Abschlussbericht zum Vorhaben

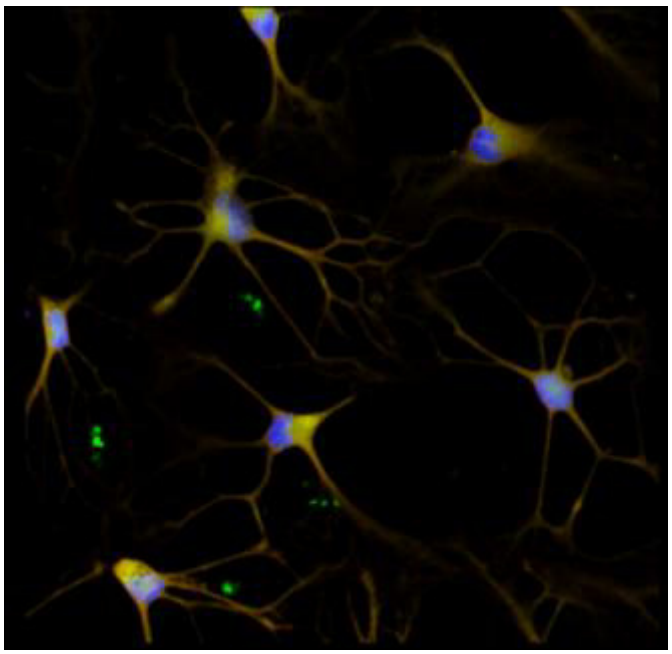
„Analyse von olfaktorischen Stamm- und Ensheathing-Zellen sowie mesenchymalen Stammzellen im Kontakt zu Cerebrospinalflüssigkeit: Grundvoraussetzung für humane zelltherapeutische Ansätze nach Rückenmarkstrauma“ (FR309)

Laufzeit
01.11.2019 – 28.02.2021

Bericht vom 31.05.2021

Autoren
M. Sc. Markus Rövekamp
Dr. rer. nat. Marina Breisch

Chirurgische Forschung, Chirurgische Universitätsklinik und Poliklinik
BG Universitätsklinikum Bergmannsheil GmbH
Bürkle-de-la-Camp-Platz 1, 44789 Bochum



Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch 3

Kurzfassung englisch 4

1. Problemstellung 5

2. Forschungszweck/-ziel 6

3. Methodik 7

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens 13

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen 34

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen 35

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan 35

8. Literaturverzeichnis 37

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte 39

Kurzfassung deutsch

Traumatische Rückenmarksverletzungen bedeuten für betroffene Patienten nicht nur eine physische Beeinträchtigung, sondern stellen sie und ihre Familien auch vor soziale und ökonomische Herausforderungen. Umso wichtiger ist es, potenzielle Therapieansätze näher zu analysieren. In den letzten Jahren sind viele vorklinische aber auch einige klinische Studien gestartet. Neben medikamentösen Therapien stellen regenerative Zelltherapien vielversprechende Ansätze dar, da die meisten Patienten sich in der chronischen Phase der Verletzung befinden, in welcher durch eine Reihe sekundärer inflammatorischer Prozesse Neurone und Gliazellen abgestorben sind und die ausgebildete Glianarbe eine physische sowie chemische Barriere zur Regeneration darstellt. Unter den verschiedenen Zelltypen stellen vor allem autologe Stammzellen aus dem Knochenmark und insbesondere olfaktorischen Stammzellen aus der Nasenschleimhaut, welche mittels Biopsie leicht zu entnehmen sind, eine attraktive Zellquelle dar. Werden die Stammzellen in das Rückenmark eines Patienten transplantiert, kommen sie mit Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) in Kontakt. Daher wurde in der vorliegenden Studie das Verhalten der Stammzellen in CSF näher untersucht, um mögliche adverse Effekte auszuschließen. Die Schichten der olfaktorischen Mukosa wurden separiert und die olfaktorischen Stammzellen aus der Epithelschicht sowie der Lamina propria mit Hilfe des Neurosphären-Assays isoliert und kultiviert. Anschließend wurde ihr Verhalten in CSF im Vergleich mit Knochenmarksstammzellen analysiert. Alle drei Zellarten waren in CSF unter Zugabe von Proteinen in Form von FCS bis zu 21 Tage vital. Zellfunktionen wie Proliferation und Migration blieben in CSF erhalten, zudem zeigte keine der isolierten Zellen ungewollte Reaktionen wie spontane osteogene, adipogene oder chondrogene Differenzierung. Während die Knochenmarksstammzellen nach geeigneter Induktion in Chondrozyten, Adipozyten und Osteoblasten differenzieren konnten, wiesen die Stammzellen der Lamina Propria nur osteogenes und neuronales Differenzierungspotential auf. Vor allem die Zellen der Epithelschicht zeigten eine Differenzierung in Neuronen-ähnliche Zellen (βIII-Tubulin positiv), welche unter Zugabe von CSF eine vermehrte Ausbildung von Zellausläufern aufwiesen. Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen, dass die Stammzellen der olfaktorischen Mukosa eine gute und sichere Quelle für Zelltherapie darstellen. Dennoch müssen die neuronal differenzierten Zellen weiter charakterisiert, und ihre Funktionalität sowie ihr Verhalten in geeigneten Trägermatrices (z.B. Plasmaclot) überprüft werden.

Kurzfassung englisch

Traumatic spinal cord injuries not only result in physical impairment for affected patients but also present them and their families with social and economic challenges. Therefore, it is so important to analyze potential therapeutic approaches in more detail. In recent years, many preclinical but also some clinical studies have been started. Besides medication therapies, regenerative cell therapies represent promising approaches, since most patients are in the chronic phase of injury, where neurons and glial cells have died due to a series of secondary inflammatory processes and the formed glial scar represents a physical and a chemical barrier for regeneration. Among the different cell types, autologous stem cells from bone marrow and, in particular, olfactory stem cells from the nasal mucosa, which can be easily obtained by biopsy, represent an attractive cell source. When the stem cells are transplanted into the spinal cord of a patient, they come into contact with cerebrospinal fluid (CSF). Therefore, in the present study the behavior of stem cells in CSF was studied in more detail to exclude possible adverse effects. The layers of the olfactory mucosa were separated and the olfactory stem cells from the epithelial layer and the lamina propria were isolated and cultured using the neurosphere assay. Their behavior in CSF was then analyzed in comparison with bone marrow stem cells. All three cell types were vital in CSF with the addition of proteins in the form of FCS for up to 21 days. Cell functions such as proliferation and migration were preserved in CSF, and none of the cell types showed unwanted reactions such as spontaneous osteogenic, adipogenic or chondrogenic differentiation. While bone marrow stem cells were able to differentiate into chondrocytes, adipocytes and osteoblasts after appropriate induction, stem cells of the lamina propria showed only osteogenic and neuronal differentiation potential. In particular, the cells of the epithelial layer showed differentiation into neuron-like cells (βIII-tubulin positive), which showed increased formation of dendrites when CSF was added. In conclusion, olfactory mucosa stem cells represent a good and safe source for cell therapy. Nevertheless, it is necessary to further characterize the neuronal differentiated cells and to verify their functionality as well as their behavior in suitable carrier matrices (e.g., plasmaclot).

1. Problemstellung

Traumatische Rückenmarksläsionen führen oft zu schweren sensorischen und motorischen Beeinträchtigungen, die bis zur Querschnittlähmung (Paraplegie oder Tetraplegie) führen können [1-2]. Rückenmarkschäden werden dabei vornehmlich durch Hochrasanz-verletzungen, z.B. durch Sport, Straßenverkehr oder Arbeitsverletzungen hervorgerufen. Hierbei kommt es häufig zu einem Kontinuitätsverlust der Wirbelsäule mit instabilen Frakturen durch direkte Scher-, Stauchungs- oder Zugschädigung des Rückenmarks. Zusätzlich können Durchspießungsverletzungen, z.B. durch Knochenfragmente oder Kompressionen durch Verlegungen des Spinalkanals das Rückenmark treffen. Der zervikale Wirbelsäulenabschnitt ist der am häufigsten betroffene Bereich [3]. Die Höhe der Läsion ist dabei maßgebend für die Schwere und den Umfang der Querschnittslähmung. Neurologische Ausfälle treten isoliert oder kombiniert auf und können bis hin zum vollständigen Kontinuitätsverlust führen [4]. Laut dem TraumaRegister DGU (Jahresbericht 2018) betreffen 29,4% aller erfassten Traumata den Bereich der Wirbelsäule [5], wobei Männer unter 40 Jahren hauptsächlich betroffen sind [6]. Eine neurologische Regeneration bei vollständiger Querschnittslähmung ist in der Literatur kaum zu verzeichnen. Bei nur 5,4% der betroffenen Patienten zeigen sich neurologische Verbesserungen nach 5 Jahren. Eine vollständige Heilung ist aufgrund der primären und sekundären Verletzungsmechanismen nahezu ausgeschlossen [7].
Trotz einer Vielzahl von angewandten therapeutischen Strategien (z.B. Wachstumsfaktoren, Neutralisation von wachstums-inhibierenden Signalen wie GM-1, 4-AP, BDNG, GDNF, Nogo und MAG-Inhibitoren, ISP, Glutamat-oxaloacetat Transaminase 1) [8-9] sind bisher kaum Fortschritte erzielt worden. Zelltherapeutische Strategien (Transplantationen) adressieren eher die komplexe Pathologie nach Rückenmarkverletzung und stellen aufgrund der bisherigen geringen Heilungschancen einen erweiterten Therapieansatz dar [10]. Im Gegensatz zu den monofaktoriellen Therapien soll damit ein breites Spektrum neuroprotektiver und neuroregenerativer Zellleistungen genutzt werden, um bessere therapeutische Effektivität zu erreichen. Aktuell werden für derartige Therapieansätze verschiedene Zelltypen bei der Behandlung traumatischer Rückenmarksläsionen eingesetzt. Darunter Oligodendrozyten-Vorläuferzellen, Schwannzellen, neuronale (NSC) und mesenchymale Stammzellen (MSC), induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC), sowie olfaktorischen Stammzellen (OSC) und olfaktorischen Ensheathing-Zellen (OEC) [1, 11-12]. Besonders Zellen der olfaktorischen Mukosa (OEC, OSC) sowie die mesenchymalen Stammzellen sind für therapeutische Transplantationen vielversprechend [13-15]. Wesentliche Gründe dafür sind u.a. die therapeutische Immunmodulation und die Bereitstellung neurotropher Wachstumsfaktoren. Neurogene und neuroregenerative Eigenschaften der olfaktorischen Mukosa werden dabei sowohl den OEC, welche die axonale Regeneration verbessern können, als auch den OSC, die zur Proliferation und Zellteilung fähig sind und bei Bedarf zu Rezeptorneuronen ausdifferenzieren können, zugeschrieben. Im Rahmen der Zelltherapie stellen die intravenöse, die intrathekale, die direkte intramedulläre Injektion oder die Biomaterial-getragene Applikation repräsentative Techniken zur Zelltransplantation dar, wobei die ersten beiden Techniken weniger invasiv sind [16-20].
Der Einsatz von Zellen im Rahmen der lokalen Zelltherapie bei Rückenmarkläsionen führt generell zu einem Kontakt der transplantierten Zellen mit Cerebrospinalflüssigkeit (CSF). Die CSF ist eine Hauptkomponente des zentralen Nervensystems (ZNS) und hat verschiedene Funktionen wie z.B. Schutz des Rückenmarks vor Trauma und der Versorgung mit

Nährstoffen [21-23]. Somit ist der Einfluss der CSF auf die zu transplantierenden Zellen ein wichtiger Faktor, der vor der klinischen Anwendung untersucht werden muss, um größtmögliche Sicherheit für Patienten zu gewährleisten.

