmente, die zusammen dem Umfang des geschädigten Nerven entsprechen, transplantiert werden (30). Des Weiteren besteht die Möglichkeit nach intraneuraler Dissektion sowohl des Spendernerven als auch des geschädigten Nerven die einzelnen Nervenstränge entsprechend der zusammengehörigen Faszikelgruppen in Analogie zum bereits bei der Neuroraphie beschriebenen Procedere zu koaptieren (30). Durch simultane Transplantation der arteriellen und venösen Blutversorgung des Nerveninterponats kann zudem die initiale

Ischämiephase vermieden und eine kontinuierliche Nährstoffversorgung des Transplantats gewährleistet werden (31). Dies führt in der Folge zu einer geringeren intraneuralen Fibrosierung sowie zu einer verbesserten axonalen Regeneration (31). Das entnommene autologe Spendernervensegment durchläuft daraufhin die Wallersche Degeneration und bietet somit eine ideale mechanische Leitschiene für das einwachsende Axon, da es ein permissives und stimulierendes Gerüst einschließlich Schwannzell-Basalmembran, neurotrophen Faktoren und Adhäsionsmolekülen bietet (11).



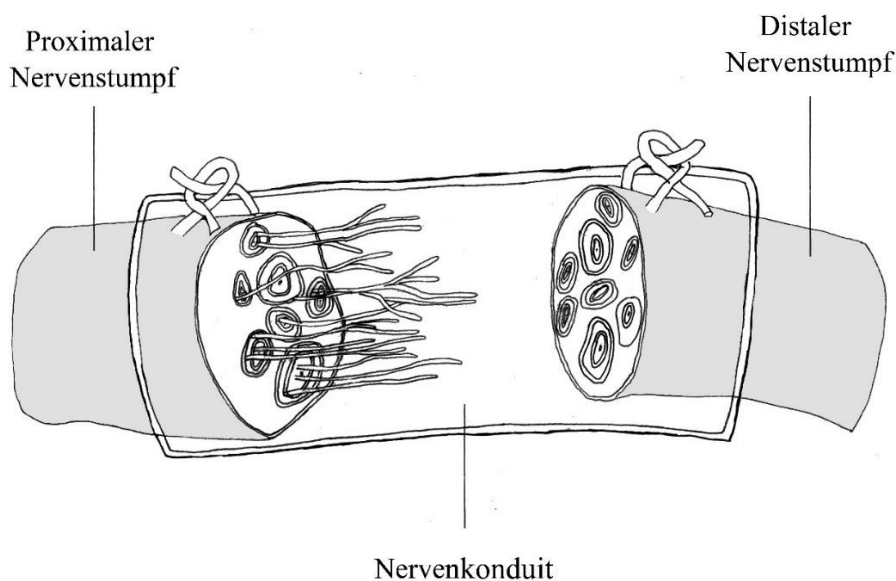
*Abbildung 7: Schematische Darstellung der Konduit-assistierten Rekonstruktion eines peripheren Nerven mittels autologem Nerveninterponat; eigene Darstellung in Anlehnung an (32)*

Jedoch ist diese Methode auch mit mehreren Nachteilen vergesellschaftet: Bei autologen Nerveninterponaten wird an der Entnahmestelle ein funktionstüchtiger, in der Regel sensorischer Nerv für einen bedeutenderen, verletzten, zumeist motorischen Nerven geopfert (33). Dies geht an der Entnahmestelle mit sensorischen Ausfällen sowie Narbenbildung mit potentieller Neurinombildung einher (33). Zudem kommt es im Bereich der Koaptationsstelle zu einer unvermeidlichen Inkongruenz bezüglich des Nervendurchmessers und der Faszikelanordnung sowie zur Fibrosebildung durch die Nähte, die intraoperative Gewebsmanipulation und die Verletzung selbst. Somit führt jede Koaptation zum Verlust von etwa 50 % der sich regenerierenden Axone (10). Dementsprechend können sich bei der Neuroraphie etwa 50 % der ursprünglichen Axone erfolgreich regenerieren (10). Bei Nerveninterponaten mit zwei Koaptationsstellen kommt es lediglich zur Regeneration von etwa

25 % der Axone, wobei in Abhängigkeit von der Distanz zum motorischen und sensorischen Ziel zusätzliche Axone verloren gehen können (10). Durch autologe Nerveninterponate lassen sich im Vergleich zu allogenen Nerventransplantaten und den im Folgenden beschriebenen Nervenkonduiten insbesondere bei größeren Kontinuitätsdefekten ( $> 3$  cm), proximalen Verletzungen und kritischen Nerven bessere klinische Langzeitergebnisse erzielen (17). Jedoch ist dieses Vorgehen limitiert durch die begrenzte Verfügbarkeit von Spendernervengewebe mit geeignetem Durchmesser und die mit der Entnahme verbundenen funktionellen Defiziten für den Patienten (34). Bei einer kleineren Patientengruppe mit ausgedehnten Nervenverletzungen und unzureichendem autologen Spendernervengewebe werden auch humane, allogene Nerventransplantate von Todspendern eingesetzt (33). Da die Schwannzellen des Spenders jedoch Major histocompatibility complexes (MHCs) aufweisen und eine T-Zell-Antwort hervorrufen, müssen Empfänger für bis zu zwei Jahre nach der Transplantation, solange bis das Transplantat mit den Schwannzellen des Empfängers neu besiedelt wurde, immunsupprimiert werden (15). Deshalb sollten allogene Nerventransplantate lediglich in Einzelfällen bei Patienten mit anderweitig irreparablen Nervenverletzungen, die unbehandelt zum Funktionsverlust einer Extremität führen wurden, eingesetzt werden (33). Ebenfalls wurden Therapieversuche mit allogenen Nerventransplantaten, welche mittels chemischer Detergenzien, enzymatischer Degradation, thermischer Behandlung oder Bestrahlung dezellularisiert wurden, unternommen ohne Notwendigkeit einer immunsuppressiven Therapie (35–38). Der Vorteil solcher klinisch verfügbaren Nerveninterponate (AxoGen) gegenüber hohlen Nervenkonduiten besteht darin, dass die internen neuronalen Strukturen einschließlich Endoneuralrohre, Basallamina und Laminin erhalten bleiben und somit eine bessere axonale Regeneration möglich ist (38). Letztlich beschränkt sich der Nutzen derartiger Interponate aktuell jedoch lediglich auf die Reparatur kleinerer sensorischer Nervendefekte mit einer Defektstrecke von  $< 3$  cm (38).

Nervenkonduite sind tubuläre Leitstrukturen für aussprossende Axone, welche mittels Naht zwischen proximalem und distalem Nervenstumpf implantiert werden können (30). Sie lassen sich in drei Kategorien einteilen: Autogen biologisch, nicht-autogen biologisch und nicht-biologisch (30). Autogen-biologische Konduite schließen venöse, arterielle und aus Muskel- und Sehngewebe gefertigte Interponate ein, wobei klinisch vor allem Venenkonduite, insbesondere bei kleineren, funktionell weniger bedeutsamen Nervendefekten mit einer Defektstrecke von  $< 3$  cm, eingesetzt werden und in ihren funktionellen Ergebnissen mit autologen Spendernerveninterponaten vergleichbar sind (39–41). Nicht-autologe biologische Konduite werden aus Kollagen Typ I, III oder IV hergestellt und haben im Tierversuch

ebenfalls mit autologen Transplantaten vergleichbare Ergebnisse geliefert (15). Der Einsatz synthetischer Materialien erweist sich für die Forschung als besonders attraktiv, da deren chemischen und physikalischen Eigenschaften wie z.B. mechanische Festigkeit, Porosität und biologische Abbaubarkeit für den Anwendungszweck speziell angepasst werden können, jedoch unterscheidet sich die Biokompatibilität der einzelnen Materialien insbesondere im Hinblick auf die Provokation einer inflammatorischen Reaktion teils erheblich (42). Um für die Herstellung eines nicht-biologischen Nervenkonduits geeignet zu sein, muss ein synthetisches Material mehrere grundlegende Anforderungen erfüllen: Das Material muss sterilisierbar, reißfest, einfach handzuhaben und zu nähen sein und sich gut in ein Konduit mit den gewünschten Dimensionen formen lassen (42,43). Nicht-resorbierbare Konduite der ersten Generation aus Silikon und Gore-Tex sind mit unerwünschten Nebeneffekten wie einem erhöhten Infektionsrisiko, axonaler Kompression während der Regeneration sowie fibrosierenden Fremdkörperreaktionen einhergegangen und werden im klinischen Alltag in der Regel nicht mehr verwendet (44–46). Die modernen, resorbierbaren nicht-biologischen Konduite der zweiten Generation bestehen aus Polyglykolsäure (PGA), Polylactidsäure (PLA) oder Polylactid-co-glykolsäure (PLGA) (44,47,48). Fortgeschrittene Verarbeitungstechniken erlauben es zudem die synthetisch hergestellten Konduite mit dreidimensionalen Kanälen, Fasern oder speziellen Oberflächenstrukturen auszustatten und so eine bessere Imitation der physiologischen Nervenarchitektur zu ermöglichen (42).



**Abbildung 8:** Schematisch Darstellung der Rekonstruktion eines Nervendefekts mittels Nervenkonduit; eigene Darstellung in Anlehnung an (42)

In klinischen Studien lassen sich bei der Verwendung von PGA-Nervenkonduiten bezüglich der Reparatur kurzer und moderater digitaler Nervendefekte vergleichbare Ergebnisse wie bei der Koaptation mittels Neuroraphie oder autologen Nerventransplantaten nachweisen (15). Auch bei optimaler Nervenrekonstruktion vollzieht sich die axonale Regeneration nur langsam mit einer Geschwindigkeit von 1 – 2 mm pro Tag (17). Um eine funktionelle Erholung des Nerven zu erreichen, sollte sich die motorische Reinnervation innerhalb von 12 – 18 Monaten nach der Verletzung vollziehen, da sonst eine irreversible Degeneration der motorischen Endplatte eintritt (18). Der Zeitrahmen für die sensorische Reinnervation ist erheblich länger, wobei eine frühere Nervenrekonstruktion jedoch zu einem besseren klinischen Ergebnis für den betroffenen Patienten führt (18). Sensorische Rezeptoren können noch Jahre nach der Verletzung innerviert werden (18). Eine Kombination aus langsamer axonaler Regeneration, strukturellen Veränderungen des muskulären Zielorgans und einer zunehmend weniger supportiven stromalen Umgebung tragen zur unvollständigen Wiederherstellung der Nervenfunktion bei (10). Bei Verletzungen des N. medianus und ulnaris auf Höhe des Handgelenks beispielsweise müssen sich Axone über eine Strecke von ungefähr 100 mm regenerieren, um zahlreiche Handmuskeln zu erreichen, wobei die Regeneration bei einer durchschnittlichen Rate von 1 mm pro Tag mindestens 100 Tage in Anspruch nimmt (10). Bei proximaleren Nervenverletzung wie z.B. des Plexus brachialis müssen die Axone eine Strecke von bis zu einem Meter zurücklegen um die Handmuskulatur zu erreichen und benötigen dabei einen Zeitraum von mehr als 2 – 3 Jahren (10). In solchen Fällen besteht klinisch lediglich eine sehr kleine oder überhaupt keine Chance auf eine Wiederherstellung der Nervenfunktion, da Muskelfibrose und -atrophie unmittelbar nach der Denervation einsetzen und bereits nach vier Monaten 60 - 80 % des Muskelvolumens verloren gegangen sind (18). Insgesamt zeigen die etablierten Rekonstruktionsverfahren insbesondere im Hinblick auf schwerere Nervenverletzungen häufig nur unbefriedigenden Heilungsergebnisse, da trotz innovativer mikrochirurgischer Operationstechniken unüberwindliche neurobiologische Hindernisse als limitierender Faktor bleiben (25). Deshalb hat sich der Fokus der Forschung im Bereich der Regeneration peripherer Nerven zunehmend auf die stammzellbasierte Nervenregeneration verlagert.

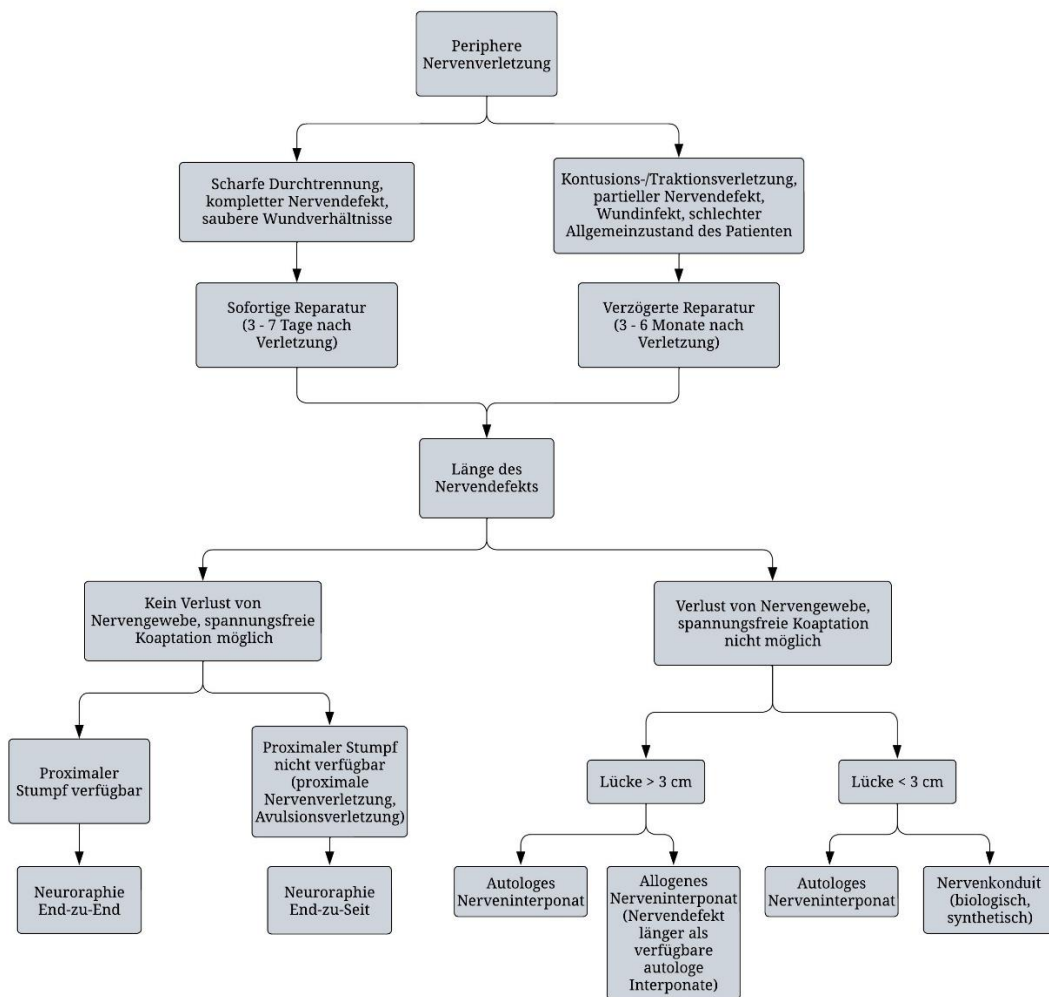
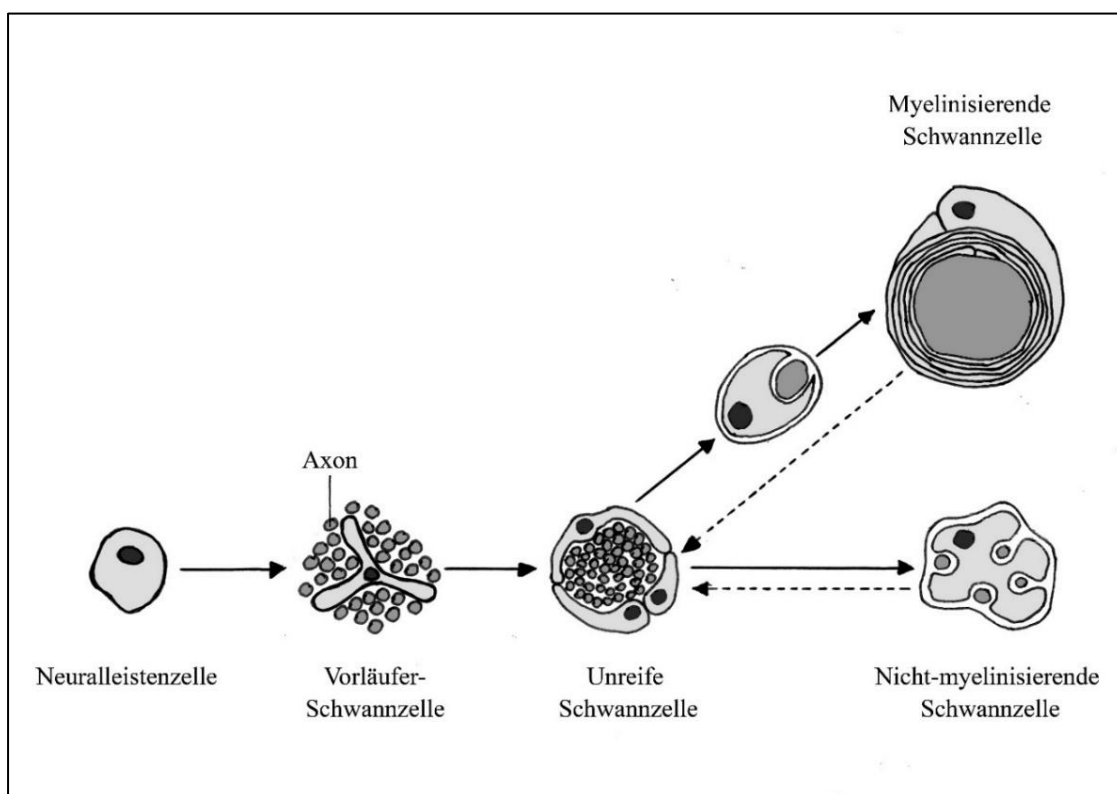


Abbildung 9: Chirurgischer Algorithmus peripherer Nervenverletzungen; eigene Darstellung in Anlehnung an (11)

## 1.4 Rolle von Schwann-Zellen bei peripheren Nervenläsionen

Schwannzellen umgeben sowohl myelinisierte als auch nicht-myelinisierte Axone (49,50). Im Laufe der Entwicklung differenzieren sich Schwannzellen, welche mit einem Axon mit einem Durchmesser von mehr als 1  $\mu\text{m}$  in Verbindung stehen, zu myelinisierenden Schwannzellen, wohingegen sich Schwannzellen, die mit einem Axon mit geringerem Durchmesser assoziiert sind, zu nicht-myelinisierenden Schwannzellen, die als Remak-Zellen bezeichnet werden, entwickeln (50–53). Während einzelne Remak-Zellen mehrere Axone umschließen, umhüllen myelinisierende Schwannzellen in der Regel lediglich ein Axonsegment, wobei folglich ein einzelnes Axonsegment in Abhängigkeit von dessen Länge von mehreren tausend Schwannzellen myelinisiert werden kann (51). Schwannzellen übernehmen zahlreiche wichtige Aufgaben für die Entwicklung und Funktion der Nervenzelle. So stellen sie unter anderem

durch die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Ausbildung einer Basallamina eine Leitstruktur für das Aussproßen der Axone zur Verfügung, regulieren den Durchmesser des Axons und beeinflussen durch die Sekretion neurotropher Faktoren die Koordination und Kommunikation zwischen den verschiedenen Ebenen der Reizweiterleitung (54–56). Zudem sind Schwannzellen bei der axonalen Regeneration nach peripherer Nervenverletzung von entscheidender Bedeutung (57–59). Periphere Nervenverletzungen führen zu einer aseptischen Entzündungsreaktion am Verletzungsort einhergehend mit einer im Rahmen der Wallerschen Degeneration nach distal verlaufenden Zersetzung des Axons und der Myelinscheide durch die kalzium-vermittelte Aktivierung von Calpainen und Proteasomen (60,61). In der Folge kommt es zur raschen Einwanderung von Fibroblasten und Immunzellen einschließlich neutrophiler Granulozyten und Makrophagen, welche über eine Schwannzell-vermittelte Sekretion von trophischen Faktoren, Zytokinen und Interleukinen rekrutiert werden und zusammen mit den Schwannzellen für die Phagozytose der axonalen und myelinischen Residuen verantwortlich sind (62–64). Durch Verlust des Kontaktes zum Axon dedifferenzieren die Schwannzellen von ihrem adulten, myelinisierenden oder nicht-myelinisierenden Stadium in einen proliferierenden Reparaturzustand, welcher auf molekularer Ebene den unreifen Schwannzellen sehr ähnlich ist und als “aktivierter Schwannzell-Phänotyp“ bezeichnet wird (65–67).



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Entwicklungsstufen von Schwannzellen in peripheren Nerven ausgehend von der Neuralleistenzelle; eigene Darstellung in Anlehnung an (68)

Im Falle der myelinisierenden Schwannzellen kommt es dabei zu einer Herabregulation der Expression von zahlreichen Markern für myelinbildende Schwannzellen einschließlich Enzymen, die für die Cholesterinsynthese verantwortlich sind, strukturellen Proteinen wie Myelin protein zero (P0) und Myelin basic protein (MBP) sowie membranassoziierten Proteinen wie Myelin associated glycoprotein (MAG) und Periaxin (69–73). Im Gegenzug dazu wird eine andere Gruppe von Molekülen, von denen sich die meisten üblicherweise in unreifen Schwannzellen vor der Myelinisierung nachweisen lassen, einschließlich den Zell-Adhäsions-Molekülen L1 und Neural cell adhesion molecule (NCAM) und dem p75 low affinity neurotrophin receptor (p75) aktiviert (74). Zudem geht die Aktivierung der Schwannzelle mit einer erhöhten Sekretion von Neurotrophinen, wie z.B. Nerve growth factor (NGF), Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF), und von Zytokinen einschließlich Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 6, Leukaemia inhibitory factor (LIF) und Macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1) einher (56,67,75–79). Neurotrophine sind kleine basische Proteine mit einer Molekülmasse von etwa 13 kDa, die durch Bindung an Tropomyosinrezeptorkinasen wie TrkA, TrkB und TrkC eine intrazelluläre Signalkaskade mit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auslösen und die Differenzierung des Neurons bewirken (56,77,80). Damit spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Herstellung und Sicherung des Fortbestandes zielgerichteter Verbindungen zwischen Nervenzellen sowie der neuronalen Plastizität (56). In der Folge wandern derartige dedifferenzierte Schwannzellen vom proximalen und distalen Nervenstumpf aus in den Defekt ein und bilden die Büngner-Bänder aus, welche zudem durch die Bereitstellung einer Basallamina ein supportives Gerüst für die neu in Richtung Zielorgan aussprossenden Axone bilden (81). Zusätzlich sezernieren Makrophagen Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), um durch eine verbesserte Vaskularisation am Verletzungsort den Regenerationsprozess zu unterstützen (82). Nach erfolgreicher Regeneration des Axons remyelinisieren die betreffenden Schwannzellen in Analogie zur ursprünglichen Entwicklung jeweils erneut ein einzelnes Axonsegment (83). Die Beeinflussung der Nervenregeneration durch Neurotrophine scheint sehr vielversprechend zu sein, jedoch erweist sich deren unmittelbarer Einsatz aufgrund kurzer Halbwertszeiten, unzureichender Steuerbarkeit von Konzentrationen und der problematischen lokalen Applikation als schwierig (84,85). Neurotrophin-exprimierende Schwannzellen hingegen sind imstande kontinuierlich Nervenwachstumsfaktoren zu sezernieren und zudem dynamisch auf negative Rückkopplungssignale regenerierender Neurone zu reagieren (84). Häufig kommt es bei traumatischen und degenerativen Nervenläsionen nicht nur zur Durchtrennung des Axons (Axonotmesis), sondern auch zur abschnittweisen Zerstörung der

das Axon umgebenden Glia-scheide (Neurotmesis) (10). Dadurch wird die Interaktion zwischen Axon und Schwannzelle, welche über direkten Zell-Zell-Kontakt und parakrine Mechanismen erfolgt, im Bereich der Defektstrecke empfindlich gestört (23,85). Dies ist ein entscheidender Faktor für die ungünstigen Ergebnisse der Nervenregeneration nach Nervenläsionen (86,87).