2. Forschungszweck/-ziel

Im vorliegenden Projekt sollte das Verhalten von humanen olfaktorischen Ensheathing-Zellen, olfaktorischen neuronalen Stammzellen, sowie von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks in Cerebrospinalflüssigkeit untersucht werden. Die Ergebnisse dieses Projektes sind Grundvoraussetzung für humane zelltherapeutische Ansätze nach Rückenmarks-Traumata. Besonders wichtig ist es, bereits in den vorklinischen Phasen den Einfluss der Cerebrospinalflüssigkeit auf die potentiellen Transplantat-Zellen zu analysieren und ggf. sogar adverse Zellreaktionen zu identifizieren.
Diese Fragestellungen wurden während der Sitzung des Beraterkreises „Neurotraumatologie der Wirbelsäule" am 29. Januar 2018 aufgeworfen und sollten mit diesem Forschungsvorhaben beantwortet werden. Das vorliegende Forschungsvorhaben sollte unabhängig vom vorherigen DGUV Forschungsprojekt (FR256, abgeschlossen am 30.06.2019), in welchem Isolierungs- und Aufreinigungsmethoden sowie die genaue Zellcharakterisierung etabliert wurden, bearbeitet werden, und hatte die folgenden Untersuchungen zum Ziel:

- Viabilität der humanen Zellen (olfaktorische Stammzellen (OSC), olfaktorische Ensheathing-Zellen (OEC) und mesenchymale Stammzellen (MSC)) in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF)
- Proliferationsverhalten der humanen Zellen in CSF
- Zelltypisierung nach Inkubation der Zellen in CSF
- Analyse der Zellfunktionalität in CSF
- Analyse des Differenzierungspotentials der Zellen nach Inkubation in CSF

Für das vorliegende Projekt wurden die olfaktorischen Zellen in aufwendigen Verfahren aus Nasenschleimhaut-Biopsien angereichert (Kooperationspartner PD Dr. Volkenstein, HNO-Universitätsklinik St. Elisabeth Hospital Bochum). Diese Verfahren wurden in den Zellkultur-Laboren der Chirurgischen Forschung (BG Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum) für andere Fragestellungen bereits etabliert und sind u.a. bei Paviot et al. 2011, Nash et al. 2011, Kachramanoglou et al. 2013 sowie Hauser et al. 2012 beschrieben [24-27]. Mesenchymale Stammzellen wurden kommerziell erworben. Cerebrospinalflüssigkeit wurde vom Kooperationspartner der Klinik für Neurochirurgie und Wirbelsäulenchirurgie (Prof. Martínez-Olivera, BG Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum) bereitgestellt.
Ein zelltherapeutischer Einsatz zur Neuro-Regeneration nach Rückenmarkverletzung wird durch folgende Punkte begründet [15]:

Zellen
- modulieren die Zellantwort
- stellen tropischen Support
- remyelinisieren Axone
- ersetzten Zellen

- erhöhen die Plastizität
- regulieren die Astrozyten-Reaktivität
- reorganisieren Narbengewebe
- besitzen Phagozytose-Fähigkeit
- besitzen angiogene Wirkung

Die Hypothesen des Forschungsprojektes waren:

I. OEC, OSC und MSC bleiben in CSF vital und proliferieren
II. Die Funktionalität der Zellen (z.B. Proliferation, Zytokin-Profil, Differenzierbarkeit mit exogenen Stimuli, Phagozytosefähigkeit OEC) bleibt in CSF erhalten
III. Neurotrophe Faktoren der CSF fördern die neuronale Differenzierung
IV. Spontane osteogene Differenzierung in CSF tritt nicht auf

3. Methodik

3.1 Geplante Arbeits- und Zeitabläufe

3.1.1 Folgende Arbeitsschritte waren zu Projektbeginn vorgesehen:

- Entnahme der olfaktorischen Mukosa (ausreichend hohe Biopsiezahlen zur Analyse)
- Isolierung und Kultivierung von Stamm- und Ensheathing-Zellen aus der olfaktorischen Mukosa
- Kultivierung von humanen Knochenmarksstammzellen (BM-hMSC)
- Gewinnung von CSF
- Viabilität der humanen Zellen in CSF
- Proliferationsverhalten der humanen Zellen in CSF
- Zelltypisierung nach Inkubation der Zellen in CSF
- Analyse der Zellfunktionalität in CSF
- Phagozytose-Eigenschaften der isolierten OEC in CSF
- Zellmigration in CSF
- Analyse der Freisetzung neurotropher Faktoren der Zellen in CSF
- Einfluss löslicher Faktoren von OEC auf neuronale Stammzellen in CSF
- Förderung der neuronalen Differenzierung von Stammzellen in CSF
- Analyse des spontanen Differenzierungspotentials der Zellen nach Inkubation in CSF
- Statistik

In Tabelle 1 ist der initial geplante Zeitablauf der Arbeitsschritte dargestellt.

Tabelle 1: Detaillierter Arbeits- und Zeitplan (grau: geplante Durchführung)

Arbeitspakete	2019	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Laufzeit Monate
AP 1: Zellisolierung, Kultivierung und CSF Gewinnung														12 M
Entnahme der olfaktorischen Mukosa (PD Dr. S. Volkenstein)														
Isolierung der Zellen durch etablierte Methoden														
Kultivierung der Zellen														
CSF Gewinnung														
AP 2: Viabilität und Proliferation der Zellen in CSF														9 M
Viabilität der Zellen in CSF mittels Calcein-AM /DAPI/Pi und CytoSmart Live Imaging System														
Analyse der Zellproliferation in Abhängigkeit von CSF														
Apoptose und Nekrose-Rate mittels Annexin VI und 7AAD														
AP 3: Freisetzung neurotropher Faktoren														5 M
Analyse der Freisetzung neurotropher Faktoren in CSF														
Einfluss löslicher Faktoren von OEC auf ReNcell Stammzellen														
AP 4: Funktionalität der Zellen in CSF														10 M
Zelltypisierung nach Langzeitkultur in CSF														
Phagozytose-Eigenschaft der OEC in CSF														
Migrationsverhalten der Zellen in CSF mittels Scratch-Assay und Zweikammersystem HTS Fluoroblok														
Neuronale Differenzierung der Stammzellen in CSF														
Spontane mesodermale Differenzierung der Zellen in CSF														
AP 5: Dokumentation und Auswertung														12 M
Verdatung der Ergebnisse														
Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse														
Abschlussbericht														

M: Monate; AP: Arbeitspakete

3.2 Tatsächliche Arbeits- und Zeitabläufe

Die gesetzten Ziele konnten nicht vollständig im Projektzeitraum erreicht werden. Aufgrund der zu geringen Zellausbeute von OEC (angereicherte Zellzahl max. 1000 Zellen pro Biopsie) war es nicht möglich, ausreichende und messbare Mengen neurotropher Faktoren, die neuronale Differenzierung der H9-Zellen in einer Träger-Matrix sowie die Phagozytose-Eigenschaften und das Verhalten von OEC in CSF zu detektieren. Als Kompensation wurden olfaktorische Stammzellen aus der Lamina propria der Mukosa verwendet.

3.2.1 Entnahme von Biopsien aus der Riechregion

Die Technik zur Entnahme von Biopsien aus der Riechregion wurde in den letzten Jahren gut beschrieben und ist inzwischen eine etablierte und risikoarme Methode (kostenfrei durchgeführt in der HNO-Universitätsklinik Bochum durch PD Dr. Volkenstein). Ein positives Ethikvotum zur Entnahme der Biopsien (16-5753-5-BR) liegt von der Ruhr-Universität Bochum vor. Zur Entnahme der Biopsie, wurde die Nasenschleimhaut zunächst durch Auflage von mit Naphazolin getränkter Watte für die Dauer von 10 min abgeschwollen. Anschließend wurden mit Hilfe eines Endoskops und einer gebogenen Stanze nur auf einer Seite Biopsien entnommen. Die freiwilligen Probanden, von denen für diese Studie Biopsien entnommen wurden, zählten zum normalen Patientengut der HNO-Klinik.

3.2.2 Isolierung und Kultivierung von olfaktorischen Stammzellen aus der ET und LP der olfaktorischen Mukosa

Jede Biopsie wurde unter sterilen Bedingungen in DMEM/10% FCS (DMEM/F-12 (1:1) mit Glutamax™ und 10% fötales Kälberserum (FCS)) sowie antibiotischer / antimykotischer Lösung ins Labor der Chirurgischen Forschung im BG Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum überführt. Nach dem Waschen des Gewebes in Hanks' balancierter Salzlösung (HBSS) wurden die Biopsien für 45 min bei 37 °C enzymatisch mit Dispase II behandelt, um das Gewebe zu erweichen. Die enzymatische Reaktion wurde in DMEM/10% FCS gestoppt und das Riechepithel (dünner und heller) von der Lamina propria (LP, braun-orange gestreift) unter dem Stereomikroskop abgetrennt (Abb. 1). Nach der Trennung der beiden Zellschichten wurde die Epithelschicht (ET) vorsichtig trituriert und sofort auf eine 24-Well-Platte gegeben, während die LP weiterverarbeitet wurde. Im folgenden Schritt wurde die isolierte LP in kleinere Stücke mechanisch zerteilt und enzymatisch mit 0,1% Trypsin in HBSS für 45 min bei 37 °C behandelt. Die Reaktion wurde mit DMEM/10% FCS gestoppt und die Lösung bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschschritt wiederholt. Schließlich wurde das Zellpellet in DMEM/10% FCS gelöst und auf eine 24-Well-Platte gegeben. Die isolierten Zellgemische wurden in DMEM/10% FCS ausgesät und bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert, wobei das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde. Nach ca. 14 Tagen konnten die expandierenden Zellen zunächst in 25 cm^2 und später in 75 cm^2 Zellkulturflaschen überführt werden.
Zur weiteren Aufreinigung der Zellgemische wurden die Zellen sowohl aus der ET als auch aus der LP mittels des Neurosphären-Assays nach Reynolds und Rietze, 2005 aufgereinigt. Kryo-konservierte humane mesenchymale Knochenmarkstammzellen (BM-hMSC) als Positivkontrolle, wurden von der Firma Lonza Walkersville Inc. bezogen (kein Ethikvotum notwendig).

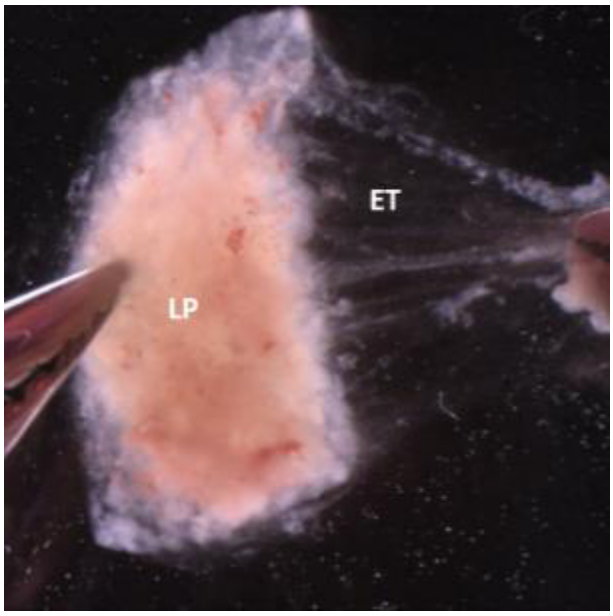


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Trennung von ET und LP. Die äußere Epithelzellschicht (ET, weiß) wurde von der innerliegenden Lamina Propria (LP, bräunlich) nach enzymatischem Verdau mechanisch separiert.

3.2.3 Gewinnung von CSF

Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) wurde von Prof. Martinez-Olivera und Dr. B. Pintea aus der Klinik für Neurochirurgie und Wirbelsäulenchirurgie des BG Universitätsklinikums Bergmannsheil Bochum zur Verfügung gestellt. Die CSF wurde von Hydrocephalus-Patienten gewonnen und bei Raumtemperatur (RT) und 2000 x g für 10 min zentrifugiert, um etwaige Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Viabilität der humanen Zellen in CSF

Um die Lebensfähigkeit von humanen olfaktorischen Stammzellen und humanen mesenchymalen Stammzellen in CSF zu bestimmen, wurden 2,5 x 10^3 Zellen/Well auf 96-Well-Platten ausgesät und in verschiedenen Konzentrationen von CSF (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% CSF) in DMEM (DMEM/F-12 (1:1) mit Glutamax™) kultiviert. Reines Zellkulturmedium DMEM und DMEM/10% FCS wurden als Kontrollen verwendet und die Platten bei 37 °C und 5% CO_2 für bis zu 21 Tage inkubiert. Die Zellviabilität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 5, 14, 21 Tage) mittels Färbung mit Calcein-AM (lebende Zellen) und Propidiumiodid (PI, tote Zellen) untersucht. Die Zellen wurden zweimal mit DMEM gewaschen und für 30 min in 100 µM DMEM/Calcein-AM bei 37 °C, 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit DMEM gewaschen, für 15 min in DMEM/PI bei RT im Dunkeln inkubiert und erneut mit DMEM gespült. Die anschließende Analyse der Färbung erfolgte unter dem MVX10-Mikroskop.
Des Weiteren wurden AlamarBlue-Assays zur Quantifizierung der Zellviabilität durchgeführt. Der AlamarBlue-Assay basiert auf der Reduktion der blauen Verbindung Resazurin beim Eintritt in die Zellen durch reduzierende Zellmetabolite zu der rosafarbenen und stark fluoreszierenden Verbindung Resorufin. Eine höhere Anzahl von Zellen führt zu einer höheren Reduktion von Resazurin und damit zu einer höheren Fluoreszenz.
AlamarBlue wurde 1+10 im Zellkulturmedium DMEM/10% FCS verdünnt und die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO_2 für 60 bis 90 min inkubiert, bis ein Farbumschlag von blau

nach violett zu beobachten war. Die Reaktion wurde photometrisch mit dem FLUOstar Optima Plattenleser bei 570 nm gemessen.

3.2.5 Proliferationsverhalten der humanen Zellen in CSF

Die Zellproliferation von olfaktorischen Stammzellen und humanen mesenchymalen Stammzellen wurde mit zwei Methoden untersucht.
Zunächst wurden 2,5 x 10^3 Zellen/Well auf 96-Well-Platten ausgesät und in verschiedenen Konzentrationen von CSF (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100%) in DMEM/1% FCS sowie DMEM oder DMEM/10% FCS als Kontrollproben bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Die Proliferation wurde nach 7, 14 und 21 Tagen mittels Calcein-AM/PI-Färbung sowie AlamarBlue-Assay analysiert (vgl. Kapitel 3.2.4).
Die Quantifizierung der Proliferationsraten erfolgte zusätzlich mit dem Click-iT® EdU Imaging Kit (ThermoFisher) für die Konzentrationen 20, 40, 60, 80% CSF in DMEM/1% FCS und DMEM/10% FCS als Kontrollprobe. Hierzu wurden 2,5 x 10^3 Zellen/Well auf 96-Well-Platten ausgesät und mit 10 µM EdU-Stammlösung pro Probe versetzt (Gesamtvolumen 200 µl in DMEM). Die Platten wurden anschließend über 7 oder 14 Tage bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 3,7% Formaldehyd für 15 min bei RT fixiert und zweimal mit PBS/3% BSA gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in PBS/0,5% Triton® X-100 für 20 min bei RT permeabilisiert und zweimal mit PBS/3% BSA gewaschen. Der Click-iT®-Reaktionscocktail wurde entsprechend den Herstellerangaben zubereitet und die Platten wurden 30 min bei RT vor Licht geschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS/3% BSA und einmal mit PBS gewaschen und die EdU-Inkorporation wurde photometrisch mit dem FLUOstar Optima-Plattenlesegerät bei 496 nm analysiert.

3.2.6 Migrationseigenschaften der humanen Zellen in CSF

Um das Migrationspotenzial der olfaktorischen und mesenchymalen Stammzellen in CSF zu untersuchen, wurde der sogenannte Scratch-Assay durchgeführt. 1 x 10^5 Zellen/Well wurden auf einer 24-Well-Platte ausgesät und mit einer dünnen Pipettenspitze wurde ein Kratzer in die dichte Zellschicht appliziert. Die Kulturplatte wurde bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert, und die Zellmigration kontinuierlich mit dem CytoSmart Live Imaging System (Lonza) bis zu 48 Stunden lang beobachtet. Die Zellmigrationsanalyse wurde in DMEM/10% FCS, 80% CSF in DMEM und 80% CSF in DMEM/1% FCS durchgeführt.

3.2.7 Chondrogenes Differenzierungspotential der humanen Zellen

Für die chondrogene Differenzierung wurden Mikromassenkulturen angelegt, indem 5 µl Tropfen der Zelllösung in die Mitte von 48-Well-Platten ausgesät wurden. Nach der Kultivierung der Mikromassenkulturen für 2 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 wurden verschiedene Medien zugegeben. Für die spontane Differenzierung wurden die Zellen in DMEM/10% FCS, in reinem DMEM oder in DMEM/1% FCS mit 20, 60 oder 80% CSF inkubiert. Für die induzierte Differenzierung wurden die Zellen in chondrogenem Differenzierungsmedium (10% Supplement im Basalmedium, GIBCO), in reinem Basalmedium oder im Basalmedium mit 10% Supplement sowie 20, 60 oder 80% CSF inkubiert. Die Medien wurden einmal pro Woche gewechselt und die Zellen über 14 Tage bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Die chondrogene Differenzierung wurde durch Alcianblau-Färbung analysiert, welche die von den Chondrozyten sezernierten Proteoglykane nachweist. Dazu wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und mit 4%

Formaldehydlösung für 30 min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Wells mit DPBD gespült und mit 1% Alcianblau-Lösung, die in 0,1 N HCL zubereitet wurde, für 30 min gefärbt. Abschließend wurden die Wells dreimal mit 0,1 N HCL und einmal mit destilliertem Wasser (A.dest.) zur pH-Neutralisierung gespült. Nach dem Trocknen wurden Bilder unter dem Mikroskop Olympus BX61 gemacht.

3.2.8 Adipogenes Differenzierungspotential der humanen Zellen

Zur adipogenen Differenzierung wurden 7,5 x 10^3 Zellen/Well auf 48-Well-Platten ausgesät. Nach der Inkubation über Nacht wurde das Zellkulturmedium durch adipogenes Differenzierungsmedium (10% Supplement im Basalmedium, GIBCO), DMEM/10% FCS oder durch Basalmedium mit 10% Supplement sowie 20, 60 oder 80% CSF ausgetauscht. Die Medien wurden einmal pro Woche gewechselt und die Zellen über 14 Tage bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Die adipogene Differenzierung wurde mittels Oil-Red-Färbung analysiert. Dazu wurde die Färbelösung durch Zugabe von 0,5 g Oil Red O in 100 mL 99%-igem Isopropylalkohol hergestellt. Dann wurde die Lösung mit A.dest. auf 60% Isopropylalkohol verdünnt und anschließend filtriert. Vor der Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 10% Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit PBS wurden die Zellen für 5 min in 60% Isopropylalkohol inkubiert. Schließlich wurden die Zellen 10 min in der Oil Red O-Färbelösung inkubiert, anschließend zunächst mit 60% Isopropylalkohol und schließlich mit A.dest. gewaschen. Nach dem Trocknen wurden Bilder unter dem Mikroskop Olympus BX61 gemacht.

3.2.9 Osteogenes Differenzierungspotential der humanen Zellen

Für die Untersuchung des osteogenen Differenzierungspotenzials der Zellen wurden 1 x 10^4 Zellen/Well auf 48-Well-Platten ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurde das Kulturmedium gewechselt. Für die spontane Differenzierung wurden die Zellen in DMEM/10% FCS, in reinem DMEM oder in DMEM/1% FCS mit 20, 60 oder 80% CSF inkubiert. Für die induzierte Differenzierung wurden die Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium (10% Supplement im Basalmedium, PromoCell), in reinem Basalmedium oder im Basalmedium mit 10% Supplement sowie 20, 60 oder 80% CSF inkubiert. Das Medium wurde einmal pro Woche gewechselt und die Zellen wurden 14 Tage lang bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Die osteogene Differenzierung wurde durch Färbung mit Alizarin Rot S, welches extrazelluläre Kalziumablagerungen von mineralisierten Osteoblasten rot färbt, analysiert. Hierzu wurden die Zellen einmal mit PBS gespült und in 10%-iger Formaldehydlösung für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit A.dest. gewaschen und in Alizarin Rot S-Lösung (1% in 2%-igem Ethanol) für 5 min inkubiert. Die überschüssige Färbelösung wurde unter Leitungswasser abgewaschen. Nach dem Trocknen wurden Bilder mit dem Mikroskop Olympus BX61 aufgenommen.

3.2.10 Neuronales Differenzierungspotential der humanen Zellen

Zur Prüfung des neuronalen Differenzierungspotenzials wurden 1,5 x 10^4 Zellen/Well auf 4-Well-Kammer-Objektträger ausgesät. Die Zellen wurden entweder in neuronalem Differenzierungsmedium (10% Supplement im Basalmedium, PromoCell) oder in 80% CSF mit zusätzlich 10% Supplement im Basalmedium inkubiert. Das Medium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt und die Zellen wurden insgesamt 5 bis 10 Tage bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Schließlich wurde die neuronale Differenzierung mittels Immunfluoreszenz der beta-III-Tubulin-Expression analysiert. Dazu wurden die Zellen mit 4%-iger

Formaldehydlösung für 15 min bei 37 °C fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/1% Triton-X für 30 min permeabilisiert, mit PBS gespült und in PBS/3% BSA für 30 min bei RT inkubiert, um unspezifische Epitope zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem neuronalen Marker beta-III-Tubulin Antikörper (10 µg/mL in PBS/3% BSA; BD Bioscience) für 60 min bei RT im Dunkeln, gefolgt von einer Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 nach Herstellerangaben. Abschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM, Zeiss LSM 700) analysiert.

3.2.11 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm OriginPro 2017. Es wurde eine one-way-analysis-of-variance (ANOVA) durchgeführt. Als Test des Mittelwertvergleichs wurde ein Bonferroni-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf mindestens $p<0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

4.1. Viabilität von humanen olfaktorischen Stammzellen in CSF

Um die Lebensfähigkeit von humanen olfaktorischen Stammzellen (OSC) in CSF zu bestimmen, wurden die Zellen über verschiedene Zeiträume (1, 5, 14 und 21 Tage) in CSF-Konzentrationen von 10 bis 100% inkubiert.
Nach 24 h Inkubation waren sowohl olfaktorische Stammzellen aus der Epithelschicht (OSC ET; Abb. 2) als auch olfaktorische Stammzellen aus der Lamina propria (OSC LP) und BM-hMSC (Daten nicht gezeigt) lebensfähig und gleichmäßig in den Vertiefungen verteilt. Wie die Calcein-AM-Färbung in Abbildung 2 zeigt, waren weder Unterschiede zwischen den CSF-Konzentrationen 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% (Abb. 2A-J) noch im Vergleich zu den Kontrollproben DMEM (Abb. 2K) und DMEM/10% FCS (Abb. 2L) erkennbar.
Nach 5 Tagen Inkubation waren nur geringe Unterschiede im Vergleich zu 24 h Inkubation sichtbar (Abb. 3). Bei niedrigeren Konzentrationen von CSF (10-30%; Abb. 3A-C) war die Zelldichte im Vergleich zu höheren CSF-Konzentrationen (40-90% CSF; Abb. 3D-I) leicht vermindert. Im Vergleich zu der Positivkontrolle DMEM/10% FCS (Abb. 3L) zeigten sich bei den Konzentrationen 40-90% CSF (Abb. 3D-I) keine Unterschiede in der Zelldichte. Die negative Kontrollprobe, die nur DMEM enthielt (Abb. 3K), zeigte dagegen zusammen mit der Probe 100% CSF (Abb. 3J) die geringste Zelldichte im Vergleich zu allen anderen Proben. Außerdem nahm die Zelldichte in diesen beiden Proben nach 5 Tagen Inkubation auch im Vergleich zu 24 h Inkubation (Abb. 2J, K) stark ab. Offensichtlich haben sich die Zellen in diesen Ansätzen nicht vermehrt und sind, wahrscheinlich aufgrund des Mangels an essenziellen Nährstoffen, abgestorben.