### **1.5 Rolle von Neurotrophinen und neurotrophen Faktoren bei der Nervenregeneration**

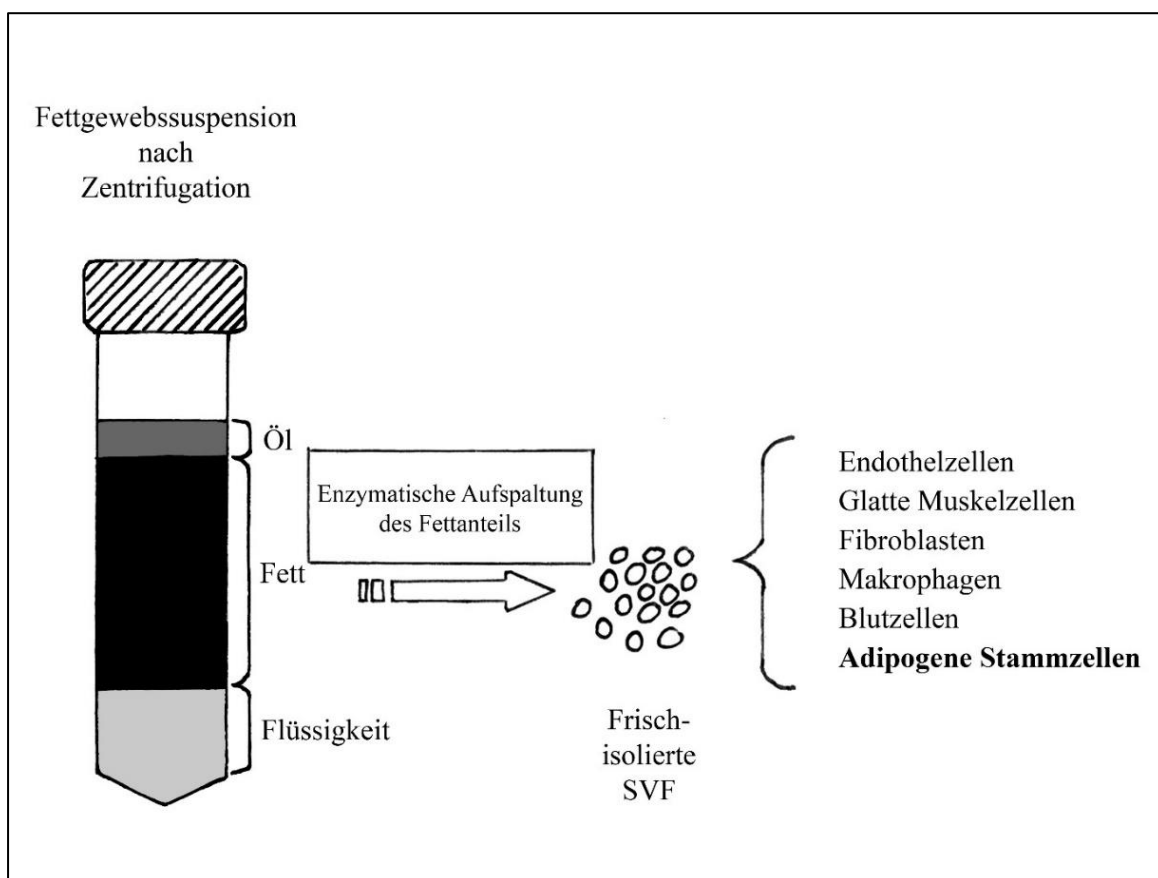
Bereits in der frühen Entwicklung des peripheren Nervensystems nehmen Neurotrophine und neurotrophe Faktoren eine wichtige Rolle für die Differenzierung, die Migration und das Überleben von Nerven- und Gliazellen ein (56). Auch bei der Nervenregeneration nach Nervenverletzungen stellen Neurotrophine und Zytokine maßgebliche Stimulatoren und essentielle Bestandteile der Signalkaskaden dar (88). Sie werden nach einer Verletzung von Schwannzellen und Fibroblasten synthetisiert und verbessern durch Förderung des axonalen Wachstums sowie der Schwannzellmigration und -proliferation die funktionelle Regeneration (88,89). Zur Familie der klassischen Neurotrophinen zählen NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5 (56). NGF entfaltet in erster Linie in sensorischen und sympathischen Neuronen seine neuroprotektive und regenerative Wirkung (77). Nach Nervenverletzung kommt es zu einem biphasischen Verlauf mit erstem Anstieg der mRNA des Neurotrophins nach sechs Stunden (77). Bereits nach 12 Stunden beträgt die Konzentration von NGF am distalen Nervenstumpf das 10-fache im Vergleich zum intakten Nerven vor Axotomie (77). Der zweite Anstieg ist deutlich langsamer und wird im Zuge der Wallerschen Degeneration von Makrophagen initiiert (77). Diese Hochregulation wird durch Schwannzellen gesteuert, welche für die Produktion von NGF im durchtrennten Nerven maßgebend sind (77,88,90). Taniuchi *et al.* konnten eine Zunahme der NGF-Rezeptoren im distalen Nervenstumpf des N. ischiadicus um das 50-fache beobachten und schließen aufgrund ihrer Ergebnisse auf eine bedeutende Rolle des Neurotrophins NGF bei der Regeneration sensorischer Neurone (91). Bei der Entwicklung und Regeneration von Motoneuronen zeigte NGF jedoch keine relevante Auswirkung auf Neuritenwachstum und Überleben (88). Das Neurotrophin BDNF hingegen ist wesentlich für das Überleben von Motoneuronen nach Axotomie verantwortlich (92). Sendtner *et al.* verglichen den Einfluss von BDNF, NGF und NT-3 auf die Motoneurone durchtrennter Fazialisnerven von neugeborenen Ratten und konnten nachweisen, dass BDNF 50 % der axotomierten Motoneurone vor dem Zelltod bewahrte (92). Neurotrophine können an zwei strukturell unterschiedliche Rezeptoren binden, der Tropomyosin receptor kinase (TrkA, -B, -C) und den Low-affinity nerve growth factor receptor (p75), wobei die verschiedenen

Neurotrophine jeweils Affinitäten zu bestimmten Rezeptoren bilden (56). Somit bindet NGF bevorzugt an TrkA, BDNF und NT-4/5 an TrkB und NT-3 an TrkC (93). Dabei führt die Bindung von Neurotrophinen an Trk-Rezeptoren zum Überleben und zur Differenzierung von Neuronen, während die Bindung an p75 unter anderem die Apoptose einleitet (93). Demnach initiiert die Ligandenbindung an diese beiden Rezeptoren zwei unterschiedliche Prozesse, zum einen die Prävention und zum anderen die Aktivierung des programmierten Zelltods. Der neurotrope Faktor GDNF lässt sich nicht in die Familie der oben genannten klassischen Neurotrophine einordnen, sondern ist Teil der Superfamilie der Transforming growth factors (TGF) (84). GDNF gilt als einer der potentesten Überlebensfaktoren für motorische und sensible Neurone nach Axotomie (84). Oppenheim *et al.* bewiesen im Tiermodell, dass GDNF den in der Entwicklung natürlichen Zelltod von Motoneuronen unterbindet, und beobachteten einen positiven Einfluss von GDNF auf Motoneurone nach peripherer Axotomie (94). Zusätzlich zu den Effekten auf Motoneurone ließ sich auch eine positive Wirkung auf das Überleben sensorischer Neurone im Spinalganglion nachweisen (88). Des Weiteren trägt GDNF wesentlich zur Myelinisierung von Axonen bei. Höke *et al.* zeigten, dass eine exogene Applikation von GDNF die Proliferation von Schwannzellen induziert und in der Folge die Myelinisierung unmyelinisierter Axone fördert (95).

## **1.6 Stammzellbasierte Nervenregeneration**

In der Vergangenheit haben bereits mehrere Studien bewiesen, dass sich durch Transplantation von autologen Schwannzellen in verletzte Nerven bei Mäusen, Ratten und nichtmenschlichen Primaten eine verbesserte funktionelle Nervenregeneration erzielen lässt (96–98). Auch bei der ersten berichteten klinischen Anwendung am Menschen im Jahre 2017 konnte beim betroffenen Patienten nach Rekonstruktion des N. ischiadicus mittels durch transplantierte Schwannzellen unterstütztem autologem Nerveninterponat eine gute Wiederherstellung der motorischen Funktion des N. tibialis sowie eine partielle Wiedererlangung der Sensibilität beobachtet werden (99). Der Einsatz originärer Schwannzellen zur Nervenregeneration bringt jedoch auch mehrere Probleme mit sich: Zum einen bedarf es zur Gewinnung der Schwannzellen der Biopsie eines gesunden Nerven, wodurch an der Entnahmestelle ein neuer Defekt geschaffen wird mit sämtlichen damit verbundenen Einschränkungen (100). Zum anderen wird die Rekonstruktion der Nervenverletzungen durch die zur Kultivierung einer für die Transplantation ausreichenden Anzahl an Schwannzellen benötigten Zeit erheblich verzögert (101). Des Weiteren weisen adulte Schwannzellen *in vitro* insbesondere bei Patienten

fortgeschrittenen Alters lediglich eine eingeschränkte Proliferations- und Regenerationskapazität auf (102–104). Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (Adipose tissue derived stem cells, ASCs), welche zusammen mit Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Blutzellen die stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) des Fettgewebes bilden, können hingegen z.B. durch Liposuktion in ausreichend großer Zahl mit minimalinvasiven Methoden gewonnen werden (105). Pro Milliliter Fettgewebsaspirat lassen sich ca.  $0,5 - 5 \times 10^5$  Zellen der stromal-vaskuläre Fraktion gewinnen, aus welchen wiederum 4.000 – 20.000 ASCs isoliert werden können (106). Dabei ist die Zellausbeute im Vergleich zur Isolation aus dem Knochenmark etwa 500-fach höher (105).



*Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aufspaltung der gewonnenen Fettgewebssuspension in die Bestandteile der stromal-vaskulären Fraktion; eigene Darstellung in Anlehnung an (107)*

Mittlerweile haben bereits zahlreiche Studien gezeigt, dass adipogene Stammzellen zu glialen Zellen differenziert werden können, die ein vielversprechendes regeneratives Potential bei Nervenverletzungen sowohl auf Rückenmarksebene als auch auf Ebene des peripheren Nerven besitzen (80,100,108). Dies lässt vermuten, dass solche glial differenzierten Zellen die Fähigkeit zur Sekretion von Wachstumsfaktoren vergleichbar mit denen Schwannscher Zellen haben (80,100). Diese werden daher im Folgenden *Schwann-like-cells* genannt. Aus diesem

Grund gelangten die ASCs in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung auf dem Feld der Nervenregeneration (100,109). Drei der etablierten Differenzierungsprotokolle sind dabei von besonderem Interesse: Das Differenzierungsprotokoll der Publikation von Xu *et al.* mit dem Titel „Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells *in vitro*“ (109), das Differenzierungsprotokoll der Publikation von Felthaus *et al.* mit dem Titel „TGF-beta stimulates glial-like differentiation in murine dental follicle precursor cells (mDFPCs)“ (110) und das Protokoll von Kingham *et al.* in der Publikation „Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth *in vitro*“ (111). Durch diese Differenzierungsprotokolle lassen sich *Schwann-like-cells* kultivieren, welche sich hinsichtlich ihrer Morphologie und Genexpression teils erheblich voneinander unterscheiden. Die nach dem Differenzierungsprotokoll nach Xu *et al.* differenzierten *Schwann-like-cells* sind durch die Ausbildung sogenannter Neurospheres, freischwimmender kugeliger Zellgruppierungen, besonders charakteristisch und exprimieren die allgemeinen Gliamarker GFAP (Glial fibrillary acidic protein) und S100. Durch das Differenzierungsprotokoll nach Felthaus *et al.* können *Schwann-like-cells* kultiviert werden mit den Markern myelinisierender Schwannzellen P0, MBP und p75, welche den Schwannzellen eines intakten adulten Nerven ähneln (110). Das Differenzierungsprotokoll nach Kingham *et al.* ermöglicht es *Schwann-like-cells* zu kultivieren, die vermehrt die Neurotrophine NGF und BDNF sowie den neurotrophen Faktor GDNF sezernieren und somit den aktivierten, nicht-myelinisierenden Schwannzellen im Regenerationsprozess nach Nervendurchtrennung am nächsten kommen (111). Die Differenzierung von adipogenen Stammzellen kann also in verschiedene Schwannzell-Phänotypen erfolgen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Prozess der Nervenregeneration wichtige Aufgaben übernehmen.

## 2. Zielsetzung

Diverse Vorarbeiten anderer Autoren haben gezeigt, dass sich mesenchymale Stammzellen zu glialen Zellen verschiedener Phänotypen differenzieren lassen. So ist es mit dem Differenzierungsprotokoll nach Xu *et al.* möglich, adipogene Stammzellen zu *Schwann-like-cells* zu differenzieren, die auf Genebene die allgemeinen Gliamarker S100 und GFAP exprimieren (109). Mit dem Differenzierungsprotokoll nach Felthaus *et al.* können *Schwann-like-cells* kultiviert werden, die auf Genebene die Marker myelinisierender Schwannzellen exprimieren (110). Das Differenzierungsprotokoll nach Kingham *et al.* ermöglicht es *Schwann-like-cells* zu kultivieren, die die Gene für die Neurotrophine NGF und BDNF sowie den neurotrophen Faktor GDNF exprimieren (111). Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich diese Marker auch bei *Schwann-like-cells* auf Gen- und Proteinebene nachweisen lassen, welche entsprechend den basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Felthaus modifizierten Differenzierungsprotokollen kultiviert wurden. Zudem soll untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß die nach den verschiedenen Protokollen differenzierten *Schwann-like-cells* die Neurotrophine NGF, BDNF und GDNF sezernieren. Des Weiteren soll der Effekt der von den mit den drei verschiedenen Differenzierungsprotokollen behandelten *Schwann-like-cells* sezernierten Wachstumsfaktoren und Neurotrophine auf das Wachstum von Schwannschen Zellen untersucht werden.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Isolierung und Kultivierung der adipogenen Stammzellen**

Die in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten adipogenen Stammzellen wurden ausschließlich aus dem Fettgewebe von Ratten gewonnen. Die Zustimmung zu den folgenden Verfahren seitens der Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg wurde eingeholt. Das Fettgewebe wurde unter der Sicherheitswerkbank mit einem Skalpell aus der Bauch- und Rückenregion der Ratten entnommen und zu ca. 1 mm<sup>3</sup> großen Stücken zerkleinert, bis ein homogenes Gemisch entstand. Daraufhin wurde das gewonnene Fettgewebe zu gleichen Teilen mit Medium vermischt, welches sich aus DMEM (Dulbecco's Eagles Medium – low glucose) mit niedrigem Glukosegehalt und Pyruvat sowie 1 % Penicillin und Streptomycin zusammensetzte. Um die Adipozyten aus dem Gewebe herauszulösen wurden 35 mg Kollagenase (Collagenase from Clostridium histolyticum, Sigma Aldrich) zu 1,4 ml sterilem PBS (Phosphate Buffered Saline von Sigma Aldrich) zugegeben und jeweils 300 µl der entstandenen Lösung zu 10 ml der Fettgewebssuspension hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen folgte der Verdau der Suspension bei 37 °C über 60 Minuten auf dem Schüttelinkubator mit 100 rpm (revolutions per minute). Unter Zuhilfenahme eines 100 µm Steriflip Filters (MERCK Millipore) wurden die Einzelzellen von der Gewebssuspension getrennt. Der Durchfluss wurde über fünf Minuten bei 500 rcf (relative centrifugal force) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Zellpellet, welches die adipogenen Stammzellen enthielt, wurde mit 10 ml PBS gewaschen und erneut über fünf Minuten bei 500 rcf zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml α-MEM (α-Minimum Essential Medium Eagle von Sigma Aldrich), dem 20 % FBS (Fetal Bovine Serum von PAN-Biotech) 1 % Penicillin und Streptomycin und 1 % Glutamax zugesetzt worden sind, - im Folgenden als Proliferationsmedium bezeichnet – resuspendiert. und dann in einer T175-Zellkulturflasche (Greiner Bio One), in der sich 25 ml desselben Proliferationsmediums befanden, ausgesät und bis zum Erreichen der Subkonfluenz in Zellkulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten bis dritten Tag ausgetauscht. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen entweder passagiert oder bei -196 °C im Stickstofftank eingefroren. Die eingefrorenen adipogenen Stammzellen wurden zur Weiterverwendung mit 1 ml Proliferationsmedium aufgetaut und in T175 Flaschen mit 25 ml vorgewärmtem Proliferationsmedium überführt. Daraufhin wurden die Stammzellen erneut bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator bis zu ihrem 80 % subkonfluenten Wachstumsstadium kultiviert. Um die

Einflüsse des DMSO (Dimethylsulfoxid), welches Teil des Einfriermediums ist, auf die Zellen möglichst gering zu halten, wurde das Medium bereits am ersten Tag nach dem Auftauen gewechselt. Anschließend erfolgte der Medienwechsel, der dreimal pro Woche mit je 25 ml Proliferationsmediums durchgeführt wurde. Nach Erreichen der 80 % igen Subkonfluenz wurden die Zellen passagiert. Zu diesem Zweck wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und daraufhin mit 2,5 ml einer 0,25 % igen Trypsinlösung (Pan-Biotech) in PBS für 4 - 7 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 2,5 ml Proliferationsmedium abgestoppt, die erhaltene Zellsuspension vollständig in ein 15 ml-Falcon überführt und über fünf Minuten bei 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Saugpumpe abgesaugt und das sich am Boden befindende Zellpellet in 1 ml Proliferationsmedium resuspendiert. Anschließend wurden nach vollständiger Resuspension weitere 9 ml Proliferationsmedium zugegeben. 20 µl dieser Suspension wurden daraufhin auf ein Hemocytometer aufgetragen und die Zellen bei 40-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop ausgezählt. Je nach Passage wurden die adipogenen Stammzellen nach dem Passagieren für nachfolgende Versuche in Platten, Schalen oder Zellkulturflaschen ausgesät oder weiterkultiviert. Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden Zellen der Passage 5 verwendet. Um die Zellen weiter zu kultivieren wurden sie auf die dreifache Menge an T175 Flaschen mit wiederum je 25 ml Proliferationsmedium aufgeteilt und bis zur 80 % igen Subkonfluenz inkubiert. Zellen, für die momentan keine Verwendung war, wurden eingefroren. Zu diesem Zweck wurden eine Million Zellen in 0,5 ml Kryomedium (Proliferationsmedium mit 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Gefrierlagerröhrchen überführt. Diese Gefrierlagerröhrchen wurden vorerst in einem Behälter, der für ein langsames Abkühlen sorgt, bei -80 °C gelagert und nach einem Tag in einen -196 °C Stickstofftank überführt.

### **3.2 Differenzierung von adipogenen Stammzellen zu Schwann-like-cells**

Die Differenzierung der adipogenen Stammzellen zu *Schwann-like-cells* wurde mittels modifizierter Differenzierungsprotokolle dreier etablierter Publikationen (siehe Kapitel 1.5) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen bis zum jeweiligen Beginn der Differenzierung bei 80 % iger Subkonfluenz alle identisch behandelt, indem sie bei 37 °C in Proliferationsmedium inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in der fünften Passage auf entsprechende Zellkulturflaschen oder wells ausgesät und bei Erreichen der Subkonfluenz der Differenzierungsprozess begonnen.

### 3.2.1 Differenzierungsprotokoll 1

Die Differenzierung nach Protokoll 1 erfolgte entsprechend der Publikation „Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells *in vitro*“, Xu et al., BMC Neuroscience 2008. Die adipogenen Stammzellen wurden zunächst in T25-Flaschen in einer Dichte von  $1-2 \times 10^5$  Zellen /cm<sup>2</sup> ausgesät. Anschließend wurde Neurospheres-growth-Medium zugegeben, welches sich aus DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12), 1 % Penicillin und Streptomycin, 1 % Glutamax, 20 ng/ml EGF (epidermal growth factor, Preprotech), 20 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor, Preprotech) und B27 (1:50) zusammensetzt. Nach zwei bis vier Tagen lösten sich die adipogenen Stammzellen vom Boden der Kulturflasche ab und bildeten im Medium schwimmende Neurospheres. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Neurospheres in ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Behältnis gegeben, in dem sie nach sechs bis acht Stunden wieder adhärent wurden. Dann wurde für 48 Stunden das Xu-Differenzierungsmedium zugegeben bestehend aus Proliferationsmedium, 0,5 µM Tretinoin, 14 µM Forskolin, 10 ng/ml PDGF (platelet-derived growth factor) und 250 ng/ml Heregulin. Zusätzlich zu diesen im Originalprotokoll verwendeten Substanzen wurde das Xu-Differenzierungsmedium basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Felthaus mit 5 ng/ml TGF-β1 (transforming growth factor beta 1) modifiziert. Nach 48 und 72 Stunden wurde das Medium ausgetauscht, die Überstände als konditioniertes Medium gesammelt, welche bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren wurden, und schließlich die RNA isoliert.

### 3.2.2 Differenzierungsprotokoll 2

Die Differenzierung nach Protokoll 2 erfolgte entsprechend der Publikation „TGF-beta stimulates glial-like differentiation in murine dental follicle precursor cells (mDFPCs)“, Felthaus et al., Neuroscience Letters 2010. Die adipogenen Stammzellen wurden zunächst in T25 Flaschen in einer Dichte von 5000 Zellen /cm<sup>2</sup> ausgesät und in Proliferationsmedium kultiviert. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde über sechs Tage das Felthaus-Differenzierungsmedium zugegeben, welches sich aus DMEM/F12, 1 % Penicillin und Streptomycin, 1 % Glutamax, 20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF, 5 µM Tretinoin, N2-Supplement (100x, Life Technologies) und 5 ng/ml TGF-β1 zusammensetzt. Zusätzlich zu diesen im Originalprotokoll verwendeten Substanzen wurde das Felthaus-Differenzierungsmedium basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Felthaus mit

100 ng/ $\mu$ l Heregulin modifiziert. Das Medium wurde nach 48 und 72 Stunden gewechselt und an Tag 4 (Differenzierungsstart = Tag 0) die RNA isoliert und die Überstände als konditioniertes Medium gesammelt, welche bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren wurden.

### **3.2.3 Differenzierungsprotokoll 3**

Die Differenzierung nach Protokoll 3 erfolgte entsprechend der Publikation „Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth *in vitro*“, Kingham et al., Experimental Neurology, 2007. Die adipogenen Stammzellen wurden in einer Dichte von 5000 Zellen /cm<sup>2</sup> in 6-well-plates ausgesät und in Proliferationsmedium kultiviert. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde für 24 Stunden mit 1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich) supplementiertes Proliferationsmedium zugegeben. Nachdem erneutem Waschen mit PBS wurde für 72 Stunden Proliferationsmedium, dem 35 ng/ml Tretinoin zugesetzt wurde, zugegeben, wobei nach 48 Stunden das Medium gewechselt wurde. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Dann wurde für 14 Tage Kingham-Differenzierungsmedium zugegeben, welches sich aus  $\alpha$ -MEM, 10 % FBS, 1 % Penicillin und Streptomycin und 1 % Glutamax, 10 ng/ml FGF-2, 5 ng/ml PDGF, 14  $\mu$ M Forskolin und 250 ng/ml Heregulin zusammensetzt. Zusätzlich zu diesen im Originalprotokoll verwendeten Substanzen wurde das Kingham-Differenzierungsmedium basierend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Felthaus mit 5 ng/ml TGF- $\beta$ 1 modifiziert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage ausgetauscht, die Überstände als konditioniertes Medium gesammelt, welche bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren wurden, und schließlich die RNA isoliert.