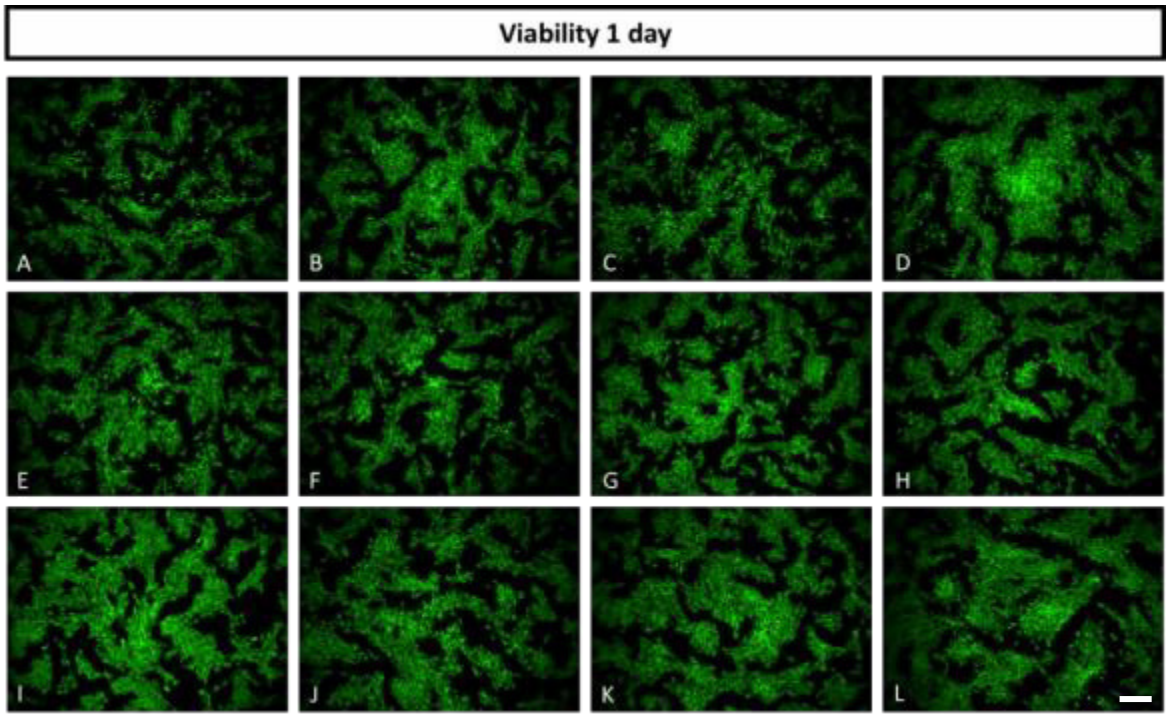


Abbildung 2: Viabilität von olfaktorischen Stammzellen in CSF nach 24 h Inkubation, gefärbt mit Calcein-AM (grün). (A-J) Viabilität von OSC ET in 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% CSF, (K) in DMEM (Negativkontrolle) und (L) in DMEM/10% FCS (Positivkontrolle). Nach 24 h Inkubation in verschiedenen Konzentrationen von CSF, DMEM und DMEM/10% FCS sind keine Unterschiede in der Zelldichte zwischen den verschiedenen Ansätzen zu erkennen. Maßstab unten rechts ≙ 400 µm.

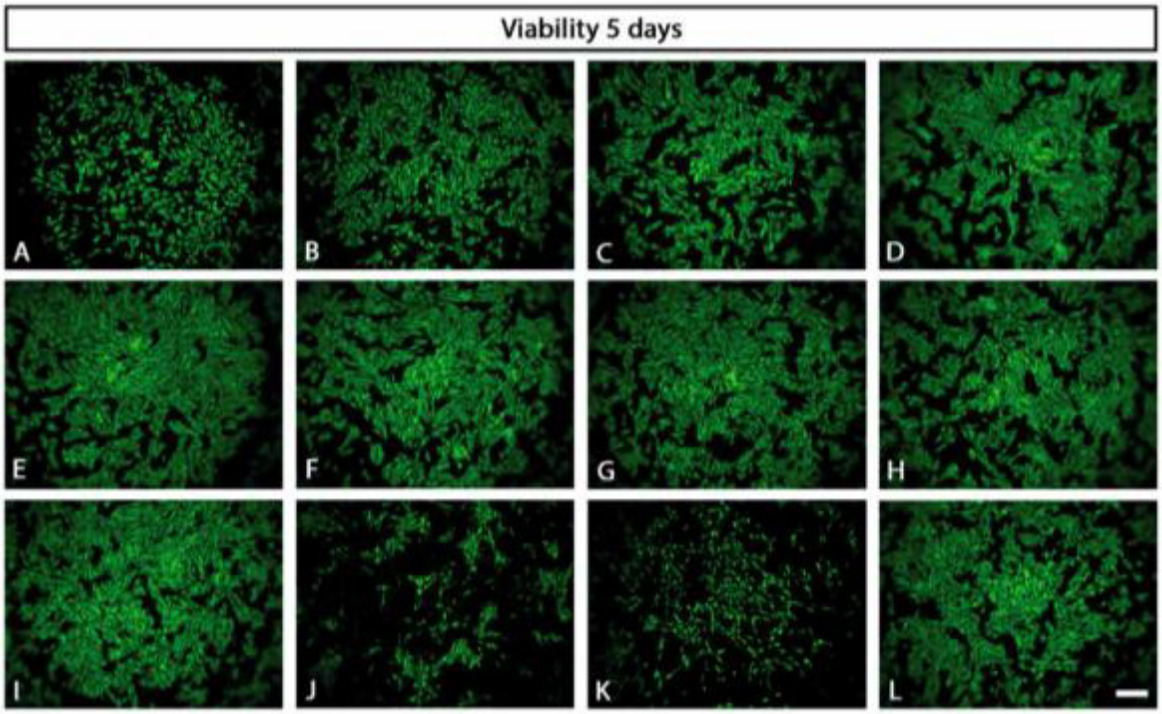


Abbildung 3: Viabilität von olfaktorischen Stammzellen in CSF nach 5 Tagen Inkubation, gefärbt mit Calcein-AM (grün). (A-J) Viabilität von OSC ET in 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% CSF, (K) in DMEM (Negativkontrolle) und (L) DMEM/10% FCS (Positivkontrolle). Niedrigere Konzentrationen von CSF (10-30%) führen zu reduzierter Zelldichte (A-C). Die Proben DMEM (K) und 100% CSF (J) zeigen das geringste Zellüberleben. Die CSF-Konzentrationen 40-90% (D-I) und die Positivkontrolle (L) zeigen ähnliche Zelldichten. Maßstab unten rechts ≙ 400 µm.

Größere Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen konnten nach 14 Tagen Inkubation beobachtet werden (Abb. 4). Die Zelldichte in 10% CSF (Abb. 4A) nahm stark ab, ebenso in höheren CSF-Konzentrationen von 90 und 100% (Abb. 4I, J), während 20 und 80% CSF (Abb. 4B, H) nur eine geringe Reduktion verursachten. Die Kontrollprobe DMEM (Abb. 4K) wies nur wenige lebensfähige Zellen (grün), aber viele tote Zellen (rot) auf, vergleichbar mit 90 und 100% CSF (Abb. 4I, J). Im Gegensatz zu allen anderen Proben wies die positive Kontrollprobe DMEM/10% FCS die höchste Zelldichte auf.
Bei längerer Inkubation über 21 Tage (Daten nicht gezeigt) nahm die Anzahl der lebensfähigen Zellen in allen Konzentrationen von CSF und reinem DMEM stark ab, sodass fast keine lebenden Zellen mehr gefunden werden konnten, während die starke Überlebensrate in der Kontrollprobe DMEM/10% FCS erhalten blieb.

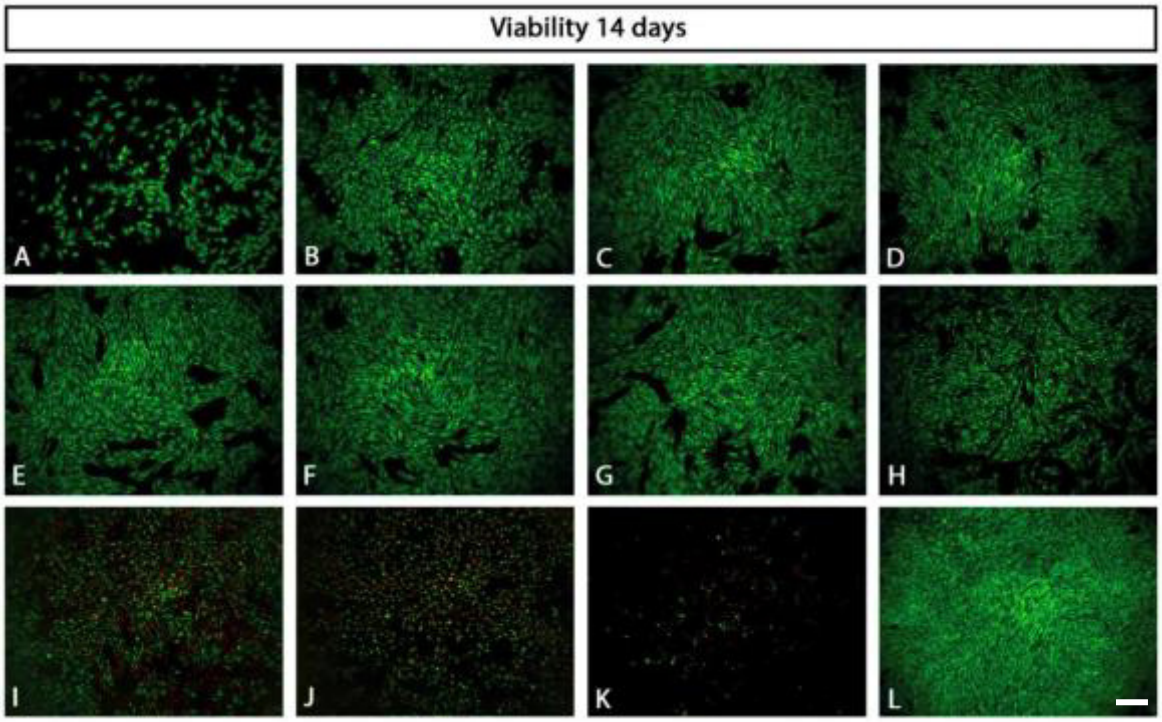


Abbildung 4: Viabilität von olfaktorischen Stammzellen in CSF nach 14 Tagen Inkubation, gefärbt mit Calcein-AM (grün) und PI (rot). (A-J) Viabilität von OSC ET in 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100% CSF, (K) in DMEM (Negativkontrolle) und (L) DMEM/10% FCS (Positivkontrolle). Nach 14 Tagen zeigt 10% CSF (A) eine geringere Zelldichte im Vergleich zu Konzentrationen von 20-80% CSF (B-H). 90% (I) und 100% CSF (J) zeigen neben geringerer Zelldichte auch viele tote Zellen, die mit PI (rot) angefärbt wurden. Die Negativkontrolle DMEM (K) zeigt die geringste Zellüberlebensrate, während die Positivkontrollprobe DMEM/10% FCS (K) die höchste Zelldichte aufweist. Maßstab unten rechts ≙ 400 µm.

4.2 Viabilität von humanen mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen in CSF und der Einfluss von FCS

Um die Viabilität in Gegenwart verschiedener CSF-Konzentrationen zu bestimmen und das Überleben der Zellen über längere Zeiträume zu gewährleisten, wurden alle getesteten Zelltypen (BM-hMSC, OSC ET und OSC LP) zunächst mit der gleichen Menge an Protein versorgt (10% FCS). Um nun die minimale Protein-Konzentration zu finden, die für ein vergleichbares Überleben der verschiedenen Zelltypen während der Langzeitkultivierung erforderlich ist, wurden OSC und BM-hMSC für 21 Tage in DMEM kultiviert, das mit

verschiedenen Konzentrationen an FCS (0-10%) komplementiert wurde. Nach der Inkubation wurde die Viabilität mittels Calcein-AM-Färbung und AlamarBlue-Assay analysiert.

Die qualitative Analyse des Einflusses der FCS-Konzentration auf die Zellviabilität mittels Calcein-AM-Färbung ist am Beispiel der BM-hMSC in Abbildung 5 dargestellt. Bei FCS-Konzentrationen von 10 und 1% war die Zelldichte von BM-hMSC vergleichbar (Abb. 5A, B), während bei 0,5% FCS die Anzahl vitaler Zellen reduziert war (Abb. 5C), und bei 0,01% FCS nur noch wenige vitale Zellen detektiert wurden (Abb. 5D).

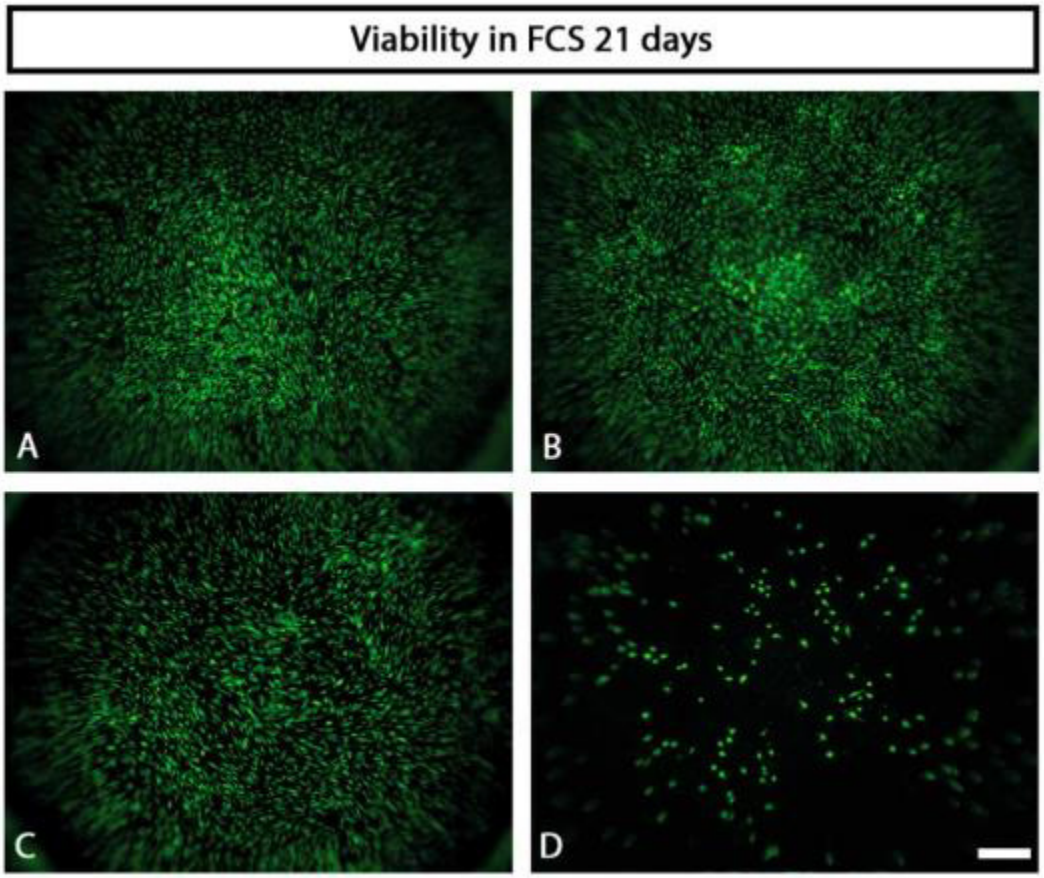


Abbildung 5: Viabilität von BM-hMSC in Gegenwart verschiedener FCS-Konzentrationen nach 21 Tagen Inkubation, gefärbt mit Calcein-AM (grün). Für die Konzentrationen von 10% (A) und 1% (B) FCS sind keine großen Unterschiede der Zelldichte zu erkennen, während niedrigere Konzentrationen von 0,5% (C) und 0,01% FCS (D) zu einer Reduktion der Anzahl vitaler Zellen führen. Maßstab unten rechts ≙ 400 µm.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch im Zuge der quantitativen Auswertung mittels AlamarBlue-Assay anhand der Resorufin-Emissionsintensität erzielt, wie in Abbildung 6 für die drei Zelltypen BM-hMSC, OSC ET und OSC LP dargestellt. Die Emission des Farbstoffs wurde dabei jeweils auf die Ansätze mit 10% FCS normalisiert. Ähnliche Emissionsintensitäten zwischen verschiedenen Proben eines Zelltyps implizieren hierbei ein ähnliches Zellüberleben und eine ähnliche Zellproliferation, während eine geringere Emission eine Reduzierung des Zellüberlebens / der Zellproliferation bedeutet.
Insbesondere für die Zelltypen BM-hMSC und OSC ET nahm die Emission der Zellen, die in Gegenwart niedrigerer FCS-Konzentrationen unterhalb von 0,5% inkubiert wurden, im Vergleich zu den Ansätzen mit 10% FCS tendenziell ab, bis hin zu einer Reduktion von mehr

als 50% ab 0,25% FCS (Abb. 6). Insgesamt ergaben sich jedoch für FCS-Konzentrationen zwischen 10 und 1% keine signifikanten Unterschiede, was für eine unveränderte Überlebensrate der verschiedenen Zelltypen in diesem Konzentrationsbereich spricht.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Untersuchungen zum Einfluss von CSF auf die Zellviabilität und Zellfunktionalität 1% FCS als Standard-Konzentration eingesetzt.

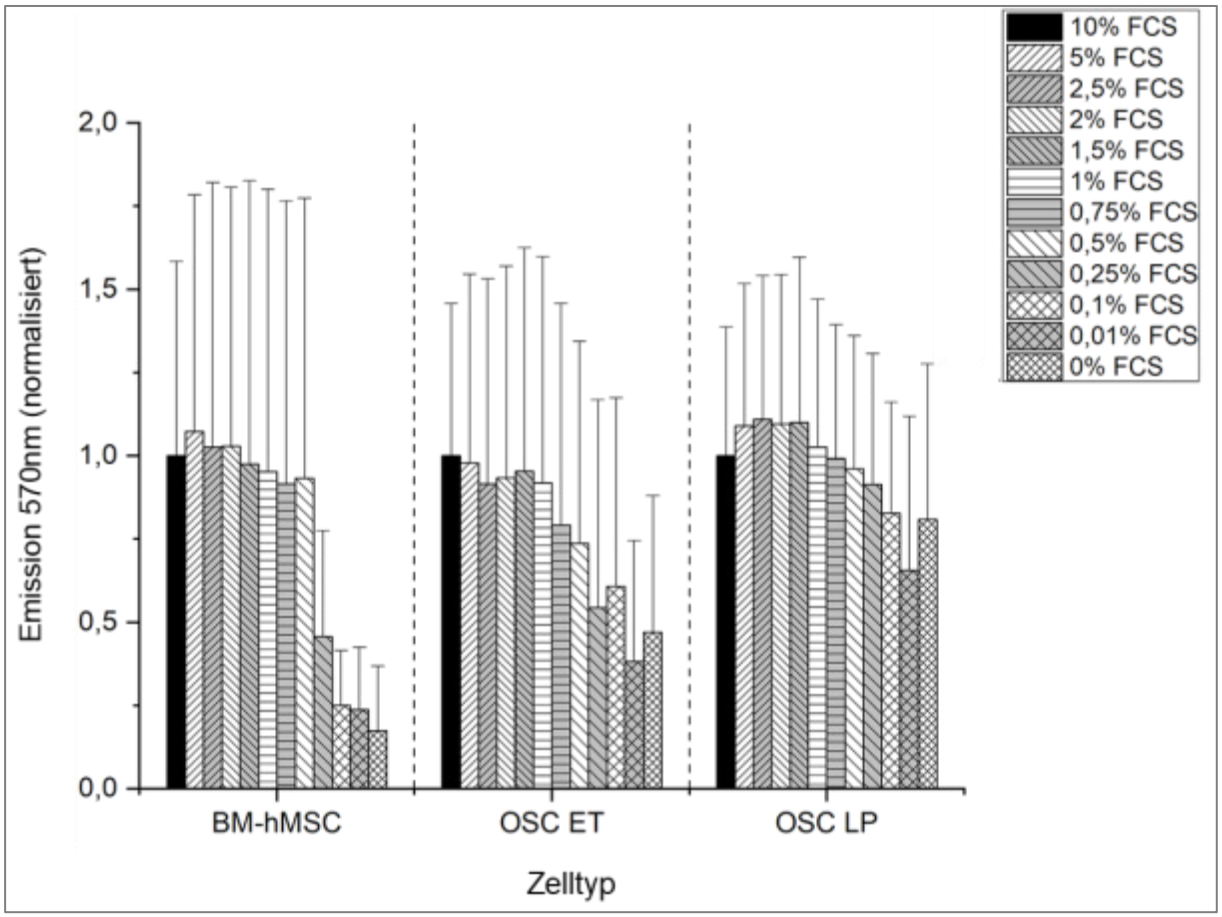


Abbildung 6: Viabilität von BM-hMSC, OSC ET und OSC LP in Gegenwart verschiedener FCS-Konzentrationen nach 21 Tagen Kultivierung. Die Quantifizierung der Zellviabilität erfolgte mittels AlamarBlue-Assay, die Emission des Farbstoffs wurde dabei auf 10% FCS normalisiert (≙ 1,0). Für die Zelltypen BM-hMSC und OSC ET nimmt die Emission der Zellen bei niedrigen FCS-Konzentrationen (≤ 0,5%) tendenziell ab, bis hin zu einer Reduktion von mehr als 50% (≤ 0,25% FCS). Insgesamt ergeben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede für den Konzentrationsbereich zwischen 10 und 1% FCS, was für eine unveränderte Überlebensrate der verschiedenen Zelltypen spricht. n=3 unabhängige Experimente; pro Zelltyp wurden Isolate von 6 Biopsien analysiert. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt.