**Tabelle 1: Übersicht über die Zusammensetzung der drei beschriebenen Originalprotokolle einschließlich Modifikation durch die Arbeitsgruppe Felthaus**

|                   | Protokoll 1                                                         | Protokoll 2                                         | Protokoll 3                                                                                |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Originalprotokoll | EGF<br>bFGF<br>-----<br>Tretinoin<br>PDGF<br>Forskolin<br>Heregulin | N2-Supplement<br>bFGF<br>EGF<br>Tretinoin<br>TGF-β1 | β-Mercaptoethanol<br>-----<br>Tretinoin<br>-----<br>PDGF<br>bFGF<br>Forskolin<br>Heregulin |
| Modifikation      | TGF-β1                                                              | Heregulin                                           | TGF-β1                                                                                     |

### 3.3 RNA-Isolierung

Um die Differenzierung der adipogenen Stammzellen zu *Schwann-like-cells* nachvollziehen zu können, wurde die Genexpression bestimmter Gene durch PCRs (polymerase chain reaction) ermittelt. Zu diesem Zweck musste nach Abschluss des jeweiligen Differenzierungsprotokolls RNA isoliert werden. Die RNA-Isolierung wurde mit dem RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit Ausnahme des β-Mercaptoethanols sowie des Ethanol wurden nur dem Kit beiliegende Säulen und Puffer verwendet. Im ersten Schritt wurden die Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen /cm<sup>2</sup> in 6-well-plates bis zur Subkonfluenz in Proliferationsmedium kultiviert. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurde einmalig RNA von jeweils drei wells isoliert, die als Tag-0-Kontrolle dienten. Mit den übrigen Zellen wurde am selben Tag mit dem jeweiligen Versuch begonnen und die Zellen gemäß jeweiligem Differenzierungsprotokoll bis zum angegebenen Zeitpunkt kultiviert. Nach deren Vollendung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend pro well in 350 µl

Lysepuffer, bestehend aus 3,5 µl β-Mercaptoethanol und 350 µl RLT-Puffer, lysiert. Das Zelllysate wurde dann mit 350 µl 70 % Ethanol vermischt, auf eine Zentrifugationssäule (RNeasy spin column) überführt und für 15 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert, wodurch die RNA an die Membran gebunden wurde. Die RNA befand sich nun im Filter der RNeasy spin column, der Durchfluss konnte verworfen werden. Im nächsten Schritt wurden 700 µl RW1-Puffer zugegeben, wiederum für 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurden 500 µl RPE-Puffer zugegeben, erneut für 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wurde anschließend wiederholt mit erneuter Zentrifugation über 60 Sekunden bei 13000 rpm. Nachdem durch die drei Schritte mit den jeweiligen Waschpuffern (RW1, RPE) überschüssige Biomoleküle ausgewaschen worden sind und sich in der Membran nur noch RNA befand, wurde die RNeasy spin column in ein neues 2 ml Sammelröhrchen gesetzt und über zwei Minuten bei 13000 rpm zum Trocknen der Membran zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die RNeasy spin column in ein 1,5 ml Sammelröhrchen überführt, vorsichtig 40 µl Nuklease-freies Wasser auf die Membran pipettiert und so die RNA aus der Membran eluiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation über 60 Sekunden bei 13000 rpm. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA anschließend bei -80 °C eingefroren.

### **3.4 Reverse Transkription**

Die Reverse Transkription ermöglicht es cDNA (complementary DNA) aus RNA zu synthetisieren. Dies ist erforderlich, um in den folgenden PCRs mittels DNA-abhängiger DNA-Polymerasen spezifische Sequenzen zu amplifizieren. Vor Herstellung der cDNA musste zunächst die Konzentration der RNA-Proben bestimmt werden. Hierfür wurde das Spektralphotometer Nano Drop 2000c von Thermo Science benutzt. Die Reverse Transkription wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden ausschließlich dem Kit beiliegende Puffer und Reagenzien verwendet. Das Protokoll des verwendeten Kits gliedert sich in zwei Schritte. Im ersten Schritt werden eventuell vorhandene Reste genomischer DNA verdaut. Zu diesem Zweck wurde das Volumen berechnet, in dem sich 1 µg RNA befinden und dieses mit RNase freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Diese 12 µl wurden anschließend mit 2 µl gDNA Wipeout Puffer vermischt und das Gemisch für zwei Minuten bei 42 °C inkubiert. Im zweiten Schritt vollzieht sich die eigentliche Reverse Transkription, bei der das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase die RNA in cDNA umschreibt. Es wurden 4 µl 5-fach

konzentrierter RT-Puffer, 1 µl Reverse Transkriptase und 1 µl Primer-Mix vermischt und zum Reaktionsgemisch aus dem ersten Schritt hinzugegeben. Der Primer-Mix enthält Random-Hexamer-Primer, welche unspezifisch an mehrere Stellen der mRNA binden, sowie Oligo-dT-Primer, welche an den Poly-A-Schwanz binden. Das Reaktionsgemisch wurde für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert und im Anschluss für zwei Minuten auf 95 °C erhitzt, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren und doppelsträngige RNA-DNA-Hybridmoleküle zu denaturieren. Die gewonnenen cDNA-Proben wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

### 3.5 Q-PCR

Mit der durch reverse Transkription aus der isolierten RNA gewonnenen cDNA wurden PCRs durchgeführt, um die Genexpression der nach den drei beschriebenen Protokollen differenzierten Zellen vergleichen zu können. Hierfür wurde der DyNAmo Colour Flash SYBR Green Master Mix von Biozym Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieser beinhaltet eine DNA-Polymerase, einen Polymerasepuffer und Desoxyribonukleotide, welche als Bausteine für die bei der Amplifikation neu gebildeten DNA-Stränge dienen. Um die gesuchten Gene nachzuweisen, wurden zudem für die Durchführung der PCRs folgende spezifische Primer benötigt:

*Tabelle 2: Übersicht über die Sequenzen und Annealingtemperaturen der verwendeten PCR-Primer*

| Gen   | Sequenz                                                | Annealingtemperatur |
|-------|--------------------------------------------------------|---------------------|
| BDNF  | 5'-AATAATGTCTGACCCCAGTGCC<br>5'-ATTGTTGTCACGCTCCTGGT   | 60°C                |
| GAPDH | 5'-TATGACTCTACCCACGGCAAGT<br>5'-ATACTCAGCACCAGCATCACC  | 60°C                |
| GDNF  | 5'-CGCTGACCAGTGACTCCAATA<br>5'-CTCTGCGACCTTTCCTCTG     | 60°C                |
| GFAP  | 5'-GAGGGACAATCTCACACAGGAC<br>5'-GACTCAACCTTCCTCTCCAGAT | 60°C                |
| MBP   | 5'-TCTGGCAAGGACTCACACAC<br>5'-TCTGCCTCCGTAGCCAAATC     | 60°C                |
| NGF   | 5'-GGCCACTCTGAGGTGCATAG<br>5'-CTGTGTACGGTTCTGCCTGT     | 60°C                |
| P0    | 5'-GGCCATTGTGGTTTACACGG<br>5'-GGAAGATTGAAATGGCATCTCGG  | 60°C                |
| p75   | 5'-AATGCCAAGAGATCCCTGGTC<br>5'-GGAATGAGGTTGTCGGTGGT    | 63°C                |

Im ersten Schritt wurden für jede cDNA-Probe 5 µl DyNAmo Master Mix, 3 µl nukleasefreies Wasser, 0,5 µl forward primer (10 pmol/µl), 0,5 µl reverse primer (10 pmol/µl) und 1 µl der cDNA-Probe (50 ng) in ein well eines ECO 48-well-plates pipettiert. Oben genannten Zusätze wurden ebenfalls in ein weiteres well pipettiert, welchem jedoch statt der cDNA-Probe 1 µl nukleasefreies Wasser zugegeben wurde. Dieses well diente als No-Template-Control (NTC), um falsch positive Ergebnisse durch Verunreinigungen auszuschließen. Daraufhin wurde mit der eigentlichen PCR begonnen. Hierfür wurde das ECORreal-Time PCR Gerät mit der dazugehörigen Software benutzt. Im initialen Denaturierungsschritt wurde die Polymerase, bei welcher es sich um eine Hot-Start-Polymerase handelt, durch Inkubation der Proben für zehn Minuten bei 95 °C aktiviert. Diese Art der Polymerase ist an einen Antikörper gebunden und wird erst durch die Lösung dieser Bindung bei hohen Temperaturen aktiviert. Im zweiten Schritt werden die im Verlauf der folgenden Schritte gebildeten DNA-Doppelstränge bei 95 °C über 15 Sekunden denaturiert. In dritten Schritt lagern sich die Primer durch Abkühlen auf die optimale Annealingtemperatur, die meist bei ca. 60 °C liegt, an ihre spezifischen, komplementären Sequenzen der cDNA an. Im vierten Schritt vollzieht sich die Elongation bei 72 °C über 25 Sekunden, bei welcher die Polymerase ausgehend von den Primern den komplementären Strang in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Nach dem vierten Schritt fährt das Programm wieder mit dem zweiten Schritt fort und verfährt so für insgesamt 40 Zyklen, bis nach dem letzten Zyklus das Reaktionsgemisch auf 4 °C abgekühlt wird. Daraufhin schließt sich im Falle der SYBR Green PCR ein Schmelzkurvenprogramm an, welches der Verifikation der PCR-Produkte dient. Die relative Genexpression wurde mithilfe der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet, wobei GAPDH als „Housekeeping“ Gen verwendet wurde.

### **3.6 Proteinisolierung**

Zur Proteinisolierung wurden die adipogenen Stammzellen in 100 mm Zellkulturschalen bis zur Subkonfluenz in Proliferationsmedium kultiviert und anschließend die Differenzierungen gemäß den beschriebenen Differenzierungsprotokollen gestartet. Nach deren Vollendung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und durch Zugabe einer 0,25 %igen Trypsinlösung in PBS vom Boden des Zellkulturschalen abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension über drei Minuten bei 500 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und das Zellpellet in 150 µl RIPA-Puffer, welcher davor im Verhältnis 1:25 mit 25x Protease Inhibitor Cocktail (Roche) vermischt worden ist, resuspendiert. Daraufhin wurde das Lysat in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge 15-20 min

bei 13000 rcf zentrifugiert und der klare, die Proteine enthaltende Überstand abgenommen und in Eppendorf-Tubes gesammelt. Die Proteinsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

### **3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mittels DC Protein Assay von Bio-Rad gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Diesem kolorimetrische Assay liegt die Reaktion von Proteinen mit der alkalischen Kupfer(II)-Tartrat Lösung und dem Folin-Reagenz zugrunde. Zur Bestimmung der unbekannten Proteinkonzentrationen musste zunächst eine Standardreihe mit den Konzentrationen 2 - 1 - 0,5 - 0,25 - 0,125 - 0,0625 mg/ml hergestellt werden. Diese Standards wurden in Duplikaten mit einem Volumen von jeweils 5 µl in eine 96-well-plate pipettiert. Anschließend wurden die Proteinproben im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und jeweils 5 µl in Triplikaten in die 96-well-plate pipettiert. Daraufhin wurden in jedes well wurden 25 µl des Working Reagenz A, welches sich aus 1 ml Reagenz A und 20µl Reagenz S zusammensetzt, pipettiert. Schließlich wurden 200 µl des Reagenz B in jedes well pipettiert und die Lösungen vorsichtig durch auf- und abpipettieren gemischt. Nach Abdecken der Platte mit einer Folie wurde diese für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit konnte die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm mittels Spektralphotometer (Varioskan, Thermo Scientific) gemessen werden.

### **3.8 Western Blot**

Der Western Blot ermöglicht es bestimmte Proteine in einem Proteingemisch bzw. Zelllysat nachzuweisen. Hierfür müssen die Proteine zunächst nach Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran übertragen werden. Schließlich können die Proteinbanden durch Zugabe von Antikörpern visualisiert werden. Der erste Schritt bei der Durchführung eines Western Blot ist die Herstellung des Gels. Hierfür wurden ein 10 %iges Running Polyacrylamidgel (Trenngel) sowie ein 5 %iges Stacking Polyacrylamidgel (Sammelgel) verwendet. Das Running Gel setzt sich aus 30 % Acrylamid, 1,5 M Tris Base (pH 8,8) als Puffer, 10 % SDS (sodium dodecyl sulfat) und destilliertem Wasser zusammen. Für die Herstellung zweier Gele werden 8,94 ml des Running Gels, welches mit 60 µl des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat und 20 µl des Katalysators Temed vermischt wurde,

benötigt. Nach Vorbereitung der Gelkammer wurde das hergestellte Gemisch in die Gelkammern eingefüllt, mit Isopropanol überschichtet und polymerisierte in den folgenden 30 Minuten aus. Daraufhin wurde das Isopropanol abgossen und die Gelkammer mit vollentsalztem Wasser mehrfach ausgespült. Das in der Kammer verbleibende Wasser wurde mit Whatman Filterpapier entfernt. Im Folgenden wurde das Stacking Gel, welches sich aus 30 % Acrylamid, 0,5 M Tris Base (pH 6,8), 5 % SDS und destilliertem Wasser zusammensetzt, mit 10 % Ammoniumperoxidsulfat und Temed vermischt. Dabei wurden für zwei Gele 2,97 ml des Stacking Gels mit 32 µl Ammoniumperoxidsulfat und 6 µl Temed vermischt. Anschließend wurde das Gemisch bis zur Oberkante in die Gelkammer eingefüllt und ein Kamm der richtigen Stärke hineingesteckt. Das Gemisch polymerisierte in den folgenden 30 Minuten aus. Nach vollständiger Polymerisation wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt, wodurch sich Taschen für das Aufbringen der Proben bildeten. Nun wurden die Proben vorbereitet. Pro Probe wurden 30 µg Protein eingesetzt. Die Proteinsuspension wurde mit RIPA-Puffer auf 10 µl aufgefüllt und es wurden 10 µl Lämmli-Puffer, dem zuvor 5 % β-Mercaptoethanol zugegeben worden war, hinzugefügt. Die Proben wurden gut gemischt, bei 95 °C über fünf Minuten inkubiert, um Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufzubrechen, und anschließend abgekühlt. Zudem wurde der Proteinmarker (Page Ruler Prest NIR) im Verhältnis 1:5 mit Lämmli-Puffer und β-Mercaptoethanol verdünnt. Anschließend wurde der Kamm aus der Gelkammer entfernt. Die Gelkammern wurden in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, der Raum zwischen den Gelen mit 1x Laufpuffer bestehend aus Tris, Glycin, SDS und destilliertem Wasser aufgefüllt und die Elektrophoreseapparatur bis zur Markierung mit 1x Laufpuffer befüllt. Dann wurden pro Geltasche je 20 µl Probe bzw. 10 µl des Proteinmarkers auf das Polyacrylamidgel aufgetragen und die Elektrophorese mit einer Laufzeit von 20 Minuten bei 80 V gestartet. Sobald die Proben ins Running Polyacrylamidgel eingelaufen waren, wurde die Elektrophorese über ca. 40 Minuten bei 140 V weitergeführt. Als die Laufront noch ein bis zwei Zentimeter vom Ende des Gels entfernt war, wurde die Elektrophorese gestoppt, das Polyacrylamidgel aus der Gelkammer entnommen und das Stacking Polyacrylamidgel abgetrennt. Im nächsten Schritt wurden zunächst zwei Schwämme, vier Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran in 1x Transferpuffer eingeweicht. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel mit der Nitrozellulosemembran, den Filterpapieren sowie den schwarzen Schwämmen in folgender Reihenfolge in eine Löcherkassette eingelegt: Schwamm, zwei Filterpapiere, Gel, Nitrozellulosemembran, zwei Filterpapiere, Schwamm. Diese wurde in eine Laufkammer eingebracht, die mit kaltem 1x Transferpuffer befüllt wurde. Der Transfer auf die Membran erfolgte über 60 Minuten bei 100V. Nach Vollendung des Transfers wurde die

Membran in eine lichtgeschützte Inkubationsbox, die mit Odyssey Blocking Buffer (im Verhältnis 1:4 verdünnt mit PBS) befüllt worden war, gegeben und eine Stunde lang bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Odyssey Blocking Buffer entfernt und der mit 10 ml Odyssey Blocking Buffer verdünnte primäre Antikörper zugegeben. Die lichtgeschützte Inkubationsbox wurde über Nacht auf den Schüttler im Kühlraum (4 °C) zur Inkubation gelegt. Dabei konnten die spezifischen Antikörper an die Proteinbanden binden. Am nächsten Tag wurde der Antikörper entfernt und die Membran dreimal je fünf Minuten mit TBS-Tween gewaschen. Dadurch konnten unspezifisch bindende Antikörper entfernt werden. Anschließend wurde der in Odyssey Blocking Buffer im Verhältnis 1:15.000 verdünnte sekundäre Antikörper hinzugegeben und eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. In diesem Schritt konnte der sekundäre Antikörper an den primären Antikörper binden. Nach Entfernen des sekundären Antikörpers und erneutem Waschen nach oben genanntem Schema konnte die Membran mittels Odyssey Imaging System von LI-COR visualisiert und unter Verwendung der zugehörigen Odyssey-Software ausgewertet werden.

### **3.9 ELISA**

Die Antigenbestimmung für die Neurotrophine BDNF und NGF und den neurotrophen Faktor GDNF erfolgte über einen im „Sandwich-Prinzip“ durchgeführten ELISA (Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay). Für die ELISAs zum Nachweis von NGF wurde das DuoSet ELISA Development Kit von R&D Systems gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Alle verwendeten Puffer und Reagenzien lagen mit Ausnahme des PBS, des Waschpuffers (bestehend aus PBS und 0,05 % Tween 20), des Reagent Diluents (bestehend aus PBS und 1 % BSA) und der Stop Solution (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) diesem Kit bei. Zuerst wurde die zu verwendende 96-well Mikrotiterplatte mit je 100 µl β-NGF Capture Antibody Working Solution pro well beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die wells dreimal mit Waschpuffer gewaschen und der in den wells verbleibende Waschpuffer möglichst vollständig entfernt. Daraufhin wurde die Mikrotiterplatte durch Zugabe von je 300 µl Reagent Diluent pro well geblockt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde der Waschschrift wie oben beschrieben wiederholt. In der Zwischenzeit wurden die bei -80 °C eingefrorenen konditionierten Medien, die im Laufe der Differenzierungsprotokolle gesammelt wurden, aufgetaut. Anschließend wurden jeweils 100 µl der Standardverdünnungen (15,6-1000 pg/ml) oder 100 µl der Proben pro well zugegeben und die Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur zwei Stunden lang inkubiert. Währenddessen bindet der an die Platte gebundene Antikörper an

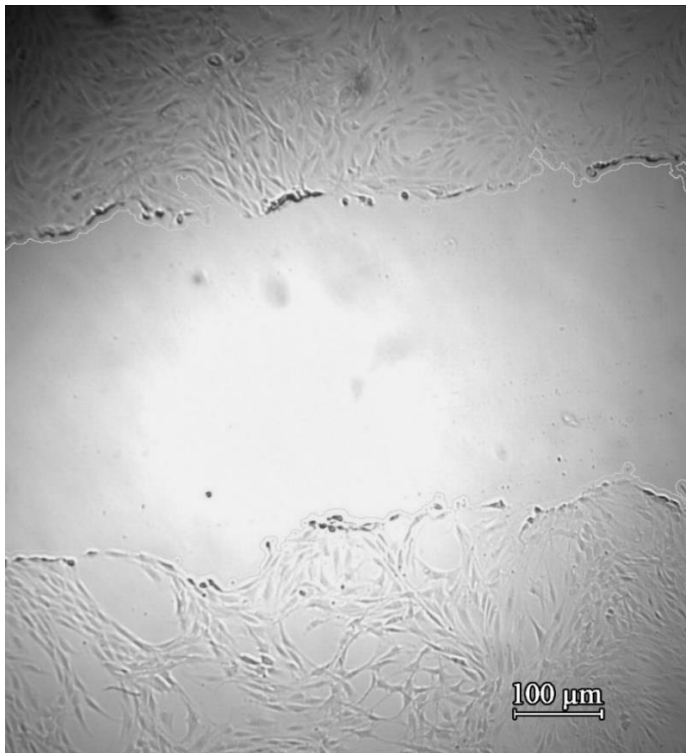
das in der Probe vorhandene Antigen. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Dann wurden 100 µl Detection Antibody Working Solution pro well zugegeben und die Mikrotiterplatte wurde zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt bindet der Detection Antibody an eine zweite Bindungsstelle am gesuchten Antigen. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 100 µl der Working Dilution der Streptavidin-HRP pro well hinzugegeben und die Mikrotiterplatte vor direktem Lichteinfall geschützt über 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Anschließend wurden 100 µl Substratlösung pro well zugegeben und die Mikrotiterplatte über 20 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. In diesem Schritt katalysiert die Peroxidase das zugegebene Substrat zu einem farbigen Endprodukt. Zum Abstoppen der Reaktion folgte die Zugabe von 50 µl Stopplösung (Schwefelsäure) pro well. Daraufhin wurde die optische Dichte der wells mittels eines Spektralphotometers (Varioskan, Thermo Scientific) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Zuletzt wurden aus den ermittelten Werten der optischen Dichte mittels Standardverdünnungen die entsprechenden Konzentrationen berechnet.

Die ELISAs zum Nachweis von BDNF und GDNF wurden mittels ELISA Kits der Firma Abnova mit bereits Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatten gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle verwendeten Puffer lagen mit Ausnahme des PBS diesen Kits bei.