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen Zellentypen in DMEM/1% FCS, ergänzt mit verschiedenen Konzentrationen an CSF über 7 und 21 Tage inkubiert und die Zellüberlebensrate / Zellproliferation erneut mittels AlamarBlue-Assay quantifiziert. Die Ergebnisse des AlamarBlue-Assays sind in Abbildung 7 dargestellt, wobei die Emissionsintensitäten für alle drei Zelltypen wieder auf die Kontrollprobe (DMEM/10% FCS) normalisiert wurden.

Nach 7 Tagen Inkubation in Gegenwart von CSF war eine tendenzielle Steigerung der Emissionsintensität von BM-hMSC mit zunehmender CSF-Konzentration zu beobachten, dabei war der höchste Wert bei 80% CSF zu verzeichnen. Es wurden jedoch keine

statistisch signifikanten Effekte detektiert. OSC ET zeigten vergleichbare Emissionsintensitäten in Gegenwart der verschiedenen CSF-Konzentrationen, ähnlich wie in DMEM/10% FCS. Die niedrigste Zellüberlebensrate war in reinem DMEM ohne Proteinzusatz (Negativkontrolle) sowie bei 100% CSF zu beobachten. Im Falle der OSC LP wurden tendenziell höhere Emissionsintensitäten bei allen CSF-Konzentrationen (mit Ausnahme von 100%) im Vergleich zur Inkubation in DMEM/10% FCS detektiert, allerdings keine statistische Signifikanz.

Insgesamt deuten die Ergebnisse der Viabilitäsanalyse nach 7 Tagen Inkubation darauf hin, dass es für die untersuchten Zelltypen keine signifikante Verringerung des Zellüberlebens / der Zellproliferation gibt, wenn die Zellen in Kontakt mit CSF kultiviert werden, solange sie mit genügend zusätzlichen Proteinen (FCS) versorgt werden.

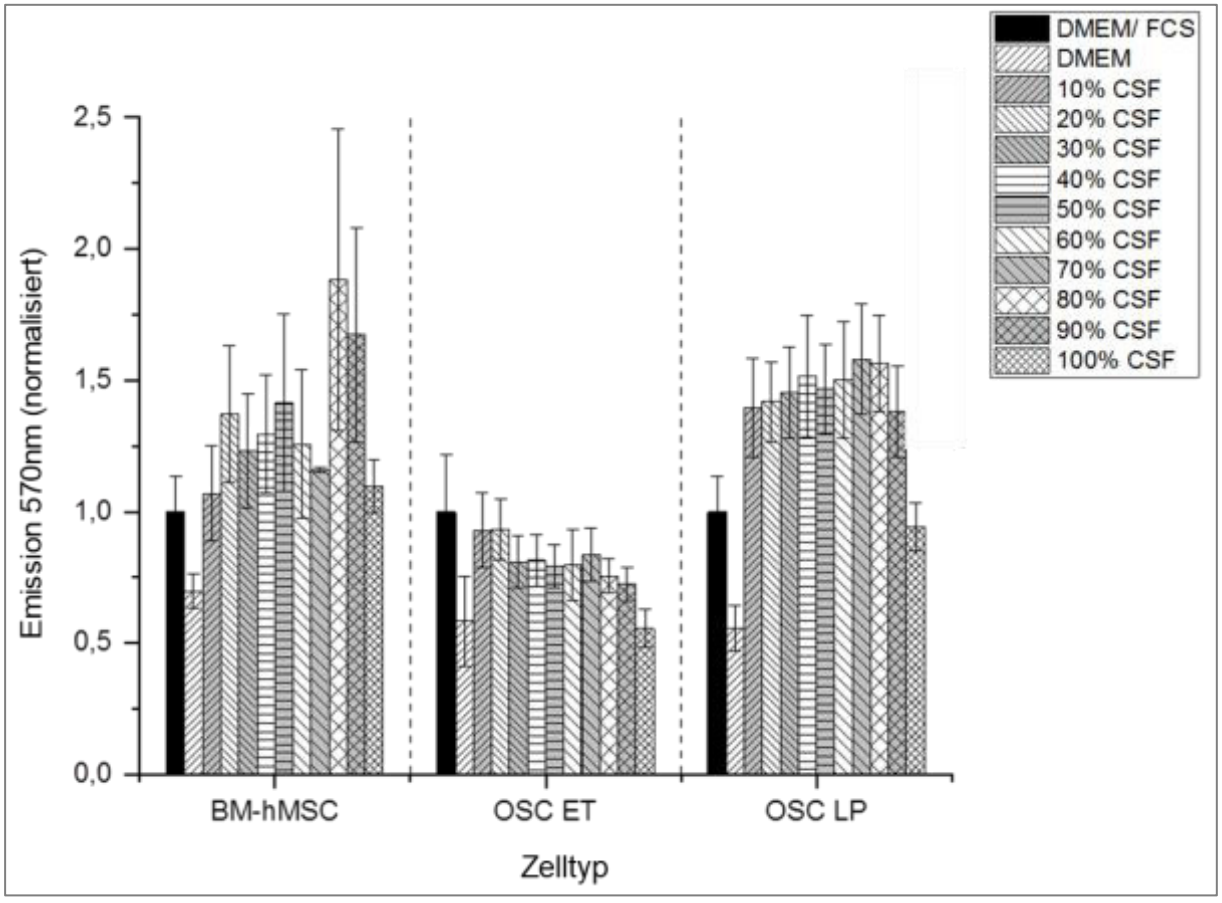


Abbildung 7: Viabilität von BM-hMSC, OSC ET und OSC LP in Gegenwart verschiedener CSF-Konzentrationen nach 7 Tagen Kultivierung. Die Quantifizierung der Zellviabilität erfolgte mittels AlamarBlue-Assay, die Emission des Farbstoffs wurde dabei auf 10% FCS normalisiert (≙ 1,0). Für die Zelltypen BM-hMSC und OSC LP nimmt die Emission der Zellen in Gegenwart von CSF tendenziell zu, während für OSC ET vergleichbare Emissionsintensitäten in Gegenwart der verschiedenen CSF-Konzentrationen zu beobachten sind. Insgesamt kann keine signifikante Verringerung des Zellüberlebens in Kontakt mit CSF identifiziert werden, solange ausreichend FCS zugesetzt wird. n=3 unabhängige Experimente; pro Zelltyp wurden Isolate von 6 Biopsien analysiert. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt.

Die Ergebnisse des AlamarBlue-Assays nach 21 Tagen Inkubation in Gegenwart verschiedener CSF-Konzentrationen sind in Abbildung 8 dargestellt (Emissionsintensitäten für alle drei Zelltypen auf die Kontrollprobe DMEM/10% FCS normalisiert).

Für die BM-hMSC konnte eine signifikant erhöhte Emissionsintensität von Zellen, die in DMEM/10% FCS kultiviert wurden, gegenüber denen, die in Gegenwart verschiedener CSF-Konzentrationen kultiviert wurden, beobachtet werden. Die Emissionsintensität, und damit die Zellüberlebensrate, nahm dabei tendenziell mit zunehmendem CSF-Gehalt ab, wobei die geringsten Intensitäten in DMEM ohne FCS und in 100% CSF zu beobachten waren. In Übereinstimmung mit der qualitativen Untersuchung (vgl. Kapitel 4.1) war bei OSC aus der ET eine signifikante Abnahme der Emissionsintensität nur bei Zellen zu erkennen, die in DMEM ohne FCS und in CSF-Konzentrationen ≥ 80% CSF kultiviert wurden. Auch bei OSC aus der LP wurden in DMEM/10% FCS die höchsten Intensitäten gemessen. Eine signifikante Verminderung der Viabilität wurde hier lediglich bei Zellen, die in reinem DMEM sowie in 100% CSF kultiviert wurden, beobachtet.

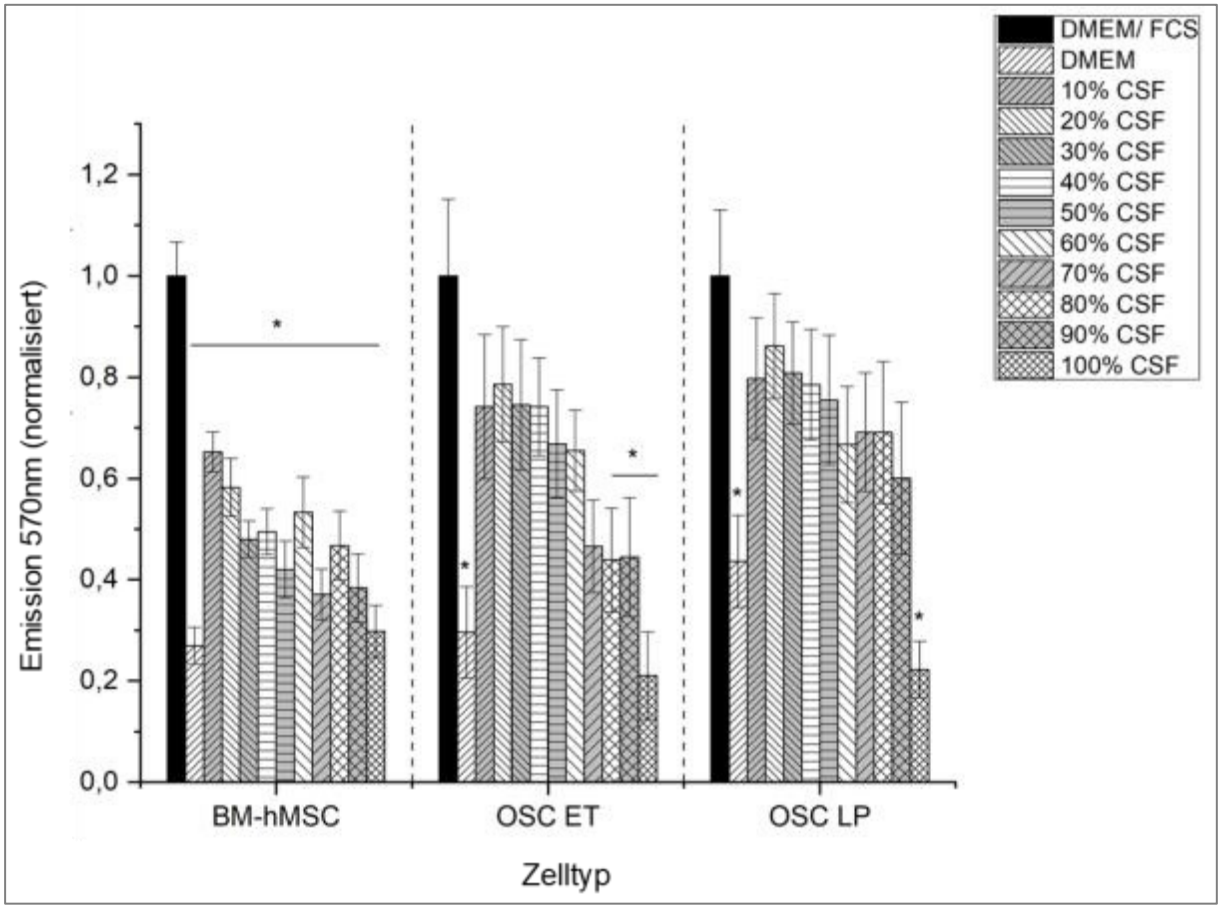


*Abbildung 8: Viabilität von BM-hMSC, OSC ET und OSC LP in Gegenwart verschiedener CSF-Konzentrationen nach 21 Tagen Inkubation. Die Quantifizierung der Zellviabilität erfolgte mittels AlamarBlue-Assay, die Emission des Farbstoffs wurde dabei auf 10% FCS normalisiert (≙ 1,0). Insbesondere für BM-hMSC kommt es zur Reduktion der Zellüberlebensrate mit steigendem CSF-Anteil, während in den Kontrollproben DMEM/10% FCS die Viabilität der Zellen erhalten bleibt. Im Vergleich zu reinem DMEM ohne FCS kann jedoch eine tendenzielle Erhöhung der Zellviabilität nach Zugabe von CSF beobachtet werden, was gegen adverse Effekte von CSF auf die Lebensfähigkeit der Zellen spricht. n=3 unabhängige Experimente; pro Zelltyp wurden Isolate von 6 Biopsien analysiert. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt; *p≤0,05.*

Die Analyse der Zellviabilität nach 21 Tagen Inkubation ergab für die untersuchten Zelltypen, insbesondere für BM-hMSC, eine Reduktion der Zellüberlebensrate mit steigendem CSF-Anteil, während in den Kontrollproben DMEM/10% FCS die Viabilität der Zellen erhalten blieb. Diese Ergebnisse können sehr wahrscheinlich auf eine Erschöpfung der Kulturen in

Bezug auf Nährstoffe in Gegenwart höherer CSF-Konzentrationen während der prolongierten Inkubationszeit von 21 Tagen zurückgeführt werden. Im Vergleich zu reinem DMEM ohne FCS konnte jedoch eine tendenzielle Erhöhung der Zellviabilität nach Zugabe von CSF beobachtet werden, was gegen adverse Effekte von CSF auf die Lebensfähigkeit der Zellen sprechen würde. Dieser Befund musste mit sensitiveren Methoden näher untersucht werden, daher wurde die Zellproliferation zusätzlich mit dem Click-iT® EdU Imaging Kit analysiert.