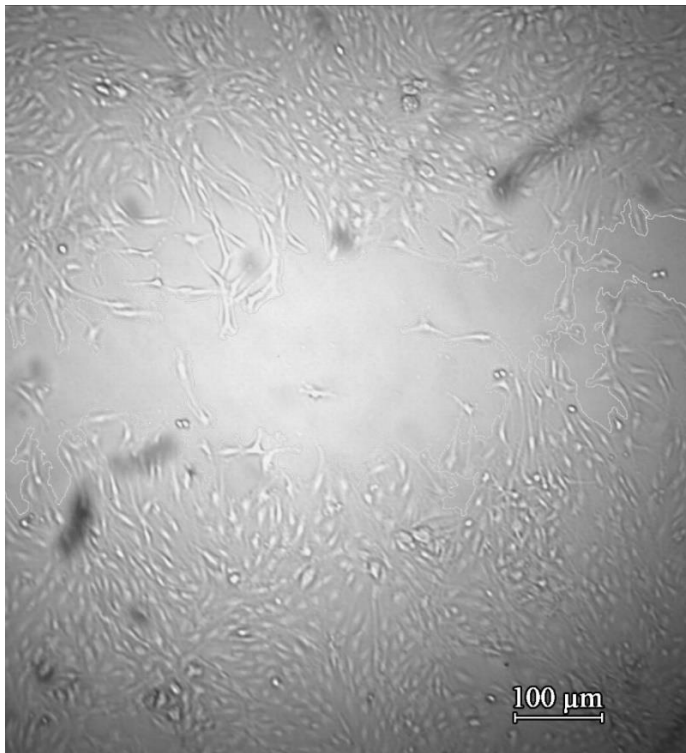
### **3.10 Scratch Assay**

Um den Einfluss der verschiedenen konditionierten Medien und der darin enthaltenen Faktoren auf die Zellmigration beobachten und vergleichen zu können, wurden Scratch Assays durchgeführt. Für diese Versuche wurden aus Ratten gewonnene Schwannzellen von ScienCell (#R121004) benutzt. Die Schwannzellen wurden auf einer 12-well-plate in einer Dichte von 5000 Zellen /cm<sup>2</sup> in Schwannzell-Wachstumsmedium von ScienCell mit den Zusätzen 5 % FBS, 1 % SCGC (Schwannzell Growth Supplement) und 1 % Penicillin und Streptomycin ausgesät und bei 37 °C bis zu ihrer 80 %igen Subkonfluenz inkubiert. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die wells mit PBS gewaschen, die konditionierten Medien der nach den beschriebenen Differenzierungsprotokollen differenzierten Zellen sowie das Kontrollmedium (oben beschriebenes Schwannzell-Wachstumsmedium von ScienCell) hinzugegeben und mithilfe einer Pipettenspitze ein Scratch zentral in den Zellrasen eingebracht. Daraufhin wurden die Zellen über insgesamt 72 Stunden kultiviert, wobei zur Dokumentation des Zellwachstums

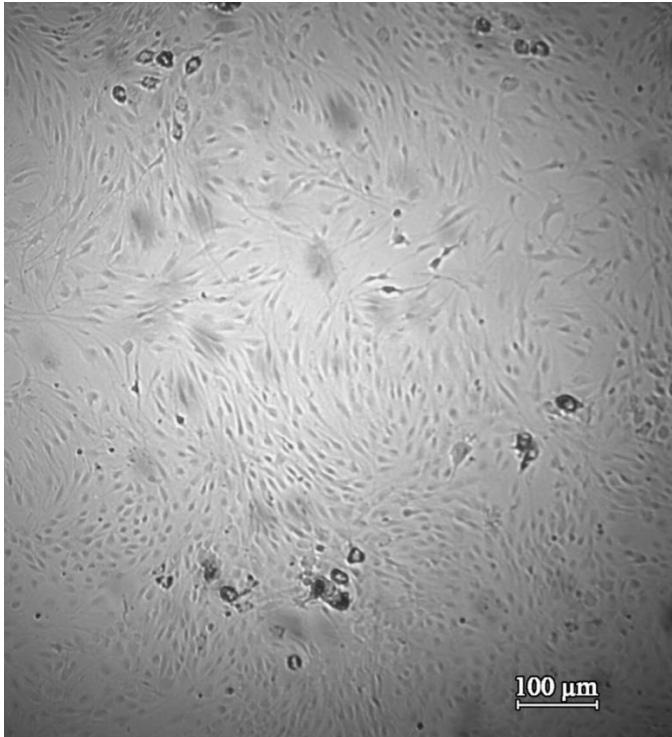
alle 6 Stunden Fotos mit dem Mikroskop erstellt wurden. Auf folgenden Abbildungen ist der Scratch exemplarisch bei 0 %, ca. 50 % und nahezu 100 % Konfluenz dargestellt:



**Abbildung 12:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines exemplarischen Scratches bei 0 % Konfluenz; Referenzbalken  $\pm 100 \mu\text{m}$



**Abbildung 13:** Lichtmikroskopische Aufnahme eines exemplarischen Scratches bei ca. 50 % Konfluenz; Referenzbalken  $\pm 100 \mu\text{m}$



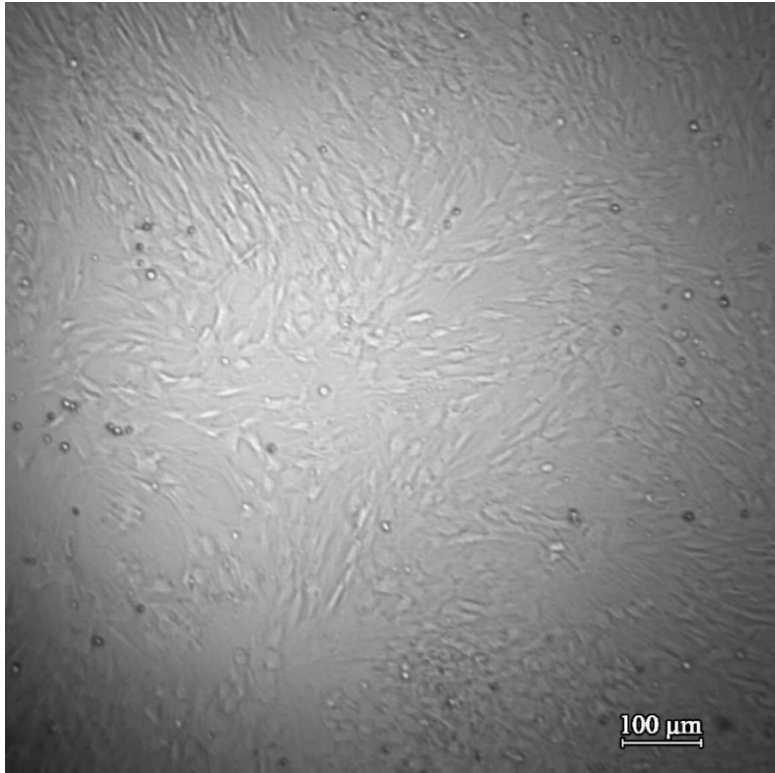
*Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahme eines exemplarischen Scratches bei nahezu 100 % Konfluenz; Referenzbalken  $\pm 100 \mu\text{m}$*

Die Auswertung der erstellten Fotos erfolgte mit dem Programm ImageJ über das “Wound healing size tool“-Addon. Mit dessen Hilfe konnte nach Anpassung verschiedener Parameter die prozentuale besiedelte Fläche innerhalb des Scratches mittels automatischer Kantenerkennung bestimmt werden. Zur Auswertung wurden den Scratches zum Zeitpunkt 0 h mit einer Fläche von 0 % die Scratches zum Zeitpunkt 30 h, an welchem das erste well eine 100 %ige Konfluenz erreicht hatte, gegenübergestellt. So ließ sich die Schwannzell-Migration in Abhängigkeit von den zugegebenen Medien objektivieren.

## 4. Ergebnisse

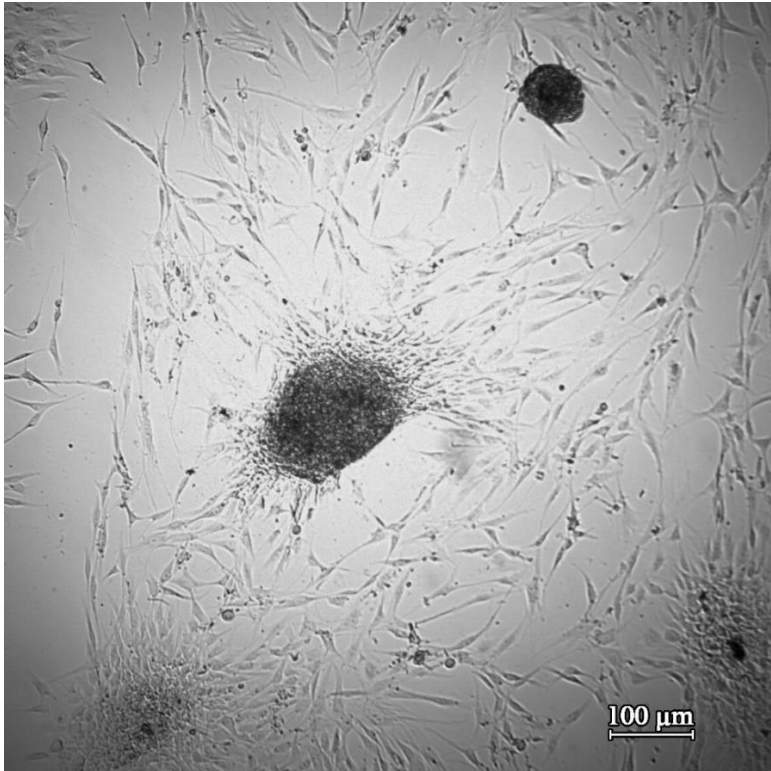
### 4.1 Morphologische Veränderungen nach Differenzierung der adipogenen Stammzellen

Durch die Differenzierung der adipogenen Stammzellen nach den verschiedenen Differenzierungsprotokollen entwickelten sich charakteristische morphologische Veränderungen, welche in den folgenden Abbildungen dargestellt werden:



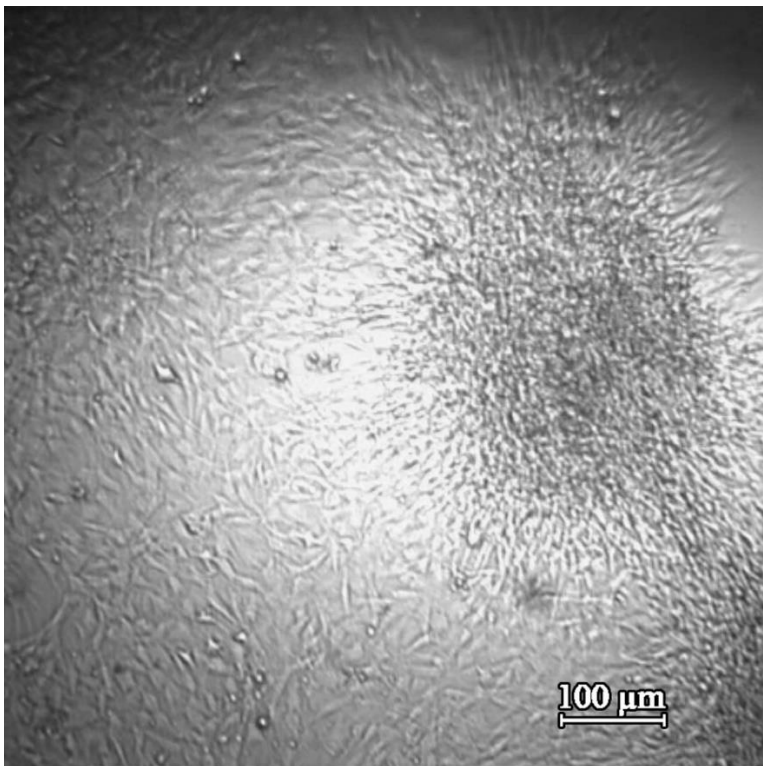
*Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme der adipogenen Stammzellen vor weiterer Differenzierung; Referenzbalken  $\cong 100\ \mu\text{m}$*

Die nach Protokoll 1 differenzierten *Schwann-like-cells* bilden frei-schwimmende, kugelige Zellgruppierungen, sogenannte Neurospheres, aus.



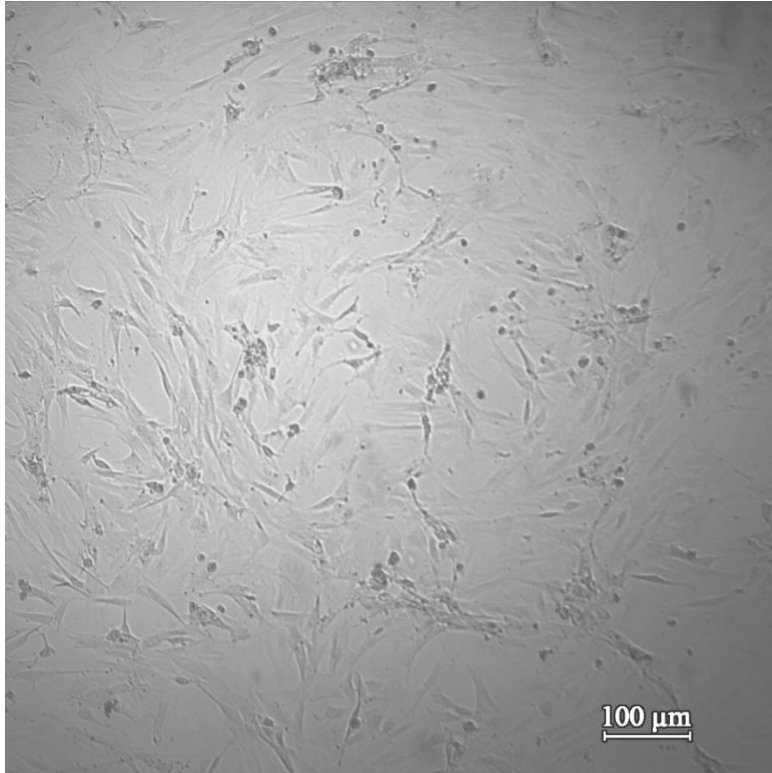
**Abbildung 16:** Lichtmikroskopische Aufnahme der adipogenen Stammzellen nach abgeschlossener Differenzierung mit dem Protokoll 1; Referenzbalken  $\pm 100 \mu\text{m}$

Die nach Protokoll 2 differenzierten *Schwann-like-cells* neigen dazu sich in Zellhaufen anzusiedeln.



**Abbildung 17:** Lichtmikroskopische Aufnahme der adipogenen Stammzellen nach abgeschlossener Differenzierung mit dem Protokoll 2; Referenzbalken  $\pm 100 \mu\text{m}$

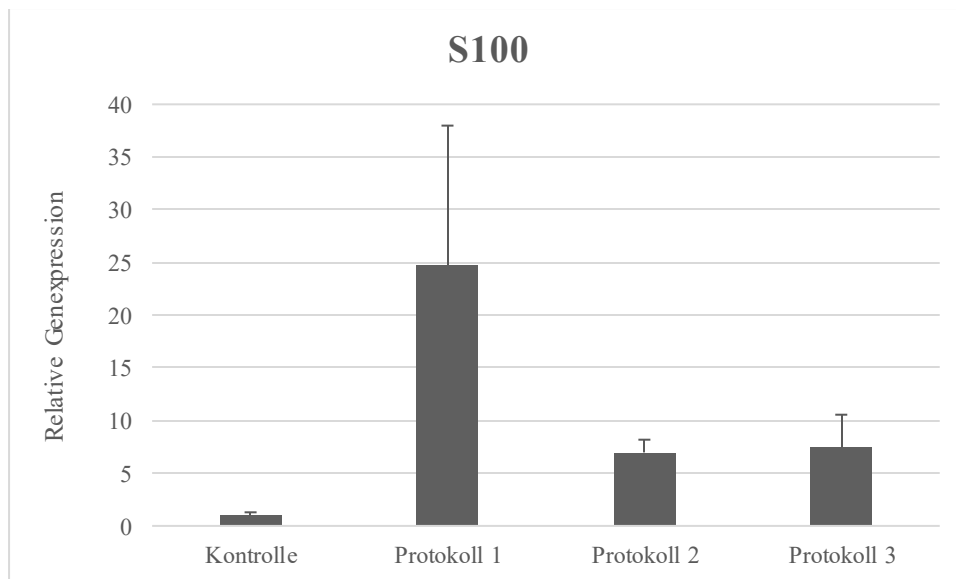
Die nach Protokoll 3 differenzierten *Schwann-like-cells* lassen sich morphologisch lediglich geringfügig von den undifferenzierten adipogenen Stammzellen unterscheiden.



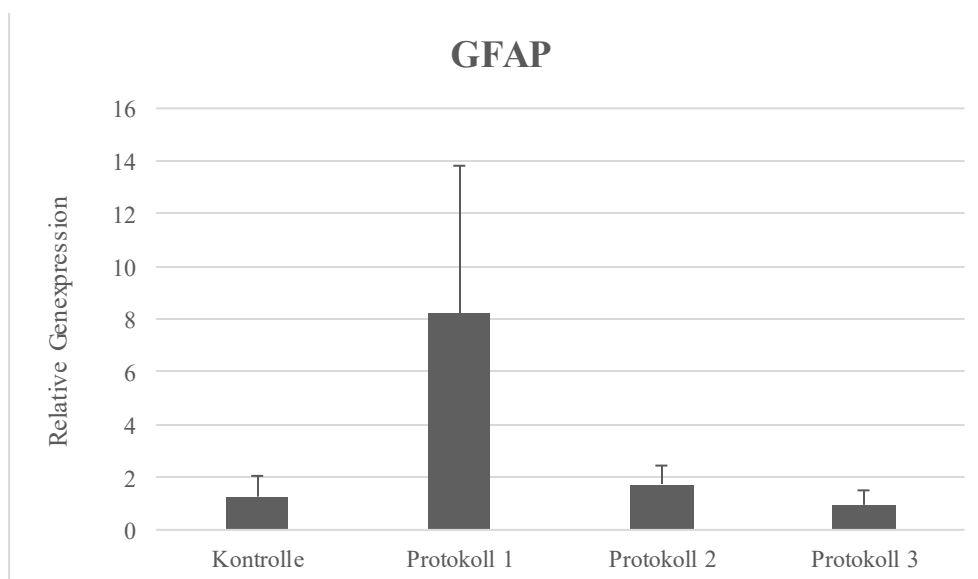
**Abbildung 18:** Lichtmikroskopische Aufnahme der adipogenen Stammzellen nach abgeschlossener Differenzierung mit dem Protokoll 3; Referenzbalken  $\pm 100 \mu\text{m}$

#### **4.2 Q-PCR nach Differenzierung der adipogenen Stammzellen**

Mittels Q-PCR konnte nach Abschluss der Differenzierung mittels im Vorfeld beschriebener Differenzierungsprotokolle die Genexpression der *Schwann-like-cells* quantitativ bestimmt werden, wobei ein besonderes Augenmerk auf die allgemeinen Gliamarker, die Marker der myelinisierenden Schwannzellen und die Neurotrophine gelegt wurde. Zu diesem Zweck wurde die relative Genexpression undifferenzierter adipogener Stammzellen - im Folgenden als Kontrolle bezeichnet - mit der relativen Genexpression nach abgeschlossener Differenzierung verglichen.

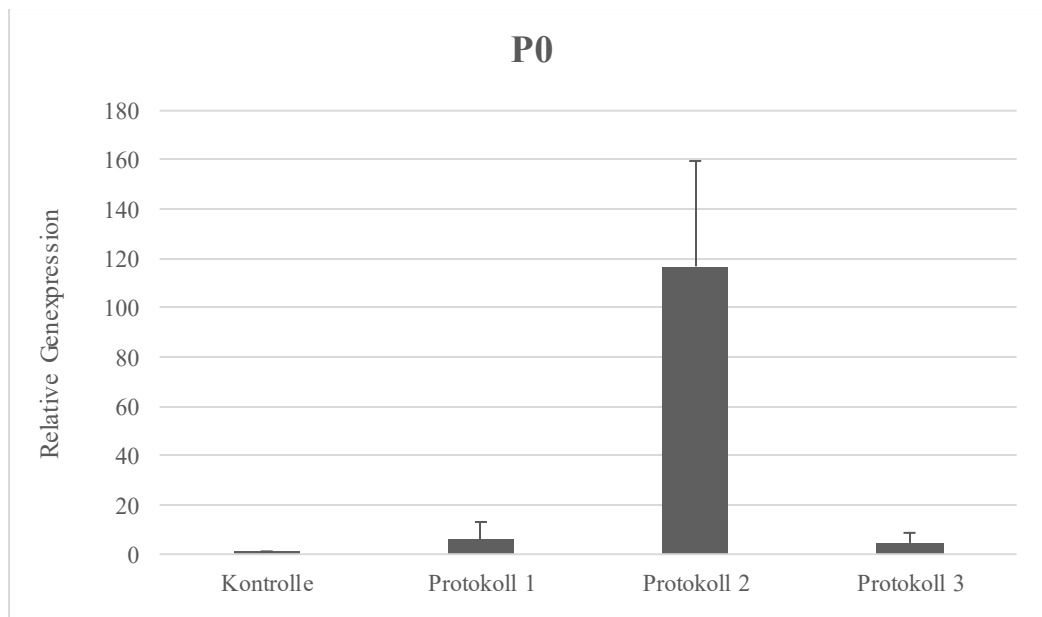


**Abbildung 19:** Relative Expression des allgemeinen Gliamarkers S100 am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

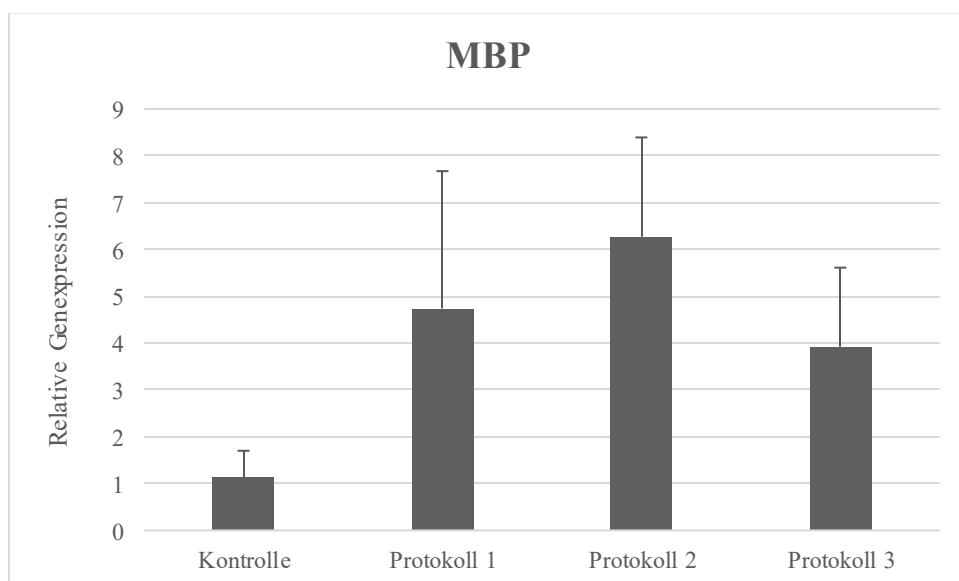


**Abbildung 20:** Relative Expression des allgemeinen Gliamarkers GFAP am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

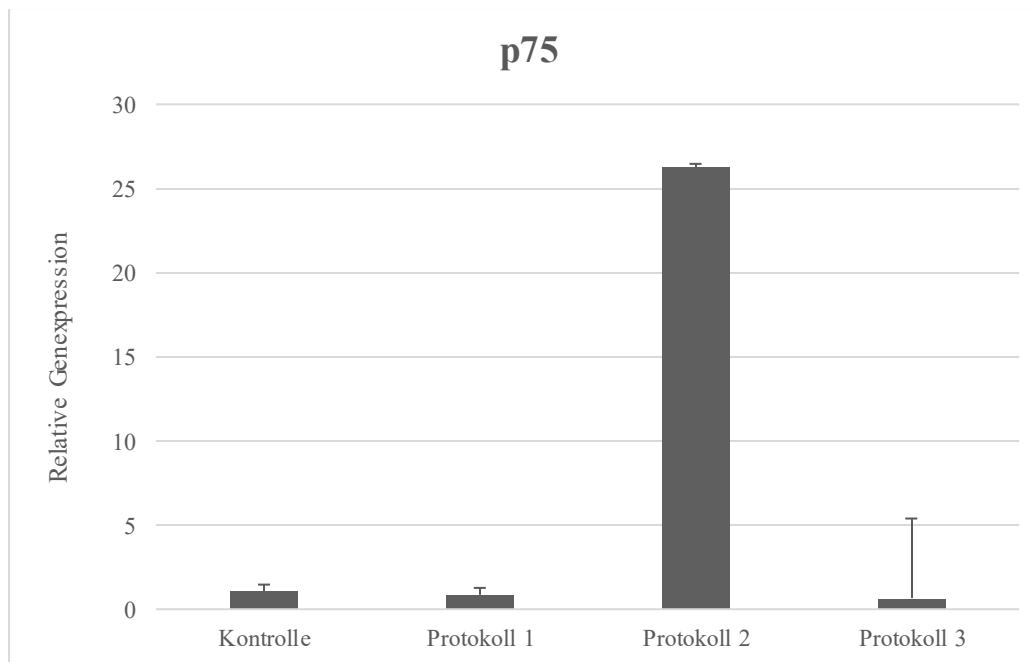
Bei den nach Protokoll 1 differenzierten adipogenen Stammzellen ließ sich eine Hochregulation der allgemeinen Gliamarker S100 und GFAP nachweisen. Dabei war die Expression von S100 auf das 25-fache und von GFAP auf das 8-fache der Kontrolle erhöht.