4.3 Zellproliferation von humanen mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen in CSF

Zur Quantifizierung der Zellproliferation mesenchymaler und olfaktorischer Stammzellen in Gegenwart verschiedener CSF-Konzentrationen wurde zusätzlich zur AlamarBlue-Analyse das sensitivere Proliferationsanalyse-System „Click-iT® EdU Imaging Kit“ verwendet. Dieser Zellproliferations-Assay basiert auf dem Einbau von EdU in neu synthetisierte DNA, welches anschließend anhand seiner Emission bei 496 nm detektiert werden kann.
Wie zuvor wurde die Proliferation von BM-hMSC, OSC ET und OSC LP nach 7 und 21 Tagen Inkubation untersucht, wobei nur die Konzentrationen 20, 40, 60 und 80% CSF in DMEM/1% FCS im Vergleich zu DMEM/10% FCS analysiert wurden. Die Ergebnisse des EdU-Assays sind in Abbildung 9 dargestellt.

Nach 7 Tagen Inkubation zeigten sich bei den BM-hMSC nur sehr geringe Variationen zwischen den verschiedenen Ansätzen. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen in DMEM/10% FCS und in Gegenwart von CSF inkubierten Gruppen erkennen. Bei der Inkubation über 21 Tage wurden bei 20 und 40% CSF die geringsten Emissionsintensitäten und damit entsprechend die geringste EdU-Inkorporation detektiert, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollprobe mit DMEM/10% FCS identifiziert werden. Für OSC ET ließen sich sowohl nach 7 als auch nach 21 Tagen Kultivierung ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der EdU-Inkorporation feststellen. Bei OSC LP konnte nach 7 Tagen eine tendenzielle Erhöhung der Emissionsintensität unter Einfluss von CSF beobachtet werden, jedoch waren auch diese Effekte weder im Vergleich zur Kontrollprobe noch im Vergleich der verschiedenen CSF-Konzentration untereinander signifikant. Nach 21 Tagen waren die Proliferationsraten unter allen Bedingungen auf vergleichbarem Niveau.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass verschiedene CSF-Konzentrationen sowohl nach Kurzzeitinkubation von 7 Tagen als auch nach Langzeitinkubation von 21 Tagen keine statistisch relevanten Effekte auf die Zellproliferation haben. Somit konnten weder negative noch positive Effekte von CSF auf die Zellproliferation beobachtet werden.

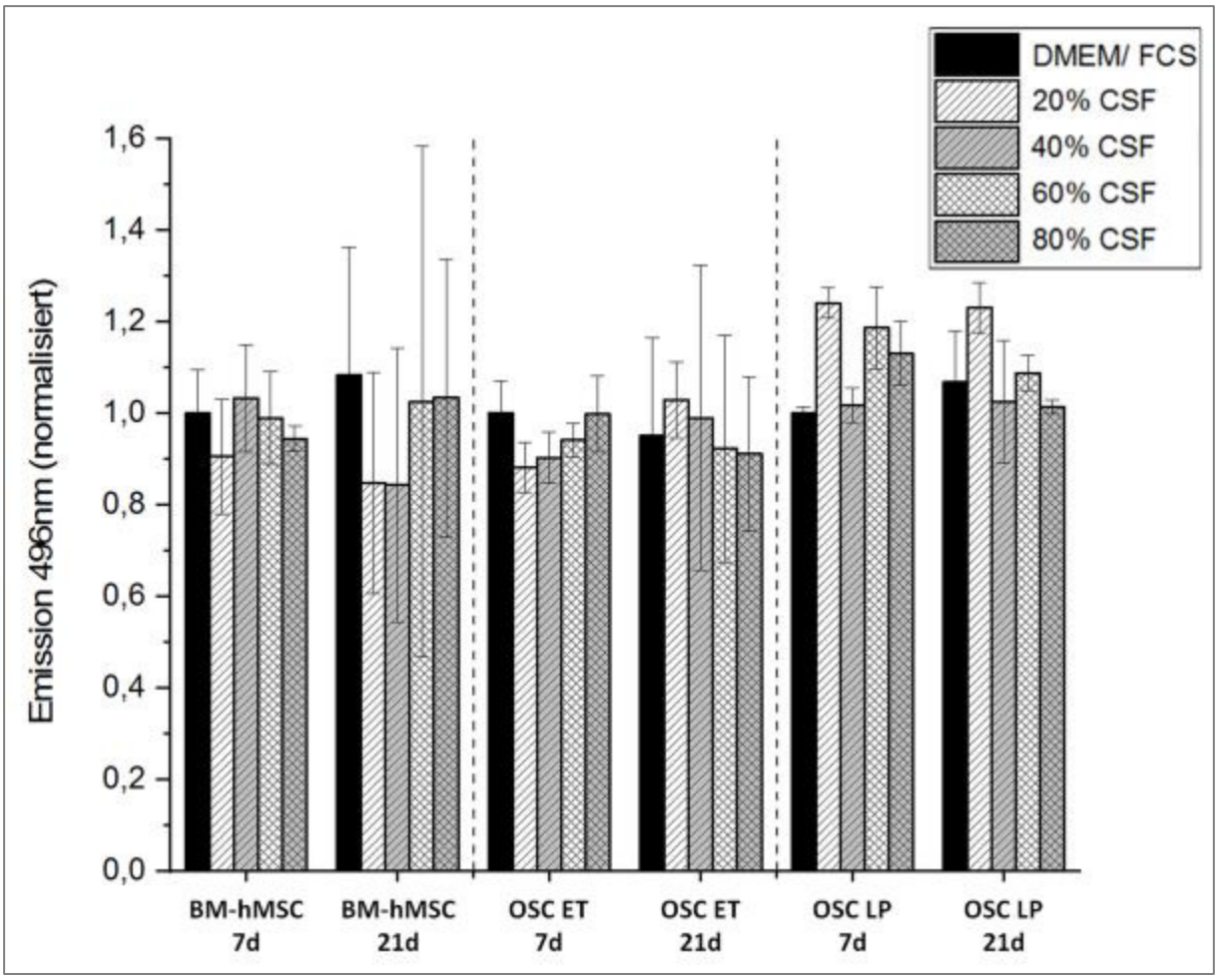


Abbildung 9: Zellproliferation von BM-hMSC, OM ET und OM LP in Gegenwart verschiedener CSF-Konzentrationen nach 7 und 21 Tagen Kultivierung. Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgte mittels EdU-Zellproliferations-Assay, die Emissionsintensität der EdU-Inkorporation wurde dabei auf 10% FCS normalisiert (≙ 1,0). Für alle Zelltypen können weder nach 7 noch nach 21 Tagen Inkubation statistisch signifikante Einflüsse von CSF auf die Zellproliferation identifiziert werden. n=3 unabhängige Experimente; pro Zelltyp wurden Isolate von 6 Biopsien analysiert. Die Daten sind als Mittelwert ± SD dargestellt.

4.4 Migrationseigenschaften von humanen mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen

Neben dem Zellüberleben und der Zellproliferation ist die Zellmigration ein weiterer wichtiger Faktor der Zellfunktionalität. Um die Zellmigration zu untersuchen, wurde der sogenannte Scratch Assay durchgeführt. Hierfür wurden Zellen in hoher Dichte auf 24-Well-Platten ausgesät und ein Kratzer durch die Mitte des Wells gezogen. Anschließend wurde die Zellmigration in Richtung des Spalts für bis zu 48 Stunden beobachtet, bis der Spalt vollständig geschlossen war. Die Zellmigration wurde für DMEM/10% FCS als Kontrollprobe sowie für 80% CSF ohne FCS und 80% CSF mit zusätzlich 1% FCS analysiert. Die Ergebnisse der Zellmigration von BM-hMSC, OSC ET und OSC LP sind in den Abbildungen 10 bis 12 dargestellt.

Die Migration der BM-hMSC in den applizierten Spalt (Abb. 10A, E, I) konnte in allen Ansätzen nach 6 Stunden Inkubation beobachtet werden (Abb. 10B, F, J). Nach 12 Stunden

war bereits eine deutlich sichtbare Anzahl an Zellen in die Mitte des Spalts eingewandert, insbesondere in den beiden Ansätzen mit 80% CSF (Abb. 10G, K), wo der Spalt zu diesem Zeitpunkt bereits teilweise verschlossen war (oberer Teil Abb. 10G, unterer Teil 10K). Nach insgesamt 24 Stunden Inkubation war in allen drei Ansätzen kein sichtbarer Spalt mehr vorhanden (Abb. 10D, H, L). Demnach lag keine Beeinträchtigung der Zellmigration für BM-hMSC vor.