**Abbildung 21:** Relative Expression des Markers myelinisierender Schwannzellen P0 am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

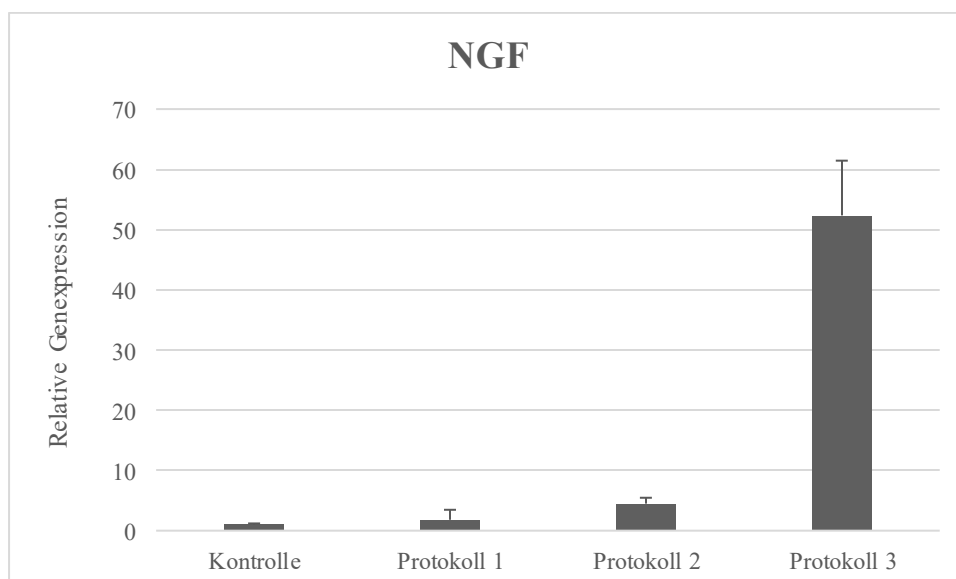


**Abbildung 22:** Relative Expression des Markers myelinisierender Schwannzellen MBP am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

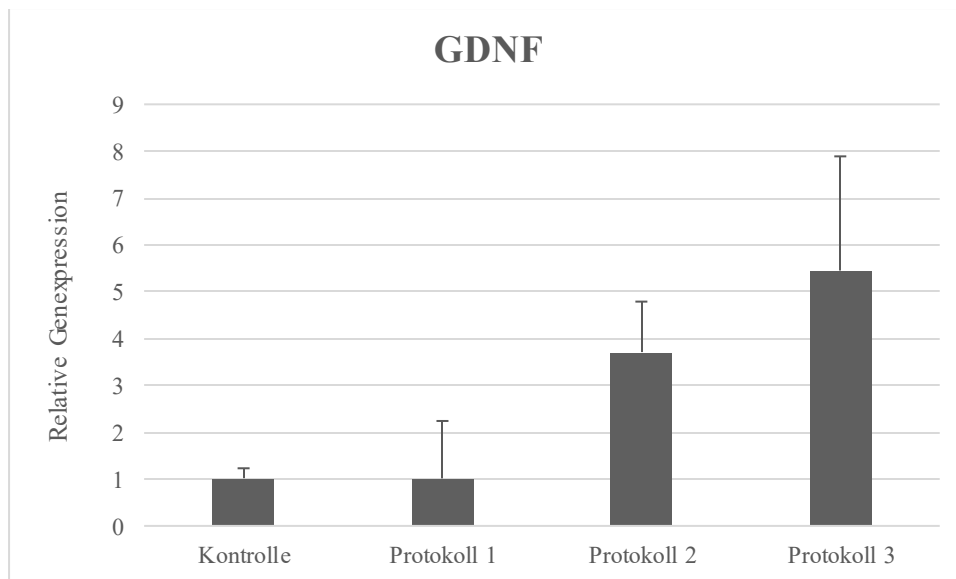


**Abbildung 23:** Relative Expression des Markers myelinisierender Schwannzellen p75 am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

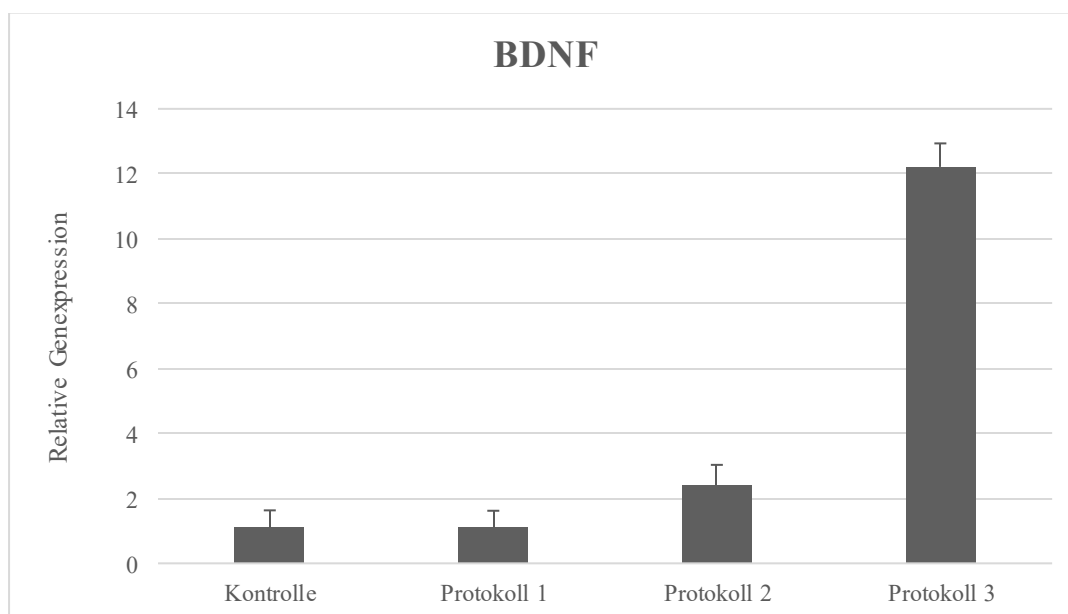
Die Differenzierung der adipogenen Stammzellen nach Protokoll 2 führte zu einer Hochregulation der Marker myelinisierender Schwannzellen P0, MBP und P75. Dabei wurden MBP auf das 1,8-fache, P0 auf das 3,2-fache und P75 auf das 25-fache der Kontrolle hochreguliert. Die nach Protokoll 1 und 3 differenzierten Zellen wiesen in den durchgeführten Versuchen eine geringere Expression von P0 und p75 als die Kontrolle auf.



**Abbildung 24:** Relative Expression des Neurotrophins NGF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen



**Abbildung 25:** Relative Expression des neurotrophen Faktors GDNF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

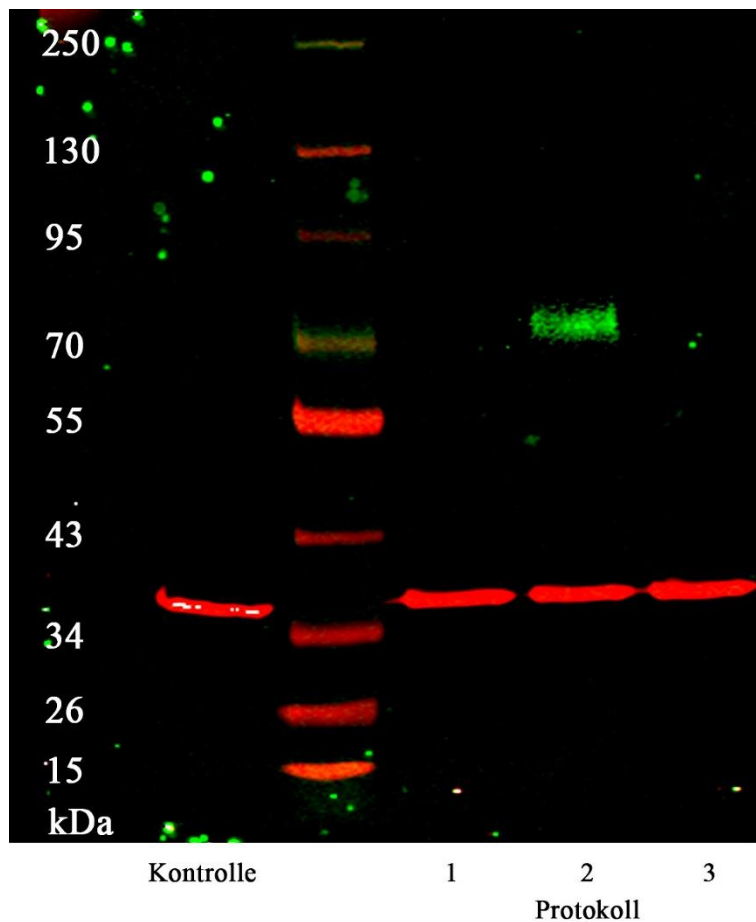


**Abbildung 26:** Relative Expression des Neurotrophins BDNF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

Bei den nach Protokoll 3 differenzierten adipogenen Stammzellen ließ sich eine deutliche Hochregulation der Neurotrophine NGF und BDNF sowie des neurotrophen Faktors GDNF nachweisen. Dabei war die Expression von NGF auf das 52-fache, von BDNF auf das 12-fache und von GDNF auf das 5,5-fach der Kontrolle erhöht. Die Expression des Neurotrophins NGF und des neurotrophen Faktors GDNF war ebenfalls bei den nach Protokoll 2 differenzierten Zellen erhöht. Hier zeigte sich eine Hochregulation von NGF auf das 1,4-fache und von GDNF auf das 5-fache.

### 4.3 Western Blot

Zum Nachweis des Neurotrophinrezeptors p75 als Marker myelinisierender Schwannzellen auf Proteinebene wurde mit den Proteinen, welche aus den nach den beschriebenen Protokollen differenzierten adipogenen Stammzellen isoliert wurden, ein Western Blot durchgeführt.

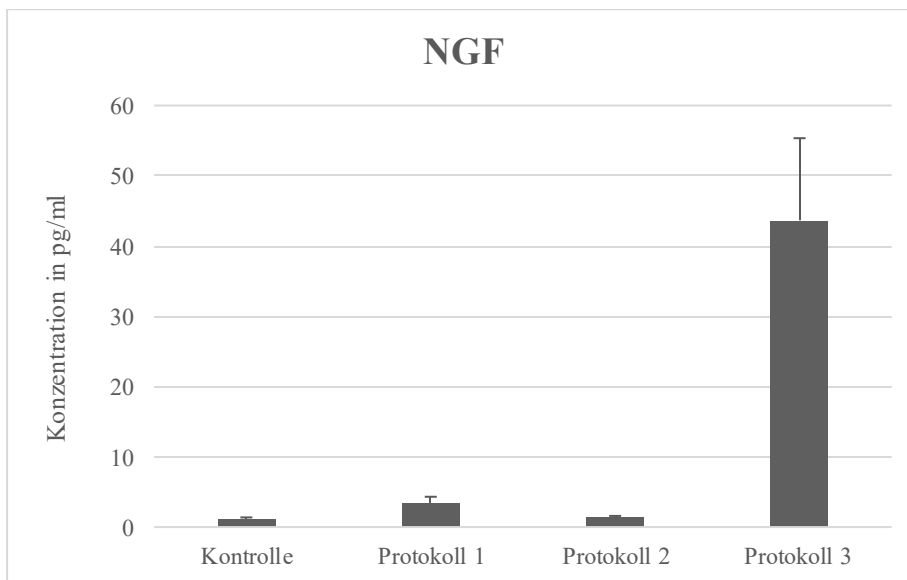


*Abbildung 27: Ergebnis des Western Blots zum Nachweis des Markers myelinisierender Schwannzellen P75 (in Grün dargestellt) am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung; als Ladekontrolle wurde GAPDH (in Rot dargestellt) verwendet*

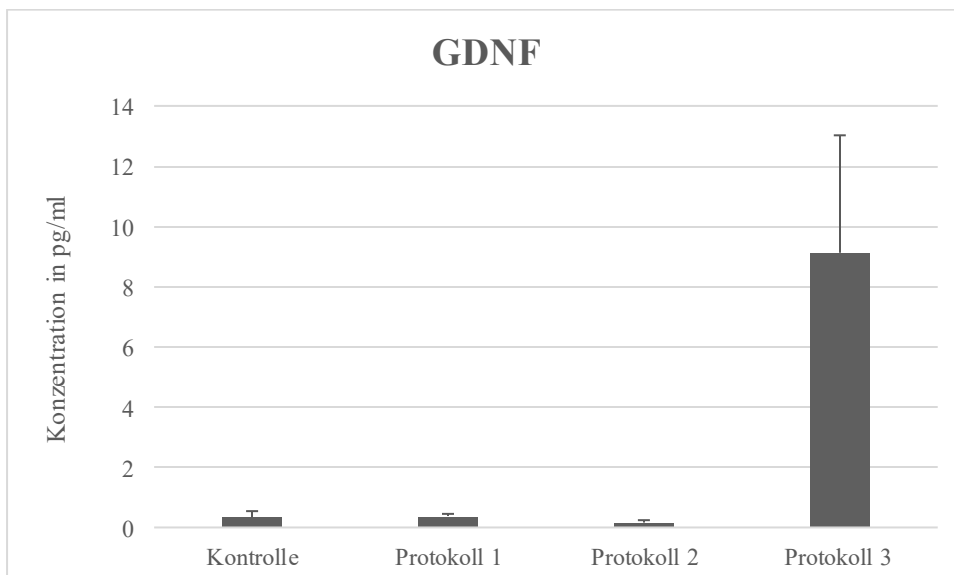
Hierbei ließ sich lediglich bei den nach Protokoll 2 differenzierten adipogenen Stammzellen eine Expression von p75 (in Grün dargestellt) nachweisen. GAPDH (in Rot dargestellt) diente als Ladekontrolle.

#### 4.4 ELISA

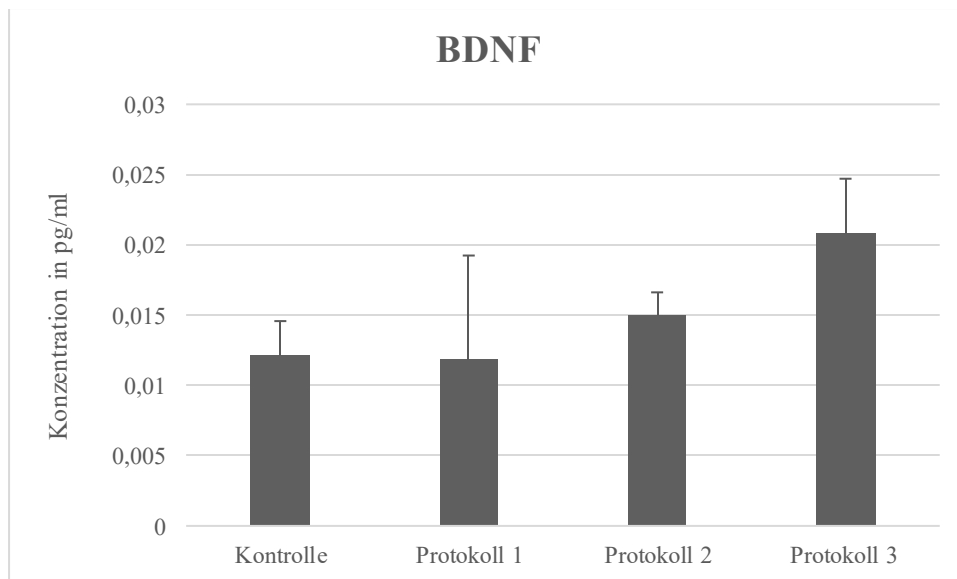
Mittels ELISA ließen sich die Neurotrophine NGF und BDNF und der neurotrope Faktor GDNF in den im Laufe der Differenzierung gesammelten konditionierten Medien detektieren und quantifizieren.



**Abbildung 28:** Konzentration des Neurotrophins NGF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung im ELISA; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen



**Abbildung 29:** Konzentration des neurotrophen Faktors GDNF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung im ELISA; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

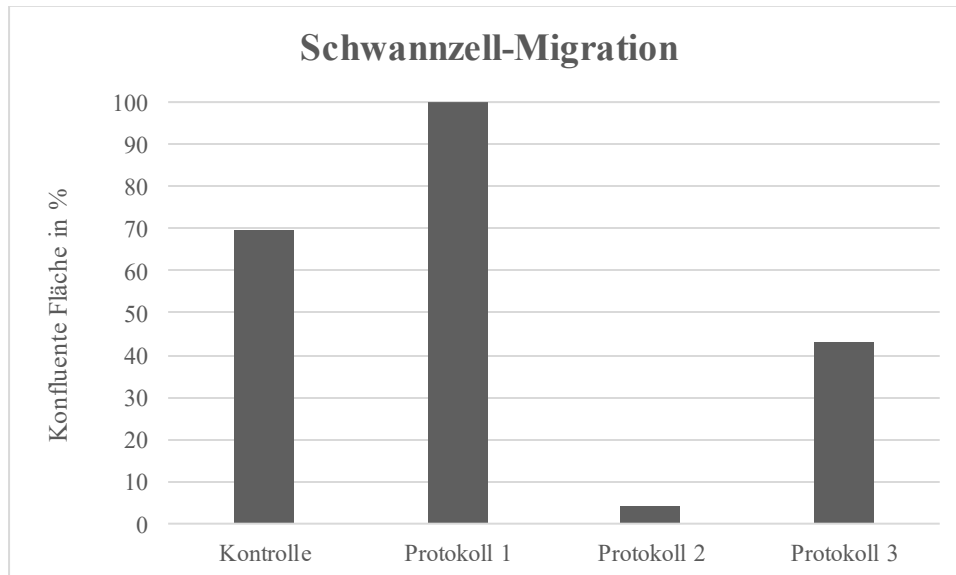


**Abbildung 30:** Konzentration des Neurotrophins BDNF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung im ELISA; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

Im nach Abschluss der Differenzierung gesammelten, konditionierten Medium der nach Protokoll 3 differenzierten adipogenen Stammzellen konnte eine erhöhte Konzentration von NGF, GDNF und BDNF nachgewiesen werden. Dabei war die Konzentration von NGF im Vergleich zur Kontrolle auf das 11,7-fache, von GDNF auf das 7,3-fache und von BDNF auf das 1,8-fache erhöht. Bei den konditionierten Medien der anderen beiden Differenzierungsprotokolle fand sich kein relevanter Anstieg.

## 4.5 Scratch Assay

Der Einfluss der nach abgeschlossener Differenzierung konditionierten Medien bzw. der darin enthaltenen Faktoren auf die Zellmigration von Schwannzellen wurde mittels Scratch Assay untersucht.



**Abbildung 31:** Ergebnisse des Scratch-Assays zur Quantifizierung der Zellmigration von Schwannzellen unter dem Einfluss von konditioniertem und Kontrollmedium; die Ordinate zeigt die Zunahme der Konfluenz der Zellen als Prozentwert im Verhältnis zur anfänglichen Fläche

In der oben dargestellten Tabelle lässt sich erkennen, dass die Fähigkeit der Schwannzellen, in eine bestimmte, zuvor freie Fläche einzuwandern und diese zu besiedeln, welche mit dem konditionierten Medium der nach Protokoll 1 differenzierten adipogenen Stammzellen kultiviert wurden, deutlich höher ist als die derer, welche mit den konditionierten Medien der beiden anderen Protokolle kultiviert wurden. Es ist ebenfalls bemerkenswert, dass die Konfluenz dabei sogar die der mit dem nährstoffreicheren Kontrollmedium kultivierten Schwannzellen übertrifft.

Teile der in diesem Abschnitt gezeigten Ergebnisse wurden bereits publiziert in Klein *et. al.*, Peripheral Nerve Regeneration-Adipose-Tissue-Derived Stem Cells Differentiated by a Three-Step Protocol Promote Neurite Elongation via NGF Secretion, Cells, 2022.

## 5. Diskussion

### 5.1 Adipogene Stammzellen lassen sich zu verschiedenen Schwannzell-Phänotypen differenzieren

Die Wiederherstellung peripherer Nerven nach traumatischer Durchtrennung oder Entfernung von Nervenaxonen mit resultierenden Kontinuitätsdefekten stellt weiterhin eine große Herausforderung in der klinischen Behandlung sowie in der Forschung dar (112). Nur bei einem geringen Prozentsatz der Patienten kommt es nach chirurgischer Rekonstruktion einer peripheren Nervenverletzungen zu einem zufriedenstellenden Heilergebnis ohne irreversible Funktionsausfälle an den Erfolgsorganen (1,2). Als derzeitiger Goldstandard bei der Therapie langstreckiger Nervendefekt wird die Interposition eines autologen Spendernervensegments angesehen (17,27). Da jedoch nur begrenzt autologes Spendernervengewebe zur Transplantation zur Verfügung steht, werden zunehmend Methoden aus dem Feld des „Tissue Engineering“, also des gezielten künstlichen Anzüchtens von autologem Gewebe unter kontrollierten Bedingungen *in vitro*, zur Nervenreparatur verwendet (113). In diesem Prozess spielen insbesondere Schwannzellen eine wichtige Rolle, welche jedoch ebenfalls nur in limitierter Anzahl verfügbar sind und bei deren Entnahme es durch ihre nur schwach ausgeprägte Fähigkeit zur Proliferation zu oft bleibenden Defiziten im Entnahmegebiet kommt (114–116). In den vergangenen Jahren sind deshalb Methoden zur Wiederherstellung von Nerven mittels Stammzellen in den Fokus der Forschung gerückt (117,118). Dabei können verschiedene Arten von Stammzellen unter bestimmten Bedingungen zu Zellen differenziert werden können, die Schwannzellen bis zu einem gewissen Grad morphologisch und funktionell ähneln (119). So wurde bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen, dass mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark besiedelte Nervenkonduite eine positive Auswirkung auf die axonale Regeneration haben (113,120). Dabei sind adipogene Stammzellen von besonderem Interesse, da diese in großer Anzahl mit minimalinvasiven Methoden z.B. durch Liposuktion gewonnen werden können (121). Unter Verwendung adipogener Stammzellen zur Unterstützung der peripheren Nervenregeneration konnten bereits in zahlreichen Studien vielversprechende Ergebnisse nachgewiesen werden (122–124). So besiedelten beispielsweise Zack-Williams *et al.* aus Fibrin bestehende Biokonduits mit adipogenen Stammzellen und transplantierten diese in den 10 mm durchmessenden Defekt des N. ischiadicus von Ratten (125). Zwei Wochen nach der Operation ließ sich nachweisen, dass die Schwannzellen weiter von proximal in die mit den adipogenen Stammzellen besiedelten Konduits migrierten als in

die unbesiedelten Konduits der Kontrollgruppe bei gleichzeitig deutlich besserer axonaler Regeneration, woraus sich ein positiver Effekt der adipogenen Stammzellen auf die Regeneration peripherer Nerven nachweisen lässt (125). Bei peripheren Nervenverletzungen kommt es im Rahmen der Wallerschen Degeneration zur Aktivierung der Schwannzellen mit Herabregulierung myelinisierender Proteine und zugleich Ausschüttung von Neurotrophinen und neurotrogenen Faktoren (126–129). Ursprünglich wurde angenommen, dass diese Dedifferenzierung der Schwannzellen durch die Reversion in eine unreifere Entwicklungsstufe bedingt ist (109). Jedoch weisen aktivierte Schwannzellen größere Gemeinsamkeiten mit embryonalen Stammzellen als mit Neuralleistenzellen auf, wodurch sich die zahlreichen positiven Ergebnisse mit diversen Stammzellen durchgeführter Versuche zur peripheren Nervenregeneration erklären lassen (130,131). Letztlich scheinen jedoch für eine erfolgreiche Nervenregeneration sowohl ein aktivierter Phänotyp mit Sekretion von Neurotrophinen als auch ein myelinisierender Phänotyp erforderlich zu sein. In Bezug auf die periphere Nervenregeneration haben insbesondere die klassischen Neurotrophine NGF und BDNF sowie der neurotrophe Faktor GDNF ein großes Potential zur Verbesserung des posttraumatischen neuronalen Überlebens und der peripheren Nervenregeneration bewiesen (77,121,132–135). Im Rahmen dieser Arbeit wurden adipogene Stammzellen mittels dreier verschiedener Differenzierungsprotokolle differenziert, um die so kultivierten *Schwann-like-cells* im Hinblick auf deren Expressionsprofile von Neurotrophinen, neurotrogenen Faktoren sowie myelinbildenden Proteinen zu untersuchen.

## **5.2 Die nach Protokoll 1 differenzierten Schwann-like-cells ähneln adulten Gliazellen**

Bereits in der Publikation von Xu *et al.*, welches die Basis für Protokoll 1 darstellt, konnten aus Ratten isolierte adipogene Stammzellen durch Applikation von EGF und bFGF zu Neurospheres kultiviert werden, welche sich mittels Tretionin, Heregulin, Forskolin und PDGF zu *Schwann-like-cells* differenzieren ließen, die der Morphologie, dem Phänotyp und den funktionellen Eigenschaften adulter Gliazellen ähnelten (109). Bei den entsprechenden *Schwann-like-cells* konnten auf Proteinebene die allgemeinen Gliamarker S100 und GFAP nachgewiesen werden (109). *In vitro* zeigten sie die Fähigkeit zur Myelinbildung in Kokultur mit PC12-Zellen (Phäochromozytom-Zelllinie bei Ratten) und induzierten das Neuritenwachstum bei SH-SY5Y-Zellen (humane Neuroblastom-Zelllinie) (109).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit nach Protokoll 1 differenzierten adipogenen Stammzellen ließ sich auch auf Genebene eine auf das 6,5-fache erhöhte Expression des allgemeinen

Gliamarkers GFAP nachweisen. Während S100 bei allen untersuchten Protokollen signifikant hochreguliert war, zeigte sich jedoch ebenfalls mit diesem Protokoll die stärkste Expression des betreffenden Gliamarkers mit im Vergleich zur Kontrolle Erhöhung auf das 25-fache. Auch ließen sich morphologisch ausgeprägte Ähnlichkeiten zu adulten Gliazellen, welche dazu neigen sich in dichten Zellgruppierungen ähnlich der Myelinscheide eines Axons anzusiedeln, feststellen. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die entsprechenden *Schwann-like-cells* Ähnlichkeiten zu adulten Gliazellen aufweisen und die Fähigkeit zur Myelinbildung, welche in Kokultur mit PC-12-Zellen beobachtet wurden, besitzen.

Uzunlu *et al.* behandelten in einer aktuellen Publikation im Tierversuch mit Ratten Quetschverletzungen des N. ischiadicus über vier Wochen durch die Applikation autologer, aus dem Knochenmark und den Zahnfollikeln isolierter mesenchymaler Stammzellen, die eine deutlich erhöhte Expression von S100 aufwiesen, und konnten in der Folge eine im Vergleich zur Kontrollgruppe wesentlich verbesserte Erholung der Nervenfunktion nachweisen (136). In diesem Experiment konnten in Übereinstimmung mit ähnlichen vorausgegangenen Publikationen von Marconi *et al.* und Yang *et al.* festgestellt werden, dass eine erhöhte Expression von S100 einen entscheidenden Indikator für eine verbesserte Regeneration der funktionellen motorischen Aktivität nach peripherer Nervenverletzung darstellt (137,138). Berdugo-Vega *et al.* zeigten, dass nach Resektion verschieden langer Segmente des N. laryngeus recurrens von Sprague-Dawley-Ratten mit anschließend unverzüglicher Reparatur des Defektes durch Adaptieren mittels Fibrinkleber eine vermehrte GFAP-Immunreaktivität nachweisen ließ und schlossen daraus, dass GFAP eine wichtige Rolle bei der Regeneration des Defektes zukommen müsse (139).

Insgesamt lassen die eben dargelegten Erkenntnisse vermuten, dass die nach Protokoll 1 differenzierten adipogenen Stammzellen durch ihre Ähnlichkeit zu adulten Gliazellen mit Fähigkeit zum Wiederaufbau der Myelinscheide insbesondere in der Spätphase einen entscheidenden Beitrag zur Regeneration peripherer Nervenverletzung leisten könnten.

### **5.3 Die nach Protokoll 2 differenzierten Schwann-like-cells ähneln myelinisierenden Schwannzellen**

In der Publikation von Felthaus *et al.*, welches die Basis für Protokoll 2 darstellt, konnten aus Zahnfollikeln von Mäusen isolierte mesenchymale Stammzellen durch Applikation von EGF, bFGF, TGF- $\beta$ 1, Tretionin und N2-Supplement kultiviert werden, welche sich zu Schwann-like-

cells differenzieren ließen, die der Morphologie myelinisierender Schwannzellen ähnelten und vermehrt den Marker myelinisierender Schwannzellen GFAP exprimierten (110).

Die im Rahmen dieser Arbeit nach Protokoll 2 differenzierten, aus dem Gewebe von Ratten isolierten, adipogenen Stammzellen wiesen auf Genebene eine erhöhte Expression der Marker myelinisierender Schwannzellen P0, MBP und p75 bei gleichzeitiger Negativität für GFAP auf, wobei bei P0 eine Erhöhung auf das 116-fache, bei MBP auf das 5,5-fache und bei p75 auf das 25-fache der Kontrolle nachweisbar war. Die Expression von MBP war ebenfalls bei den anderen beiden untersuchten Protokollen in geringerem Maße signifikant erhöht. Auch auf Proteinebene ließ sich im Rahmen des durchgeführten Western-Blots eine Expression des Neurotrophinrezeptors p75 nachweisen. Morphologisch ließen sich ausgeprägte Ähnlichkeiten zu myelinisierenden Schwannzellen, die sich in dichten Zellhaufen ähnlich der Myelinscheide eines Axons ansiedeln, feststellen.

Morgan *et al.* zeigten *in vitro* an aus dem N. ischiadicus von Ratten isolierten Schwannzellen, dass die durch die Erhöhung von cAMP induzierte, vermehrte Expression von P0 zu einer gesteigerten Myelinbildung führt (140). MBP ist einer der Hauptbestandteile des reifen Myelins und spaltet als Serinprotease das Zelladhäsionsmolekül L1 (141). Lutz *et al.* wiesen im Tierversuch mit Mäusen nach, dass das dadurch entstandene L1-Fragment sowohl nach Verletzungen auf Ebene des Rückenmarks sowie peripherer Nerven das Neuritenwachstum, die Zellmigration sowie das Überleben, die Myelinisierung und Proliferation von Schwann-Zellen fördert (141). Demnach ist MBP nicht nur ein Grundbaustein des Myelins, sondern stellt ein relevantes Protein der Nervenregeneration dar. Sein Nachweis gibt einen entscheidenden Hinweis auf eine erfolgreiche Differenzierung hin zur myelinisierenden Schwannzelle. Auch Richner *et al.* konnten nachweisen, dass die Expression von MBP und P0 eine entscheidende Bedeutung für die Bildung der Myelinscheide nach erfolgreicher Aussprossung des Axons an sein Ziel hat und somit eine essentielle Rolle in der finalen Phase der Nervenregeneration spielt (56). Chao *et al.* und Majdan *et al.* beobachteten, dass dem Neurotrophinrezeptors p75 insbesondere im Zusammenspiel mit der Rezeptortyrosinkinase Trk eine wichtige Bedeutung für die axonale Regeneration nach einer peripheren Nervenverletzung zukommt (93,142). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die kultivierten *Schwann-like-cells* ausgeprägte Ähnlichkeiten zu den myelinisierenden Schwannzellen eines intakten adulten Nerven aufweisen und womöglich auch deren funktionelle Eigenschaften übernehmen können. Gleichzeitig fand sich bei den betreffenden *Schwann-like-cells* neben den Markern für myelinbildende Schwannzellen eine signifikant erhöhte Genexpression des für den aktivierten Schwannzell-Phänotypen charakteristischen Neurotrophins NGF und des neurotrophen Faktors

GDNF, wobei bei NGF eine Erhöhung auf das 4,5-fache und bei GDNF auf das 3,5-fache der Kontrolle nachweisbar war. Dieses Expressionsmuster der entsprechenden *Schwann-like-cells* spricht für eine große Bandbreite an Qualitäten der differenzierten Zellen, wobei die myelinbildenden Eigenschaften besonders hervorzuheben sind.

Somit lässt sich in Zusammenschau der Ergebnisse vermuten, dass die nach Protokoll 2 differenzierten adipogenen Stammzellen die Regeneration peripherer Nervenverletzungen einerseits in der initialen Phase durch die vermehrte Expression von Neurotrophen und neurotrophen Faktoren, andererseits auch später im Regenerationsprozess durch die Unterstützung der Proliferation der Schwannzellen und den Wiederaufbau der Myelinscheide verbessern könnten.

#### **5.4 Die nach Protokoll 3 differenzierten Schwann-like-cells ähneln aktivierten, nicht myelinisierenden Schwannzellen**

In der Publikation von Kingham *et al.*, welches die Basis für Protokoll 3 darstellt, konnten aus Ratten isolierte adipogene Stammzellen durch Applikation von  $\beta$ -Mercaptoethanol, Tretionin, PDGF, bFGF Forskolin und Heregulin kultiviert werden, welche sich zu *Schwann-like-cells* differenzieren ließen, die auf Proteinebene den allgemeinen Gliamarker S100 sowie die Marker myelinisierender Schwannzellen P0 und p75 aufwiesen (111). *In vitro* ließ sich in Kokultur mit NG108-15-Zellen (Hybride aus Neuroblastomzellen von Mäusen und Gliomzellen von Ratten) zudem nachweisen, dass eine erhöhte Anzahl an NG108-15-Zellen Neuriten ausbildeten sowie die Anzahl der Neuriten pro Zellen und die mittlere Länge des längsten Neuriten zunahm (111).

Bei den nach im Rahmen dieser Arbeit nach Protokoll 3 differenzierten adipogenen Stammzellen zeigte sich eine erhöhte Genexpression des allgemeinen Gliamarkers S100, der Neurotrophine BDNF und NGF sowie des neurotrophen Faktors GDNF, wobei bei S100 eine Erhöhung auf das 7,5-fache, bei BDNF auf das 12-fache, bei NGF auf das 52-fache und bei GDNF auf das 5,5-fache der Kontrolle nachweisbar war. Eine wie in der ursprünglichen Publikation von Kingham *et al.* beschriebene erhöhte Expression der Marker myelinisierender Schwannzellen P0 und p75 fand sich hingegen nach Differenzierung mit dem modifizierten Protokoll 3 nicht. Des Weiteren konnten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Q-PCRs in den im Rahmen des Differenzierungsprozesses gesammelten konditionierten Medien mithilfe der durchgeführten ELISAs eine deutlich erhöhte Konzentration des Neurotrophins NGF sowie des neurotrophen Faktors GDNF detektiert werden, wobei die Konzentration von

NGF auf das 38-fache und von GDNF auf das 27-fache erhöht war. Die Konzentration des Neurotrophins BDNF war lediglich annähernd auf das doppelte erhöht. Eine Ursache hierfür könnte ein fehlender Stimulus der Nervenzelle sein, durch den das Gen nur in geringeren Mengen translatiert werden konnte. Ein anderer Grund für die geringe Konzentration von BDNF könnte sein, dass die gesuchte antigene Substanz eine nur relativ kurze Halbwertszeit besitzt und so mittels der gewählten Methode nicht adäquat nachgewiesen werden konnte. Auf Grundlage der positiven Ergebnisse für die Ausschüttung von NGF und GDNF sollen in weiteren Arbeiten die optimalen Methoden zum Nachweis von BDNF ermittelt werden. Phänotypisch ähnelten die betreffenden *Schwann-like-cells* eher undifferenzierten adipogenen Stammzellen bzw. dedifferenzierten, aktivierten Schwannzellen. Durch diese Beobachtungen lässt sich vermuten, dass die kultivierten *Schwann-like-cells* ausgeprägte Ähnlichkeiten zu den im Rahmen einer peripheren Nervenverletzung aktivierten, nicht-myelinisierenden Schwannzellen aufweisen und womöglich auch deren funktionelle Eigenschaften übernehmen können. Der aktivierte Schwannzell-Phänotyp tritt in Erscheinung, sobald die Schwannzelle den Kontakt zu ihrem Axon, beispielsweise im Rahmen einer peripheren Nervenverletzung, verliert (143). Die aktivierten Schwannzellen bieten anschließend durch die Sekretion von Neurotrophinen und Zelladhäsionsmolekülen die optimale Umgebung zur Nervenregeneration (143).

NGF ist das erste Neurotrophin, welches entdeckt, ausgiebig untersucht und in ausgedehntem Maße in der Forschung angewendet wurde (144). NGF bindet an der Rezeptortyrosinkinase Trk-A und dem Neurotrophinrezeptor p75 und stößt in der Folge mehrere Signalkaskaden einschließlich dem PI3K/Akt-, MAPK/ERK-, and PKC-Signalweg an (145). Bei der Behandlung peripherer Nervenverletzungen erfüllt NGF folgende wichtige Aufgaben: Es inhibiert die Apoptose und erfüllt eine Schutzfunktion für die betreffenden Neuronen (146). Es stimuliert die Proliferation, Migration und Differenzierung der Schwannzellen (147). Es fördert und leitet das axonale Wachstum in Richtung distales Ende (148). Es induziert die Polarisierung von Makrophagen vom M1- zum M2-Phänotyp und moduliert das Immunsystem (149). Es fördert die Myelinisierung der Nervenfasern (150). Zahlreiche Studien haben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen, dass die kontinuierliche Applikation von NGF am Ort der peripheren Nervenverletzung zu einer maßgeblichen Verbesserung der Reinnervation und funktionellen Erholung des Zielorgans führt (151). Xu *et al.* reicherten ein Chitosan-/Hyaluronsäure-Hydrogel mit 100 ng/ml NGF an und erzielten damit eine kontinuierliche NGF-Freisetzung über 28 Tage *in vitro* (152). Im Folgenden konnte beobachtet werden, dass das so applizierte NGF die Proliferation und Migration von RSC96-Schwannzellen signifikant

verbesserte (152). Zudem ließ sich *in vivo* im Rattenmodell unter Verwendung eines 10 mm durchmessenden Defektes des N. ischiadicus feststellen, dass die NGF-Freisetzung zu einer deutlichen Verbesserung der Gangart und des Muskelgewichts des M. gastrocnemius im Vergleich zu sowohl der mittel autologem Nerveninterponat versorgten als auch der nicht mit NGF behandelten Gruppe zeigte (152). Singh *et al.* verwendeten ein Gefriertrocknungsverfahren, mittels welchem sie 5 µg/ml NGF in Nervenkonduite adsorbierten, und erreichten so *in vitro* eine kontinuierliche NGF-Ausschüttung über zwei Wochen (153). Ihre Ergebnisse im Tiermodell am N. ischiadicus von Ratten legen nahe, dass sich mit dieser Methode eine vergleichbare funktionelle Erholung der motorischen Funktion erzielen lässt wie mit einem autologen Nerveninterponat (153).

In der Vergangenheit wiesen bereits zahlreiche Publikationen nach, dass das Neurotrophin BDNF einen bedeutenden neuroprotektiven Faktor für chronische Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems darstellt (154). BDNF interagiert mit dem Trk-B-Rezeptor sowie dem Low-affinity nerve growth factor receptor p75 an der prä- und postsynaptischen Membran und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der neuronalen Integrität und der synaptischen Plastizität der Nervenzellen sowie der Neurogenese nach stattgehabter Nervenverletzung (155–158). Ohnishi *et al.* injizierte Sprag-Dawley-Ratten nach Quetschverletzung des N. ischiadicus subkutan 20 mg/kg Körpergewicht BDNF über vier Wochen (159). In der Folge ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl eine signifikante funktionelle Verbesserung der Nervenfunktion als auch eine deutliche Zunahme der Anzahl, Dichte und des Durchmessers der myelinisierten Nervenfasern nachweisen (159). Im Jahre 2016 führten Zheng *et al.* ein Experiment durch, bei welchem sie C57BL/6J-Mäuse nach Quetschung des N. ischiadicus mit BDNF und anti-BDNF behandelten mit deutlich besserer funktioneller Erholung in der mit BDNF behandelten Gruppe (160). Basierend auf der mikroskopischen Evaluation sowie den Ergebnissen der durchgeführten Western Blots zeigten sie, dass BDNF durch die signifikante Erhöhung der Expression von cAMP sowie die durch das cAMP response element-binding protein (CREB) und den Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) vermittelte Aktivierung des c-Jun-Signalweges die intrinsische Regenerationskapazität des Neurons befördert (160). Zudem ließ sich beobachten, dass durch die Behandlung mit BDNF die Degeneration des distalen Nervenendes verzögert und somit die Denervation verhindert wird (160).

Der neurotrophe Faktor GDNF konnte erstmals im Jahre 1991 aus Gliazellen von Ratten isoliert werden und wurde prominent durch die Fähigkeit das Überleben und die Differenzierung dopaminerger Neurone durch eine vermehrte Dopaminaufnahme zu befördern (129). Dabei

fungiert GDNF als Homodimer für die Aktivierung des Tyrosinkinase-Rezeptors „Rearranged during Transfection“ (RET) (161). Bereits in mehreren Studien konnten die positiven Effekte von GDNF auf das Überleben und Regeneration insbesondere von Motoneuronen nach peripheren Nervenverletzungen nachgewiesen werden (162–165). Zheng *et al.* behandelten im Rattenmodell den durch die Stromapplikation von 220 V über 3 s geschädigten N. ischiadicus mit einer Kombination aus einem aus autologen Thrombozyten hergestellten Gel und adipogenen Stammzellen, welche durch Transfektion mittels Lentiviren vermehrt den neurotrophen Faktor GDNF ausschütteten (162). Als Resultat ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der motorischen Extremitätenfunktion sowie der axonalen Regeneration feststellen (162). Dabei gilt es jedoch zu beachten, dass eine Überexpression von GDNF auch negative Folgen für die periphere Nervenregeneration haben kann. So wiesen Eggers *et al.* *in vivo* am N. ischiadicus von Ratten nach, dass lokal zu stark erhöhte Konzentrationen von GDNF vermehrt zur Neurinombildung führen (163).

Chen *et al.* gelang es *Schwann-like-cells* aus mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark zu differenzieren, welche ebenfalls die Neurotrophine NGF, BDNF und den neurotrophen Faktor GDNF ausschütteten (166). In *in-vivo*-Versuchen mit Ratten konnten sie feststellen, dass die *Schwann-like-cells* in Zusammenhang mit der erhöhten Neurotrophinausschüttung nachweislich die Nervenregeneration förderten, was sich durch ein verbessertes Gang- und Laufmuster, eine verminderte Muskelatrophie und eine erhöhte Axonanzahl zeigte (166).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die nach Protokoll 3 differenzierten adipogenen Stammzellen für die Regeneration peripherer Nervenverletzungen insbesondere in der initialen Phase durch die vermehrte Expression von Neurotrophenen und neurotrophen Faktoren einen entscheidenden Beitrag leisten könnten.

## **5.5 Die Wachstumsfaktoren im konditionierten Medium haben einen positiven Einfluss auf das Wachstum von Schwannzellen**

Im durchgeführten Scratch-Assay wurden Schwannzellen, welche mit den konditionierten Medien der nach den verschiedenen Protokollen differenzierten adipogenen Stammzellen kultiviert wurden, im Hinblick auf ihre Fähigkeit untersucht, in eine bestimmte, zuvor freie Fläche einzuwandern und diese zu besiedeln.

Bei diesem Experiment zeigte sich, dass die Schwannzellen, welche mit dem konditionierten Medium der nach Protokoll 1 differenzierten adipogenen Stammzellen kultiviert wurden, eine

deutlich höhere Konfluenz aufwies als die Schwannzellen, welche mit dem konditionierten Medium der beiden anderen Protokolle kultiviert wurden. Dabei übertraf die Konfluenz sogar signifikant die Konfluenz der Schwannzellen, welche mit dem unverbrauchten, sehr viel nährstoffreicheren, aus Schwannzell-Wachstumsmedium bestehenden Kontrollmedium kultiviert wurden. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Wachstumsfaktoren, welche von diesen Zellen, die am ehesten adulten Gliazellen mit Expression der allgemeinen Gliamarker S100 und GFAP entsprechen, sezerniert werden, einen deutlich positiven Einfluss auf die Fähigkeit zur Zellmigration und das Wachstum differenzierter Schwannzellen haben. Somit lassen sich diese Ergebnisse auch gut mit den bereits zuvor diskutierten Resultaten aus den *in vitro* mit PC12-Zellen und SH-SY5Y-Zellen durchgeführten Versuchen von Xu *et al.* sowie den *in vivo* im Tierversuch mit Ratten durchgeführten Experimenten von Uzunlu *et al.*, Marconi *et al.*, Yang *et al.*, Berdugo-Vega *et al.* vereinbaren (109,136–139).

Das Wachstum der Schwannzellen, welche mit dem konditionierten Medium der beiden anderen Protokolle kultiviert wurden, zeigte sich auch im Vergleich zum Kontrollmedium mitunter deutlich verlangsamt. In der initialen Phase der Regeneration peripherer Nervenverletzungen kommt es im Rahmen der Aktivierung von Schwannzellen zur vermehrten Expression von Neurotrophen und neurotrophen Faktoren, welche auch mit einer Herabregulation der für die Myelinbildung verantwortlicher Proteine einhergeht (76,167). Dies scheint entscheidend für die Ausbildung der Büngner-Bänder zu sein, welche eine Leitschiene für das aussprossende Axon entlang der Nervenverletzung bis schließlich zur Reinnervation des ursprünglichen Zielorgans darstellen (75). Da die nach Protokoll 2 und 3 differenzierten adipogenen Stammzellen Schwann-like-cells darstellen, die durch Ausschüttung von Neurotrophen und neurotrophen Faktoren funktionell den aktivierten Schwannzellen ähneln, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass so differenzierten Schwann-like-cells in Übereinstimmung mit den physiologisch ablaufenden Prozessen das Wachstum adulter, myelinisierender Schwannzellen womöglich zunächst inhibieren. Des Weiteren könnte hierfür eine Rolle spielen, dass die zuvor kultivierten *Schwann-like-cells* in den betreffenden wells den Medien schon einen Großteil der für das Zellwachstum benötigten Nährstoffe entzogen haben und somit das Wachstum der Schwannzellen durch diesen Mangel an Nährstoffen erheblich behindert wurde.

Die physiologische Regeneration peripherer Nervenverletzung verläuft in verschiedenen Phasen, wobei in jeder Phase ein den spezifischen Anforderungen entsprechendes Milieu herrscht (168). Die Kinetik der Freisetzung der unterschiedlichen Wachstumsfaktoren verläuft jeweils ähnlich einer gaußschen Glockenkurve (168). Dabei werden in der initialen Phase der

Nervenregeneration insgesamt deutlich mehr Wachstumsfaktoren freigesetzt mit in späteren Phasen langsamem Abfall der Konzentrationen (169). Um den physiologischen Prozess der Reparatur peripherer Nervenverletzungen nachahmen zu können, scheint die unkontrollierte Freisetzung von Wachstumsfaktoren nur wenig erfolgversprechend zu sein (169). Zhang *et al.* entwickelten ein mittels Ultraschallwellen beeinflussbares Nervenkonduit, um so gezielt in der initialen Phase nach stattgehabter peripherer Nervenverletzung über zwei Wochen NGF freisetzen zu können (170). Hierbei konnten sie *in vitro* in Versuchen mit PC12-Zellen nachweisen, dass die kontrollierte hochkonzentrierte Freisetzung von NGF in der initialen Regenerationsphase die Differenzierung und das axonale Wachstum der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe mit unkontrollierter NGF-Ausschüttung deutlich verbesserte (170). Auch *in vivo* konnten sie im Rattenmodell unter Verwendung eines 15 mm durchmessenden Defektes des N. ischiadicus zeigen, dass sich die periphere Nervenregeneration, Remyelinisierung und funktionelle Erholung der Muskelfunktion deutlich verbesserten (170). Bereits in der Publikation von Dai *et al.* über das Potenzial adipogener Stammzellen bezüglich der Regeneration peripherer Nerven mittels Zell-besiedelter Nervenkonduite *in vivo* ließen sich die vielversprechendsten Ergebnisse bei der Kombination undifferenzierter adipogener Stammzellen und adulter Schwannzellen nachweisen (100). Die Arbeitsgruppe machte als möglichen zugrundeliegenden Mechanismus die hohe Expressionsrate von NGF in in-vitro-Kokulturen von adipogenen Stammzellen in Kombination mit den myelinisierenden Eigenschaften der Schwannzellen dafür verantwortlich (100). Dies lässt sich mit der Hypothese vereinbaren, dass die neuromodulatorischen parakrinen Effekte adipogener Stammzellen die in-vivo-Regeneration peripherer Nerven unabhängig von einer weiteren Differenzierung zu *Schwann-like-cells* verbessern (111,171). Dennoch ist für die Vervollständigung des Regenerationsprozesses eine erneute Hochregulation der myelinbildenden Proteine zum Wiederaufbau der Myelinscheide für die spätere schnelle Übertragung von Aktionspotentialen notwendig (167,172). Dieser letzte Schritt wurde bisher im Feld der stammzellbasierten Nervenregeneration nur wenig beachtet und *Schwann-like-cells* mit den Phänotypen adulter Gliazellen und myelinisierender Schwannzellen könnten hierfür in Zukunft einen entscheidenden Beitrag leisten.

Letztlich ist zum jetzigen Zeitpunkt noch zu untersuchen, wie sich die idealen Voraussetzungen einschließlich der Konzentrationen, des Applikationszeitpunktes und der Applikationsdauer der verschiedenen Wachstumsfaktoren für die Regeneration peripherer Nervenverletzungen zusammensetzen und es bleibt abzuwarten, welche der zahlreichen unterschiedlichen Applikationsmethoden, seien es z.B. mit Wachstumsfaktoren angereicherte, mittels externer

Mittel manipulierbare Hydrogele oder verschiedenartig differenzierte Schwann-like-cells den meisten Erfolg versprechen.

## 6. Schlussfolgerung

Adipogene Stammzellen besitzen ein vielversprechendes therapeutisches Potenzial im Feld der Nervenregeneration. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die mittels der verschiedenen Protokolle aus adipogenen Stammzellen differenzierten *Schwann-like-cells* sich mitunter erheblich in ihrem Potenzial zur Expression von Neurotrophenen und Markern allgemeiner Gliazellen und myelinisierender Schwannzellen unterscheiden und *in vitro* die Fähigkeit besitzen, Aufgaben adulter Schwannzellen zu übernehmen. Letztlich bleibt ungewiss, welche Eigenschaften aktivierter Schwannzellen, *Schwann-like-cells* oder adipogener Stammzellen im Einzelnen entscheidend für eine zufriedenstellende Nervenregeneration sind. Es lässt sich jedoch vermuten, dass möglicherweise die Sekretion von Neurotrophenen wie NGF durch *Schwann-like-cells* für die initiale Phase der Nervenregeneration entscheidend ist, während die Regeneration der Myelinscheide *Schwann-like-cells* mit den allgemeinen Gliamarkern sowie den Markern myelinisierender Schwannzellen für die Vervollständigung der Nervenregeneration erforderlich macht. Letztlich bleibt anzumerken, dass für gezielte Anwendung stammzellbasierter Verfahren zur Behandlung peripherer Nervenverletzungen ein tieferes Verständnis für die Effekte der verschiedenen Phänotypen der *Schwann-like-cells* erforderlich ist.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

|                       |                                                               |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|
| °C.....               | <i>Grad Celsius</i>                                           |
| µl .....              | <i>Mikroliter</i>                                             |
| µm .....              | <i>Mikrometer</i>                                             |
| ASCs.....             | <i>Adipose tissue derived stem cells</i>                      |
| BDNF.....             | <i>Brain derived neurotrophic factor</i>                      |
| bFGF.....             | <i>Basic fibroblast growth factor</i>                         |
| BSA.....              | <i>Bovine serum albumin</i>                                   |
| cm.....               | <i>Zentimeter</i>                                             |
| CO <sub>2</sub> ..... | <i>Kohlenstoffdioxid</i>                                      |
| CREB.....             | <i>cAMP response element-binding protein</i>                  |
| DMEM .....            | <i>Dulbecco's Eagles Medium</i>                               |
| DMEM/F12 .....        | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i> |
| DMSO .....            | <i>Dimethylsulfoxid</i>                                       |
| DNA.....              | <i>Desoxyribonukleinsäure</i>                                 |
| EGF .....             | <i>Epidermal growth factor</i>                                |
| ELISA.....            | <i>Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay</i>                     |
| FBS.....              | <i>Fetal Bovine Serum</i>                                     |
| GAPDH.....            | <i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>               |
| GDNF.....             | <i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>            |
| GFAP.....             | <i>Glial fibrillary acidic protein</i>                        |
| kDa.....              | <i>Kilodalton</i>                                             |
| LIF.....              | <i>Leukaemia inhibitory factor</i>                            |
| M.....                | <i>Mol</i>                                                    |
| MAG.....              | <i>Myelin associated glycoprotein</i>                         |
| MBP .....             | <i>Myelin basic protein</i>                                   |
| MCP-1 .....           | <i>Macrophage chemoattractant protein-1</i>                   |
| mDFPCs.....           | <i>Murine dental follicle precursor cells</i>                 |
| mg.....               | <i>Milligramm</i>                                             |
| MHC.....              | <i>Major histocompatibility complex</i>                       |
| min.....              | <i>Minuten</i>                                                |
| ml.....               | <i>Milliliter</i>                                             |

|                     |                                                    |
|---------------------|----------------------------------------------------|
| mm.....             | Millimeter                                         |
| mRNA .....          | Messenger RNA                                      |
| NCAM.....           | Neural cell adhesion molecule                      |
| ng.....             | Nanogramm                                          |
| NGF.....            | Nerv growth factor                                 |
| nm.....             | Nanometer                                          |
| NT-3 .....          | Neurotrophin-3                                     |
| NT-4/5 .....        | Neurotrophin-4/5                                   |
| NTC .....           | No-Template-Control                                |
| P0.....             | Myelin protein zero                                |
| p75.....            | p75 low affinity neurotrophin receptor             |
| PBS.....            | Phosphate Buffered Saline                          |
| PCR .....           | Polymerase chain reaction                          |
| PDGF.....           | Platelet-derived growth factor                     |
| pg.....             | Pikogramm                                          |
| PGA.....            | Polyglycolsäure                                    |
| pH.....             | potencia Hydrogenii                                |
| PLA .....           | Polylacidsäure                                     |
| PLGA .....          | Polylactid-co-glycolsäure                          |
| rcf .....           | relative centrifugal force                         |
| RET .....           | Rearranged during Transfection                     |
| RNA .....           | Ribonucleinsäure                                   |
| rpm .....           | revolutions per minute                             |
| SCGC .....          | Schwanncell Growth Supplement                      |
| SDS.....            | Sodium dodecyl sulfat                              |
| STAT3 .....         | Signal transducer and activator of transcription 3 |
| SVF.....            | Stromal-vaskuläre Fraktion                         |
| TGF .....           | Transforming growth factor                         |
| TNF $\alpha$ .....  | Tumor necrosis factor $\alpha$                     |
| Trk .....           | Tropomyosin receptor kinase                        |
| V.....              | Volt                                               |
| VEGF-A.....         | Vascular endothelial growth factor A               |
| $\alpha$ -MEM ..... | $\alpha$ -Minimum Essential Medium Eagle           |
| $\mu$ M.....        | Mikromol                                           |

## 8. Literaturverzeichnis

1. Novak CB, Anastakis DJ, Beaton DE, Katz J. Patient-Reported Outcome After Peripheral Nerve Injury. *J Hand Surg.* Februar 2009;34(2):281–7.
2. Stonner MM, Mackinnon SE, Kaskutas V. Predictors of functional outcome after peripheral nerve injury and compression. *J Hand Ther.* Juli 2021;34(3):369–75.
3. Ryzenman JM, Pensak ML, Tew JM. Facial paralysis and surgical rehabilitation: a quality of life analysis in a cohort of 1,595 patients after acoustic neuroma surgery. *Otol Neurotol Off Publ Am Otol Soc Am Neurotol Soc Eur Acad Otol Neurotol.* Mai 2005;26(3):516–21; discussion 521.
4. Chemnitz A, Dahlin LB, Carlsson IK. Consequences and adaptation in daily life – patients’ experiences three decades after a nerve injury sustained in adolescence. *BMC Musculoskelet Disord.* Dezember 2013;14(1):252.
5. McAllister RM, Gilbert SE, Calder JS, Smith PJ. The epidemiology and management of upper limb peripheral nerve injuries in modern practice. *J Hand Surg Edinb Scotl.* Februar 1996;21(1):4–13.
6. Jaquet JB, Luijsterburg AJ, Kalmijn S, Kuypers PD, Hofman A, Hovius SE. Median, ulnar, and combined median-ulnar nerve injuries: functional outcome and return to productivity. *J Trauma.* Oktober 2001;51(4):687–92.
7. Prometheus. Kopf, Hals und Neuroanatomie: ... 115 Tabellen. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart New York: Thieme; 2009. 541 S.
8. Rasband MN, Peles E. The Nodes of Ranvier: Molecular Assembly and Maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9. September 2015;8(3):a020495.
9. Hartline DK. What is myelin? *Neuron Glia Biol.* Mai 2008;4(2):153–63.
10. Grinsell D, Keating CP. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *BioMed Res Int.* 2014;2014:1–13.
11. Siemionow M, Brzezicki G. Chapter 8 Current Techniques and Concepts in Peripheral Nerve Repair. In: *International Review of Neurobiology* [Internet]. Elsevier; 2009 [zitiert 8. Januar 2023]. S. 141–72. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074774209870086>
12. Bittner GD, Schallert T, Peduzzi JD. Degeneration, Trophic Interactions, and Repair of Severed Axons: A Reconsideration of Some Common Assumptions. *The Neuroscientist.* 1. April 2000;6(2):88–109.
13. Menorca RMG, Fussell TS, Elfar JC. Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin.* August 2013;29(3):317–30.
14. Schwartz LM. Atrophy and programmed cell death of skeletal muscle. *Cell Death Differ.* Juli 2008;15(7):1163–9.

15. Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, Deal DN. Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am.* 4. Dezember 2013;95(23):2144–51.
16. Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol.* Oktober 1989;18(5):671–83.
17. Pfister BJ, Gordon T, Loverde JR, Kochar AS, Mackinnon SE, Cullen DK. Biomedical engineering strategies for peripheral nerve repair: surgical applications, state of the art, and future challenges. *Crit Rev Biomed Eng.* 2011;39(2):81–124.
18. Lee SK, Wolfe SW. Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000;8(4):243–52.
19. Pan YA, Misgeld T, Lichtman JW, Sanes JR. Effects of neurotoxic and neuroprotective agents on peripheral nerve regeneration assayed by time-lapse imaging in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 10. Dezember 2003;23(36):11479–88.
20. Li N, Downey JE, Bar-Shir A, Gilad AA, Walczak P, Kim H, u. a. Optogenetic-guided cortical plasticity after nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 24. Mai 2011;108(21):8838–43.
21. Karl A, Birbaumer N, Lutzenberger W, Cohen LG, Flor H. Reorganization of motor and somatosensory cortex in upper extremity amputees with phantom limb pain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 15. Mai 2001;21(10):3609–18.
22. Seckel BR. Enhancement of peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve.* September 1990;13(9):785–800.
23. Maeda T, Hori S, Sasaki S, Maruo S. Effects of tension at the site of coaptation on recovery of sciatic nerve function after neurorrhaphy: evaluation by walking-track measurement, electrophysiology, histomorphometry, and electron probe X-ray microanalysis. *Microsurgery.* 1999;19(4):200–7.
24. Hentz VR, Rosen JM, Xiao SJ, McGill KC, Abraham G. The nerve gap dilemma: a comparison of nerves repaired end to end under tension with nerve grafts in a primate model. *J Hand Surg.* Mai 1993;18(3):417–25.
25. Lundborg G. A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg.* Mai 2000;25(3):391–414.
26. Lundborg G. Nerve regeneration and repair. A review. *Acta Orthop Scand.* April 1987;58(2):145–69.
27. Mackinnon SE. Surgical management of the peripheral nerve gap. *Clin Plast Surg.* Juli 1989;16(3):587–603.
28. Sedden H. Surgical disorders of the peripheral nerves. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1972. 332 S.
29. Smith PJ. Nerve Injuries and their Repair—A Critical Appraisal Sir Sydney Sunderland. 560 pages, 158 illustrations. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1991. ISBN 0–443–04161–X. Price £79.50. *J Hand Surg.* 1. Februar 1992;17(1):120–1.

30. Colen KL, Choi M, Chiu DTW. Nerve grafts and conduits. *Plast Reconstr Surg.* Dezember 2009;124(6 Suppl):e386–94.
31. Terzis JK, Skoulis TG, Soucacos PN. Vascularized nerve grafts. A review. *Int Angiol J Int Union Angiol.* September 1995;14(3):264–77.
32. Lubiatowski P, Unsal FM, Nair D, Ozer K, Siemionow M. The epineural sleeve technique for nerve graft reconstruction enhances nerve recovery. *Microsurgery.* 2008;28(3):160–7.
33. Moore AM, Ray WZ, Chenard KE, Tung T, Mackinnon SE. Nerve allotransplantation as it pertains to composite tissue transplantation. *Hand N Y N.* September 2009;4(3):239–44.
34. Taras JS, Jacoby SM, Lincoski CJ. Reconstruction of Digital Nerves With Collagen Conduits. *J Hand Surg.* September 2011;36(9):1441–6.
35. Frerichs O, Fansa H, Schicht C, Wolf G, Schneider W, Keilhoff G. Reconstruction of peripheral nerves using acellular nerve grafts with implanted cultured Schwann cells. *Microsurgery.* 2002;22(7):311–5.
36. Hiles RW. Freeze dried irradiated nerve homograft: a preliminary report. *The Hand.* Februar 1972;4(1):79–84.
37. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction. *Brain Res.* 8. Juni 1998;795(1–2):44–54.
38. Karabekmez FE, Duymaz A, Moran SL. Early clinical outcomes with the use of decellularized nerve allograft for repair of sensory defects within the hand. *Hand N Y N.* September 2009;4(3):245–9.
39. Chiu DT, Strauch B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plast Reconstr Surg.* November 1990;86(5):928–34.
40. Risitano G, Cavallaro G, Merrino T, Coppolino S, Ruggeri F. Clinical results and thoughts on sensory nerve repair by autologous vein graft in emergency hand reconstruction. *Chir Main.* Mai 2002;21(3):194–7.
41. Walton RL, Brown RE, Matory WE, Borah GL, Dolph JL. Autogenous vein graft repair of digital nerve defects in the finger: a retrospective clinical study. *Plast Reconstr Surg.* Dezember 1989;84(6):944–9; discussion 950–952.
42. Schmidt CE, Leach JB. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annu Rev Biomed Eng.* August 2003;5(1):293–347.
43. Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Orthop Clin North Am.* Juli 2000;31(3):485–98.
44. Konofaos P, Ver Halen JP. Nerve repair by means of tubulization: past, present, future. *J Reconstr Microsurg.* März 2013;29(3):149–64.

45. Midgley RD, Woolhouse FM. Silicone rubber sheathing as an adjunct to neural anastomosis. *Surg Forum*. 1968;19:519–20.
46. Ducker TB, Hayes GJ. Experimental improvements in the use of Silastic cuff for peripheral nerve repair. *J Neurosurg*. Juni 1968;28(6):582–7.
47. Molander H, Olsson Y, Engkvist O, Bowald S, Eriksson I. Regeneration of peripheral nerve through a polyglactin tube. *Muscle Nerve*. Januar 1982;5(1):54–7.
48. Nyilas E, Chiu TH, Sidman RL, Henry EW, Brushart TM, Dikkes P, u. a. Peripheral nerve repair with bioresorbable prosthesis. *Trans - Am Soc Artif Intern Organs*. 1983;29:307–13.
49. Jessen KR. Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol*. Oktober 2004;36(10):1861–7.
50. Snaidero N, Simons M. Myelination at a glance. *J Cell Sci*. 15. Juli 2014;127(Pt 14):2999–3004.
51. Salzer JL, Zalc B. Myelination. *Curr Biol CB*. 24. Oktober 2016;26(20):R971–5.
52. Harty BL, Monk KR. Unwrapping the unappreciated: recent progress in Remak Schwann cell biology. *Curr Opin Neurobiol*. Dezember 2017;47:131–7.
53. Griffin JW, Thompson WJ. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia*. 1. November 2008;56(14):1518–31.
54. Bhatheja K, Field J. Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(12):1995–9.
55. Davies AM. Neuronal survival: early dependence on Schwann cells. *Curr Biol CB*. 1. Januar 1998;8(1):R15–18.
56. Richner M, Ulrichsen M, Elmegaard SL, Dieu R, Pallesen LT, Vaegter CB. Peripheral nerve injury modulates neurotrophin signaling in the peripheral and central nervous system. *Mol Neurobiol*. Dezember 2014;50(3):945–70.
57. Balakrishnan A, Belfiore L, Chu TH, Fleming T, Midha R, Biernaskie J, u. a. Insights Into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair From Studies of Development and Injury. *Front Mol Neurosci*. 25. Januar 2021;13:608442.
58. Nocera G, Jacob C. Mechanisms of Schwann cell plasticity involved in peripheral nerve repair after injury. *Cell Mol Life Sci CMLS*. Oktober 2020;77(20):3977–89.
59. Stassart RM, Woodhoo A. Axo-glial interaction in the injured PNS. *Dev Neurobiol*. Juli 2021;81(5):490–506.
60. Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*. 30. August 2011;8:110.
61. Nikolaeva MA, Mukherjee B, Stys PK. Na<sup>+</sup>-dependent sources of intra-axonal Ca<sup>2+</sup> release in rat optic nerve during in vitro chemical ischemia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 26. Oktober 2005;25(43):9960–7.

62. Brosius Lutz A, Chung WS, Sloan SA, Carson GA, Zhou L, Lovelett E, u. a. Schwann cells use TAM receptor-mediated phagocytosis in addition to autophagy to clear myelin in a mouse model of nerve injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19. September 2017;114(38):E8072–80.
63. Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, Wingfield Digby P, Fedorova M, Parkinson DB, u. a. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell*. 1. Oktober 2010;143(1):145–55.
64. Roberts SL, Dun XP, Doddrell RDS, Mindos T, Drake LK, Onaitis MW, u. a. Sox2 expression in Schwann cells inhibits myelination in vivo and induces influx of macrophages to the nerve. *Dev Camb Engl*. 1. September 2017;144(17):3114–25.
65. Jessen KR, Mirsky R. Schwann Cell Precursors; Multipotent Glial Cells in Embryonic Nerves. *Front Mol Neurosci*. 2019;12:69.
66. Jessen KR, Mirsky R. The Success and Failure of the Schwann Cell Response to Nerve Injury. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:33.
67. Jessen KR, Mirsky R. Negative regulation of myelination: Relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia*. November 2008;56(14):1552–65.
68. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*. September 2005;6(9):671–82.
69. Buchstaller J, Sommer L, Bodmer M, Hoffmann R, Suter U, Mantei N. Efficient isolation and gene expression profiling of small numbers of neural crest stem cells and developing Schwann cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 10. März 2004;24(10):2357–65.
70. D’Antonio M, Michalovich D, Paterson M, Droggiti A, Woodhoo A, Mirsky R, u. a. Gene profiling and bioinformatic analysis of Schwann cell embryonic development and myelination. *Glia*. 1. April 2006;53(5):501–15.
71. Leblanc SE, Srinivasan R, Ferri C, Mager GM, Gillian-Daniel AL, Wrabetz L, u. a. Regulation of cholesterol/lipid biosynthetic genes by Egr2/Krox20 during peripheral nerve myelination. *J Neurochem*. Mai 2005;93(3):737–48.
72. Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J. EGR2 mutations in inherited neuropathies dominant-negatively inhibit myelin gene expression. *Neuron*. Mai 2001;30(2):355–68.
73. Verheijen MHG, Chrast R, Burrola P, Lemke G. Local regulation of fat metabolism in peripheral nerves. *Genes Dev*. 1. Oktober 2003;17(19):2450–64.
74. Shy ME, Shi Y, Wrabetz L, Kamholz J, Scherer SS. Axon-Schwann cell interactions regulate the expression of c-jun in Schwann cells. *J Neurosci Res*. 1. März 1996;43(5):511–25.
75. Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30:209–33.

76. Jessen KR, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol.* 1. Juli 2016;594(13):3521–31.
77. Boyd JG, Gordon T. Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *Mol Neurobiol.* Juni 2003;27(3):277–324.
78. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst JPNS.* März 2002;7(1):13–27.
79. Subang MC, Richardson PM. Influence of injury and cytokines on synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA in peripheral nervous tissue. *Eur J Neurosci.* Februar 2001;13(3):521–8.
80. Reid AJ, Sun M, Wiberg M, Downes S, Terenghi G, Kingham PJ. Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis. *Neuroscience.* Dezember 2011;199:515–22.
81. Arthur-Farraj P, Wanek K, Hantke J, Davis CM, Jayakar A, Parkinson DB, u. a. Mouse schwann cells need both NRG1 and cyclic AMP to myelinate. *Glia.* Mai 2011;59(5):720–33.
82. Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, Mackenzie FE, Hoving JJA, Garcia Calavia N, u. a. Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell.* 27. August 2015;162(5):1127–39.
83. Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, Fazal SV, Benito C, Wagstaff LJ, u. a. After Nerve Injury, Lineage Tracing Shows That Myelin and Remak Schwann Cells Elongate Extensively and Branch to Form Repair Schwann Cells, Which Shorten Radically on Remyelination. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 13. September 2017;37(37):9086–99.
84. Dadon-Nachum M, Sadan O, Srugo I, Melamed E, Offen D. Differentiated mesenchymal stem cells for sciatic nerve injury. *Stem Cell Rev Rep.* September 2011;7(3):664–71.
85. Hall S. Nerve repair: a neurobiologist's view. *J Hand Surg Edinb Scotl.* April 2001;26(2):129–36.
86. Hems TE, Glasby MA. The limit of graft length in the experimental use of muscle grafts for nerve repair. *J Hand Surg Edinb Scotl.* April 1993;18(2):165–70.
87. Li H, Terenghi G, Hall SM. Effects of delayed re-innervation on the expression of c-erbB receptors by chronically denervated rat Schwann cells in vivo. *Glia.* August 1997;20(4):333–47.
88. Johnson EO, Charchanti A, Soucacos PN. Nerve repair: experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. *Injury.* September 2008;39 Suppl 3:S37–42.

89. Daly W, Yao L, Zeugolis D, Windebank A, Pandit A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *J R Soc Interface*. 7. Februar 2012;9(67):202–21.
90. Funakoshi H, Frisé J, Barbany G, Timmusk T, Zachrisson O, Verge VM, u. a. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol*. Oktober 1993;123(2):455–65.
91. Taniuchi M, Clark HB, Johnson EM. Induction of nerve growth factor receptor in Schwann cells after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Juni 1986;83(11):4094–8.
92. Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde YA. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature*. 24. Dezember 1992;360(6406):757–9.
93. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. April 2003;4(4):299–309.
94. Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, Lin LF, Li L, Lo AC, u. a. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature*. 26. Januar 1995;373(6512):344–6.
95. Höke A, Ho T, Crawford TO, LeBel C, Hilt D, Griffin JW. Glial cell line-derived neurotrophic factor alters axon schwann cell units and promotes myelination in unmyelinated nerve fibers. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 15. Januar 2003;23(2):561–7.
96. Levi AD, Guénard V, Aebischer P, Bunge RP. The functional characteristics of Schwann cells cultured from human peripheral nerve after transplantation into a gap within the rat sciatic nerve. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. März 1994;14(3 Pt 1):1309–19.
97. Rodríguez FJ, Verdú E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol*. Februar 2000;161(2):571–84.
98. Wakao S, Hayashi T, Kitada M, Kohama M, Matsue D, Teramoto N, u. a. Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. Juni 2010;223(2):537–47.
99. Gersey ZC, Burks SS, Anderson KD, Dididze M, Khan A, Dietrich WD, u. a. First human experience with autologous Schwann cells to supplement sciatic nerve repair: report of 2 cases with long-term follow-up. *Neurosurg Focus*. März 2017;42(3):E2.
100. Dai LG, Huang GS, Hsu SH. Sciatic Nerve Regeneration by Cocultured Schwann Cells and Stem Cells on Microporous Nerve Conduits. *Cell Transplant*. November 2013;22(11):2029–39.
101. Hood B, Levene HB, Levi AD. Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects. *Neurosurg Focus*. Februar 2009;26(2):E4.
102. Painter MW, Brosius Lutz A, Cheng YC, Latremoliere A, Duong K, Miller CM, u. a. Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron*. 16. Juli 2014;83(2):331–43.

103. Weiss T, Taschner-Mandl S, Bileck A, Slany A, Kromp F, Rifatbegovic F, u. a. Proteomics and transcriptomics of peripheral nerve tissue and cells unravel new aspects of the human Schwann cell repair phenotype. *Glia*. Dezember 2016;64(12):2133–53.
104. Monje PV, Sant D, Wang G. Phenotypic and Functional Characteristics of Human Schwann Cells as Revealed by Cell-Based Assays and RNA-SEQ. *Mol Neurobiol*. August 2018;55(8):6637–60.
105. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. April 2006;24(4):150–4.
106. Schreml S, Babilas P, Fruth S, Orsó E, Schmitz G, Mueller MB, u. a. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy*. 2009;11(7):947–57.
107. Huang L, Burd A. An update review of stem cell applications in burns and wound care. *Indian J Plast Surg Off Publ Assoc Plast Surg India*. Mai 2012;45(2):229–36.
108. Orbay H, Uysal AC, Hyakusoku H, Mizuno H. Differentiated and undifferentiated adipose-derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS*. Mai 2012;65(5):657–64.
109. Xu Y, Liu Z, Liu L, Zhao C, Xiong F, Zhou C, u. a. Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells in vitro. *BMC Neurosci*. Dezember 2008;9(1):21.
110. Felthaus O, Ernst W, Driemel O, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C. TGF-beta stimulates glial-like differentiation in murine dental follicle precursor cells (mDFPCs). *Neurosci Lett*. 8. März 2010;471(3):179–84.
111. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol*. Oktober 2007;207(2):267–74.
112. Lienemann S, Zötterman J, Farnebo S, Tybrandt K. Stretchable gold nanowire-based cuff electrodes for low-voltage peripheral nerve stimulation. *J Neural Eng*. 25. Mai 2021;18(4).
113. Urrutia DN, Caviedes P, Mardones R, Minguell JJ, Vega-Letter AM, Jofre CM. Comparative study of the neural differentiation capacity of mesenchymal stromal cells from different tissue sources: An approach for their use in neural regeneration therapies. *PloS One*. 2019;14(3):e0213032.
114. Negro S, Pirazzini M, Rigoni M. Models and methods to study Schwann cells. *J Anat*. 2022;241(5):1235–58.
115. Hercher D, Nguyen MQ, Dworak H. Extracellular vesicles and their role in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*. April 2022;350:113968.
116. Tamez-Mata Y, Pedroza-Montoya FE, Martínez-Rodríguez HG, García-Pérez MM, Ríos-Cantú AA, González-Flores JR, u. a. Nerve gaps repaired with acellular nerve allografts

recellularized with Schwann-like cells: Preclinical trial. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS*. Januar 2022;75(1):296–306.

117. Takaoka S, Uchida F, Ishikawa H, Toyomura J, Ohyama A, Watanabe M, u. a. Transplanted neural lineage cells derived from dental pulp stem cells promote peripheral nerve regeneration. *Hum Cell*. 1. März 2022;35(2):462–71.

118. Pan D, Schellhardt L, Acevedo-Cintrón JA, Hunter D, Snyder-Warwick AK, Mackinnon SE, u. a. IL-4 expressing cells are recruited to nerve after injury and promote regeneration. *Exp Neurol*. 1. Januar 2022;347:113909.

119. Khan A, Bellio MA, Schulman IH, Levi AD, Longsomboon B, Brooks A, u. a. The Interdisciplinary Stem Cell Institute's Use of Food and Drug Administration-Expanded Access Guidelines to Provide Experimental Cell Therapy to Patients With Rare Serious Diseases. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 8. Juni 2021 [zitiert 5. Mai 2024];9. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.675738>

120. Zhou LN, Wang JC, Zilundu PLM, Wang YQ, Guo WP, Zhang SX, u. a. A comparison of the use of adipose-derived and bone marrow-derived stem cells for peripheral nerve regeneration in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther*. 9. April 2020;11(1):153.

121. Wu SH, Liao YT, Hsueh KK, Huang HK, Chen TM, Chiang ER, u. a. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells From a Hypoxic Culture Improve Neuronal Differentiation and Nerve Repair. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:658099.

122. Li X, Zhao S, Wang L. Therapeutic effect of adipose-derived stem cell transplantation on optic nerve injury in rats. *Mol Med Rep*. Februar 2018;17(2):2529–34.

123. Fu X, Tong Z, Li Q, Niu Q, Zhang Z, Tong X, u. a. Induction of adipose-derived stem cells into Schwann-like cells and observation of Schwann-like cell proliferation. *Mol Med Rep*. 1. August 2016;14(2):1187–93.

124. Resch A, Wolf S, Mann A, Weiss T, Stetco AL, Radtke C. Co-Culturing Human Adipose Derived Stem Cells and Schwann Cells on Spider Silk—A New Approach as Prerequisite for Enhanced Nerve Regeneration. *Int J Mol Sci*. Januar 2019;20(1):71.

125. Zack-Williams SD, Butler PE, Kalaskar DM. Current progress in use of adipose derived stem cells in peripheral nerve regeneration. *World J Stem Cells*. 26. Januar 2015;7(1):51–64.

126. Khan A, Diaz A, Brooks AE, Burks SS, Athauda G, Wood P, u. a. Scalable culture techniques to generate large numbers of purified human Schwann cells for clinical trials in human spinal cord and peripheral nerve injuries. *J Neurosurg Spine*. 1. Januar 2022;36(1):135–44.

127. Tricaud N, Park HT. Wallerian demyelination: chronicle of a cellular cataclysm. *Cell Mol Life Sci CMLS*. November 2017;74(22):4049–57.

128. Lu Y, Shan Q, Ling M, Ni XA, Mao SS, Yu B, u. a. Identification of key genes involved in axon regeneration and Wallerian degeneration by weighted gene co-expression network analysis. *Neural Regen Res*. April 2022;17(4):911–9.

129. Cintrón-Colón AF, Almeida-Alves G, VanGyseghem JM, Spitsbergen JM. GDNF to the rescue: GDNF delivery effects on motor neurons and nerves, and muscle re-innervation after peripheral nerve injuries. *Neural Regen Res.* 30. August 2021;17(4):748–53.
130. Bhangra KS, Busuttill F, Phillips JB, Rahim AA. Using Stem Cells to Grow Artificial Tissue for Peripheral Nerve Repair. *Stem Cells Int.* 2016;2016:7502178.
131. Clements MP, Byrne E, Camarillo Guerrero LF, Cattin AL, Zakka L, Ashraf A, u. a. The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. *Neuron.* 27. September 2017;96(1):98-114.e7.
132. Aszmann OC, Korak KJ, Kropf N, Fine E, Aebischer P, Frey M. Simultaneous GDNF and BDNF application leads to increased motoneuron survival and improved functional outcome in an experimental model for obstetric brachial plexus lesions. *Plast Reconstr Surg.* 15. September 2002;110(4):1066–72.
133. Li R, Wu J, Lin Z, Nangle MR, Li Y, Cai P, u. a. Single injection of a novel nerve growth factor coacervate improves structural and functional regeneration after sciatic nerve injury in adult rats. *Exp Neurol.* Februar 2017;288:1–10.
134. Baumgartner BJ, Shine HD. Neuroprotection of spinal motoneurons following targeted transduction with an adenoviral vector carrying the gene for glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol.* September 1998;153(1):102–12.
135. Yan Q, Elliott J, Snider WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature.* 24. Dezember 1992;360(6406):753–5.
136. Uzunlu EO, Oğurtan Z. Comparative evaluation of bone marrow and dental pulp mesenchymal stem cells for motor functional recovery in rat sciatic nerve injury. *J Cell Mol Med.* 29. April 2024;28(9):e18340.
137. Marconi S, Castiglione G, Turano E, Bissolotti G, Angiari S, Farinazzo A, u. a. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. *Tissue Eng Part A.* Juni 2012;18(11–12):1264–72.
138. Yang CC, Wang J, Chen SC, Hsieh YL. Synergistic effects of low-level laser and mesenchymal stem cells on functional recovery in rats with crushed sciatic nerves. *J Tissue Eng Regen Med.* Februar 2016;10(2):120–31.
139. Berdugo-Vega G, Arias-Gil G, Rodriguez-Niedenführ M, Davies DC, Vázquez T, Pascual-Font A. GFAP immunoreactivity within the rat nucleus ambiguus after laryngeal nerve injury. *J Anat.* November 2014;225(5):492–501.
140. Morgan L, Jessen KR, Mirsky R. The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (04+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor-) depends on growth inhibition. *J Cell Biol.* Februar 1991;112(3):457–67.
141. Lutz D, Kataria H, Kleene R, Loers G, Chaudhary H, Guseva D, u. a. Myelin Basic Protein Cleaves Cell Adhesion Molecule L1 and Improves Regeneration After Injury. *Mol Neurobiol.* Juli 2016;53(5):3360–76.

142. Majdan M, Miller FD. Neuronal life and death decisions functional antagonism between the Trk and p75 neurotrophin receptors. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci*. Juni 1999;17(3):153–61.
143. Jessen KR, Mirsky R. Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci*. September 1999;22(9):402–10.
144. Zha K, Yang Y, Tian G, Sun Z, Yang Z, Li X, u. a. Nerve growth factor (NGF) and NGF receptors in mesenchymal stem/stromal cells: Impact on potential therapies. *Stem Cells Transl Med*. 1. Juli 2021;10(7):1008–20.
145. Zhang Z, Wang F, Huang X, Sun H, Xu J, Qu H, u. a. Engineered Sensory Nerve Guides Self-Adaptive Bone Healing via NGF-TrkA Signaling Pathway. *Adv Sci*. 2023;10(10):2206155.
146. Mitra S, Turchetto S, Wahlberg L, Linderöth B, Behbahani H, Eriksdotter M. Encapsulated cell biodelivery of NGF (ECB-NGF) for AD therapy has implications from astroglial activation and amyloid-beta toxicity. *Alzheimers Dement*. 2020;16(S9):e045104.
147. Ma T, Yang Y, Quan X, Lu L, Xia B, Gao J, u. a. Oxygen carrier in core-shell fibers synthesized by coaxial electrospinning enhances Schwann cell survival and nerve regeneration. *Theranostics*. 11. Juli 2020;10(20):8957–73.
148. Scott-Solomon E, Kuruvilla R. Prenylation of Axonally Translated Rac1 Controls NGF-Dependent Axon Growth. *Dev Cell*. 22. Juni 2020;53(6):691–705.e7.
149. Killebrew DA, Williams KS, Xie Y, Longo F, Meeker RB. Suppression of HIV-associated Macrophage Activation by a p75 Neurotrophin Receptor Ligand. *J Neuroimmune Pharmacol*. 1. Juni 2022;17(1):242–60.
150. Jiao J, Wang F, Huang JJ, Huang JJ, Li ZA, Kong Y, u. a. Microfluidic hollow fiber with improved stiffness repairs peripheral nerve injury through non-invasive electromagnetic induction and controlled release of NGF. *Chem Eng J*. 15. Dezember 2021;426:131826.
151. Antman-Passig M, Giron J, Karni M, Motiei M, Schori H, Shefi O. Magnetic Assembly of a Multifunctional Guidance Conduit for Peripheral Nerve Repair. *Adv Funct Mater*. 2021;31(29):2010837.
152. Xu H, Yu Y, Zhang L, Zheng F, Yin Y, Gao Y, u. a. Sustainable release of nerve growth factor for peripheral nerve regeneration using nerve conduits laden with Bioconjugated hyaluronic acid-chitosan hydrogel. *Compos Part B Eng*. 1. Februar 2022;230:109509.
153. Singh A, Asikainen S, Teotia AK, Shiekh PA, Huottilainen E, Qayoom I, u. a. Biomimetic Photocurable Three-Dimensional Printed Nerve Guidance Channels with Aligned Cryomatrix Lumen for Peripheral Nerve Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 19. Dezember 2018;10(50):43327–42.
154. Pandey S, Mudgal J. A Review on the Role of Endogenous Neurotrophins and Schwann Cells in Axonal Regeneration. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc NeuroImmune Pharmacol*. Dezember 2022;17(3–4):398–408.

155. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677–736.
156. An JJ, Gharami K, Liao GY, Woo NH, Lau AG, Vanevski F, u. a. Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell.* 11. Juli 2008;134(1):175–87.
157. Goncharuk SA, Artemieva LE, Nadezhdin KD, Arseniev AS, Mineev KS. Revising the mechanism of p75NTR activation: intrinsically monomeric state of death domains invokes the. *Sci Rep.* 13. August 2020;10(1):13686.
158. Skeldal S, Coulson EJ. Signaling and function of death receptors of the tumor necrosis factor receptor superfamily [Internet]. Bd. 4. Elsevier; 2023 [zitiert 5. Mai 2024]. Verfügbar unter: <https://espace.library.uq.edu.au/view/UQ:15b9459>
159. Ohnishi A, Yamamoto T, Her Q, Han M, Murai Y, Ikeda M. [The effect of brain-derived neurotrophic factor on regeneration of nerve fibers after crush injury--morphometric evaluation]. *J UOEH.* 1. Dezember 1996;18(4):261–71.
160. Zheng J, Sun J, Lu X, Zhao P, Li K, Li L. BDNF promotes the axonal regrowth after sciatic nerve crush through intrinsic neuronal capability upregulation and distal portion protection. *Neurosci Lett.* 16. Mai 2016;621:1–8.
161. Cintrón-Colón AF, Almeida-Alves G, Boynton AM, Spitsbergen JM. GDNF synthesis, signaling, and retrograde transport in motor neurons. *Cell Tissue Res.* Oktober 2020;382(1):47–56.
162. Zheng Z, Liu J. GDNF-ADSCs-APG embedding enhances sciatic nerve regeneration after electrical injury in a rat model. *J Cell Biochem.* September 2019;120(9):14971–85.
163. Eggers R, Winter F de, Hoyng SA, Roet KCD, Ehlert EM, Malessy MJA, u. a. Lentiviral Vector-Mediated Gradients of GDNF in the Injured Peripheral Nerve: Effects on Nerve Coil Formation, Schwann Cell Maturation and Myelination. *PLOS ONE.* 12. August 2013;8(8):e71076.
164. Cai W, Liu Y, Zhang T, Ji P, Tian C, Liu J, u. a. GDNF facilitates the differentiation of ADSCs to Schwann cells and enhances nerve regeneration through GDNF/MTA1/Hes1 axis. *Arch Biochem Biophys.* März 2024;753:109893.
165. Mason MRJ, Tannemaat MR, Malessy MJA, Verhaagen J. Gene therapy for the peripheral nervous system: a strategy to repair the injured nerve? *Curr Gene Ther.* April 2011;11(2):75–89.
166. Chen CJ, Ou YC, Liao SL, Chen WY, Chen SY, Wu CW, u. a. Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol.* März 2007;204(1):443–53.
167. Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, u. a. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron.* 23. August 2012;75(4):633–47.

168. Wan T, Zhang FS, Qin MY, Jiang HR, Zhang M, Qu Y, u. a. Growth factors: Bioactive macromolecular drugs for peripheral nerve injury treatment - Molecular mechanisms and delivery platforms. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. Januar 2024;170:116024.
169. Zhang R, Zhang Y, Yi S. Identification of critical growth factors for peripheral nerve regeneration. *RSC Adv*. 3. April 2019;9(19):10760–5.
170. Zhang H, Wang H, Wen B, Lu L, Zhao Y, Chai R. Ultrasound-Responsive Compositd Conductive Silk Conduits for Peripheral Nerve Regeneration. *Small Struct*. 2023;4(9):2300045.
171. Klein SM, Vykoukal J, Li DP, Pan HL, Zeitler K, Alt E, u. a. Peripheral Motor and Sensory Nerve Conduction following Transplantation of Undifferentiated Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells in a Biodegradable U.S. Food and Drug Administration-Approved Nerve Conduit. *Plast Reconstr Surg*. Juli 2016;138(1):132–9.
172. Salzer JL. Schwann cell myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 8. Juni 2015;7(8):a020529.

## 9. Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Nervenzelle; eigene Darstellung in Anlehnung an (7).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | - 2 -  |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung eines myelinisierten Axons im peripheren Nervensystem; eigene Darstellung in Anlehnung an (7) .....                                                                                                                                                                                                                                                                               | - 2 -  |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anatomie eines peripheren Nerven im Querschnitt; eigene Darstellung in Anlehnung an (7).....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | - 3 -  |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der Degeneration und Regeneration nach peripheren Nervenverletzungen: A: Durchtrennung des Axons, B: Traumatische Degeneration am Ort der Verletzung und Wallersche Degeneration nach distal, C: Regeneration des Wachstumskonus entlang des Basallamina-Gerüsts, D: Einwandern der Schwannzellen mit Ausbildung der Büngner-Bänder; eigene Darstellung in Anlehnung an (22)..... | - 5 -  |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der Koaptation der Nervenstümpfe eines peripheren Nerven mittels epineuraler Neuroraphie; eigene Darstellung in Anlehnung an (26).....                                                                                                                                                                                                                                            | - 6 -  |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung der Rekonstruktion eines peripheren Nerven mittels Neuroraphie mit Koaptation der Faszikelgruppen; eigene Darstellung in Anlehnung an (26) -                                                                                                                                                                                                                                      | - 7 -  |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung der Konduit-assistierten Rekonstruktion eines peripheren Nerven mittels autologem Nerveninterponat; eigene Darstellung in Anlehnung an (32) .....                                                                                                                                                                                                                                 | - 8 -  |
| Abbildung 8: Schematisch Darstellung der Rekonstruktion eines Nervendefekts mittels Nervenkonduit; eigene Darstellung in Anlehnung an (42) .....                                                                                                                                                                                                                                                                        | - 10 - |
| Abbildung 9: Chirurgischer Algorithmus peripherer Nervenverletzungen; eigene Darstellung in Anlehnung an (11).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | - 12 - |
| Abbildung 10: Schematische Darstellung der Entwicklungsstufen von Schwannzellen in peripheren Nerven ausgehend von der Neuralleistenzelle; eigene Darstellung in Anlehnung an (68) .....                                                                                                                                                                                                                                | - 13 - |
| Abbildung 11: Schematische Darstellung der Aufspaltung der gewonnenen Fettgewebssuspension in die Bestandteile der stromal-vaskulären Fraktion; eigene Darstellung in Anlehnung an (107).....                                                                                                                                                                                                                           | - 17 - |
| Abbildung 12: Lichtmikroskopische Aufnahme eines exemplarischen Scratches bei 0 % Konfluenz; Referenzbalken $\triangleq 100\ \mu\text{m}$ .....                                                                                                                                                                                                                                                                         | - 32 - |
| Abbildung 13: Lichtmikroskopische Aufnahme eines exemplarischen Scratches bei ca. 50 % Konfluenz; Referenzbalken $\triangleq 100\ \mu\text{m}$ .....                                                                                                                                                                                                                                                                    | - 32 - |

|                                                                                                                                                                                                                                                             |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahme eines exemplarischen Scratches bei nahezu 100 % Konfluenz; Referenzbalken $\triangleq$ 100 $\mu$ m .....                                                                                                         | 33 - |
| Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme der adipogenen Stammzellen vor weiterer Differenzierung; Referenzbalken $\triangleq$ 100 $\mu$ m.....                                                                                                            | 34 - |
| Abbildung 16: Lichtmikroskopische Aufnahme der adipogenen Stammzellen nach abgeschlossener Differenzierung mit dem Protokoll 1; Referenzbalken $\triangleq$ 100 $\mu$ m.....                                                                                | 35 - |
| Abbildung 17: Lichtmikroskopische Aufnahme der adipogenen Stammzellen nach abgeschlossener Differenzierung mit dem Protokoll 2; Referenzbalken $\triangleq$ 100 $\mu$ m.....                                                                                | 35 - |
| Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahme der adipogenen Stammzellen nach abgeschlossener Differenzierung mit dem Protokoll 3; Referenzbalken $\triangleq$ 100 $\mu$ m.....                                                                                | 36 - |
| Abbildung 19: Relative Expression des allgemeinen Gliamarkers S100 am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                                       | 37 - |
| Abbildung 20: Relative Expression des allgemeinen Gliamarkers GFAP am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                                       | 37 - |
| Abbildung 21: Relative Expression des Markers myelinisierender Schwannzellen P0 am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                          | 38 - |
| Abbildung 22: Relative Expression des Markers myelinisierender Schwannzellen MBP am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                         | 38 - |
| Abbildung 23: Relative Expression des Markers myelinisierender Schwannzellen p75 am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                         | 39 - |
| Abbildung 24: Relative Expression des Neurotrophins NGF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                                                  | 39 - |
| Abbildung 25: Relative Expression des neurotrophen Faktors GDNF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                                          | 40 - |
| Abbildung 26: Relative Expression des Neurotrophins BDNF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung in der Q-PCR; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                                                 | 40 - |
| Abbildung 27: Ergebnis des Western Blots zum Nachweis des Markers myelinisierender Schwannzellen P75 (in Grün dargestellt) am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung; als Ladekontrolle wurde GAPDH (in Rot dargestellt) verwendet..... | 41 - |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                    |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Abbildung 28: Konzentration des Neurotrophins NGF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung im ELISA; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                                                                                   | - 42 - |
| Abbildung 29: Konzentration des neurotrophen Faktors GDNF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung im ELISA; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                                                                           | - 42 - |
| Abbildung 30: Konzentration des Neurotrophins BDNF am Tag 0 (Kontrolle) und nach abgeschlossener Differenzierung im ELISA; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.....                                                                                                  | - 43 - |
| Abbildung 31: Ergebnisse des Scratch-Assays zur Quantifizierung der Zellmigration von Schwannzellen unter dem Einfluss von konditioniertem und Kontrollmedium; die Ordinate zeigt die Zunahme der Konfluenz der Zellen als Prozentwert im Verhältnis zur anfänglichen Fläche ..... | - 44 - |

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Zusammensetzung der drei beschriebenen Originalprotokolle einschließlich Modifikation durch die Arbeitsgruppe Felthaus - 24 -

Tabelle 2: Übersicht über die Sequenzen und Annealingtemperaturen der verwendeten PCR-Primer ..... - 26 -

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei nachstehenden Personen bedanken, ohne deren Unterstützung die Fertigstellung dieser Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zunächst gilt mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Lukas Prantl für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung der Labore, die Finanzierung der Verbrauchsmaterialien sowie für die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Tobias Ettl bedanke ich mich ebenfalls für die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Besonders danken möchte ich auch Herrn Dr. Oliver Felthaus für die über den gesamten Zeitraum der Arbeit andauernde, hervorragende Betreuung, die ausführliche Einarbeitung und den intellektuellen Austausch. Ohne seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, seine Geduld und sein Verständnis wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens danke ich ihm herzlich.

Für die wertvollen Hilfestellungen während der Durchführung der Versuche, die bereichernden Gespräche sowie die freundliche Atmosphäre möchte ich mich herzlich bei Frau Bernadette Fűrnsstein bedanken.

Mein Dank gilt des Weiteren allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Plastische-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Regensburg für die kollegiale Unterstützung der Arbeit.

Zuletzt möchte ich auch meiner Familie und meinen Freunden für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines gesamten Studiums und bei der Verwirklichung dieser Arbeit danken.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

|                     |                |
|---------------------|----------------|
| Name                | Nicolas Hammer |
| Geburtsdatum        | 11.09.1992     |
| Geburtsort          | Burglengenfeld |
| Staatsangehörigkeit | deutsch        |

## Ausbildung

---

|                   |                                                                                                                                                                             |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10/2011 – 05/2020 | <b>Studium der Humanmedizin</b><br>Universität Regensburg<br>1. Staatsexamen 09/2013, Note: 2,5<br>2. Staatsexamen 04/2019, Note: 4,0<br>3. Staatsexamen 05/2020, Note: 2,0 |
| 2003 - 2011       | <b>Allgemeine Hochschulreife</b><br>Erasmus-Gymnasium Amberg<br>Abschlussnote: 1,4                                                                                          |

## Klinische Erfahrung

---

### Praktisches Jahr

|                   |                                                     |
|-------------------|-----------------------------------------------------|
| 01/2020 - 04/2020 | <b>Innere Medizin</b><br>Klinikum St. Marien Amberg |
| 09/2019 - 12/2019 | <b>Urologie</b><br>Klinikum St. Marien Amberg       |
| 05/2019 - 09/2019 | <b>Chirurgie</b><br>Klinikum St. Marien Amberg      |

## **Berufsleben**

ab 06/2020

**Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-/Viszeral- und  
Thoraxchirurgie**

Klinikum St. Marien Amberg