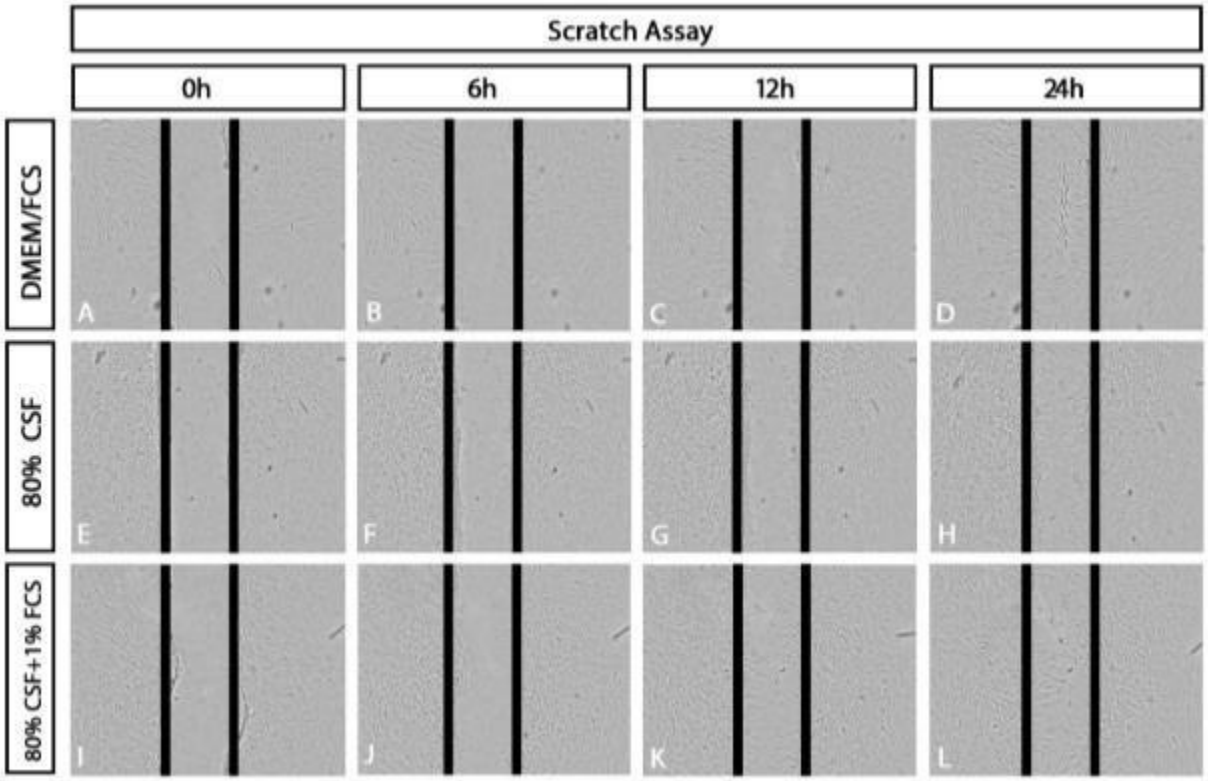


Abbildung 10: Zellmigration von BM-hMSC in Gegenwart von CSF. (A-D) Zellmigration in Kontrollprobe DMEM/10% FCS; (E-H) Zellmigration in 80% CSF ohne zusätzliche Proteine und (I-L) Zellmigration in 80% CSF mit zusätzlich 1% FCS. Es wurde jeweils ein Kratzer in die Mitte einer dichten Zellschicht appliziert. Der Lückenschluss ist 0, 6, 12 und 24 h nach dem Einritzen dargestellt. In allen drei Bedingungen war der Spalt nach 24 h geschlossen. Die schwarzen Balken deuten die ursprünglichen Grenzen des Spaltes an.

Für OSC ET waren, ähnlich wie im Falle der BM-hMSC, 6 Stunden nach dem Applizieren der Kratzer in die Zellschicht unter allen drei Inkubationsbedingungen in den Spalt eingewanderte Zellen zu beobachten (Abb. 11A, E, I und 11B, F, J). Nach 12 Stunden waren bereits so viele Zellen eingewandert, dass nur noch ein schmaler Spalt ohne Zellen zu sehen war (Abb. 11C, G, K). Nach 18 Stunden Inkubation bedeckten die OSC ET den ursprünglichen Spalt unter allen drei Bedingungen vollständig (Abb. 11D, H, I). Es konnten also keine sichtbaren Unterschiede in der Zellmigration beobachtet werden, sodass durch die Zugabe von CSF das Migrationspotenzial von OSC ET nicht beeinträchtigt wurde.
Im Falle der OSC LP wurden die ersten in den Spalt einwandernden Zellen nach 12 Stunden Inkubation beobachtet (Abb. 12B, F, J). Nach 24 Stunden waren bereits größere Teile des ursprünglichen Spaltes verschlossen (Abb. 13C, G, K). Im Gegensatz zu den BM-hMSC und OSC ET (Abb. 10 und 11) konnte ein vollständiger Lückenschluss jedoch erst nach 30 Stunden Inkubation beobachtet werden (Abb. 12D, H, L). Im Vergleich zu der Kontrollprobe DMEM/10% FCS konnte aber kein Unterschied festgestellt werden, sodass

auch für die OSC LP keine Beeinträchtigung der Zellmigration durch Zugabe von CSF vorhanden war.

Insgesamt hat die Migrationsanalyse gezeigt, dass das Migrationspotenzial der BM-hMSC und der olfaktorischen Stammzellen (ET, LP) nicht durch CSF beeinflusst wurde. Es kam weder zu einer Abnahme noch zu einer deutlichen Zunahme der Migration, was darauf hinweist, dass wichtige Migrationseigenschaften im Kontakt mit CSF erhalten blieben.

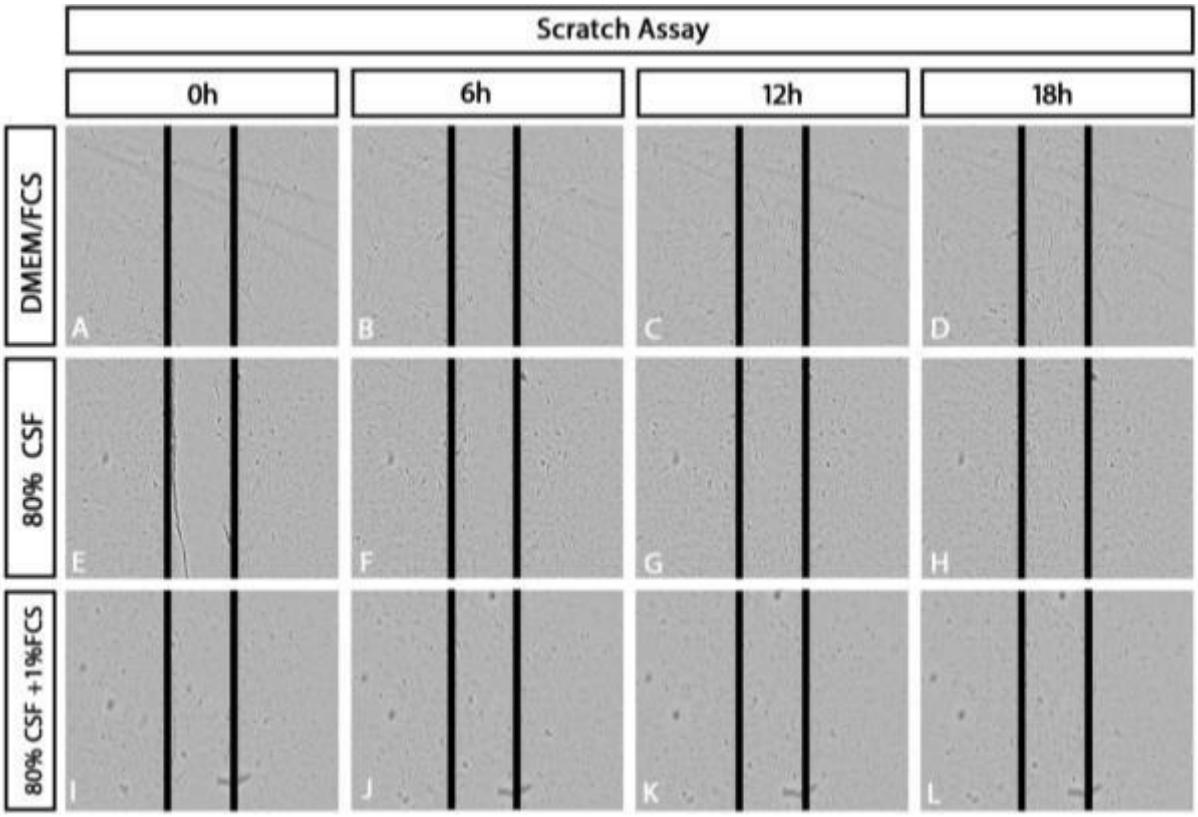


Abbildung 11: Zellmigration von OSC ET in Gegenwart von CSF. (A-D) Zellmigration in Kontrollprobe DMEM/10% FCS; (E-H) Zellmigration in 80% CSF ohne zusätzliche Proteine und (I-L) Zellmigration in 80% CSF mit zusätzlich 1% FCS. Es wurde jeweils ein Kratzer in die Mitte einer dichten Zellschicht appliziert. Der Lückenschluss ist 0, 6, 12 und 18 h nach dem Einritzen dargestellt. In allen drei Bedingungen war der Spalt nach 18 h geschlossen. Die schwarzen Balken zeigen den Spalt an.

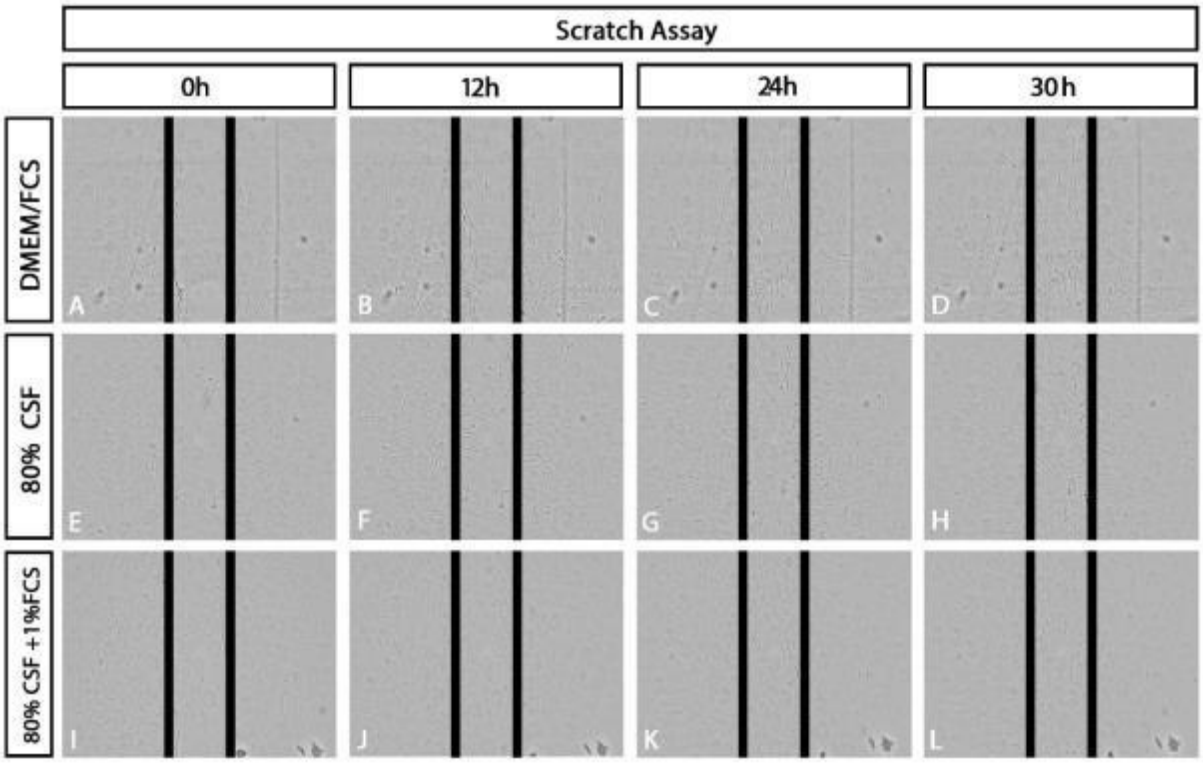


Abbildung 12: Zellmigration von OSC LP in Gegenwart von CSF. (A-D) Zellmigration in Kontrollprobe DMEM/10% FCS; (E-H) Zellmigration in 80% CSF ohne zusätzliche Proteine und (I-L) Zellmigration in 80% CSF mit zusätzlich 1% FCS. Es wurde jeweils ein Kratzer in die Mitte einer dichten Zellschicht appliziert. Der Lückenschluss ist 0, 12, 24 und 30 h nach dem Einritzen dargestellt. In allen drei Bedingungen war der Spalt nach 30 h geschlossen. Die schwarzen Balken deuten die ursprünglichen Grenzen des Spaltes an.

4.5 Chondrogenes Differenzierungspotential von humanen mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen

Zur Untersuchung des spontanen Differenzierungspotentials wurden BM-hMSC, OSC ET und OSC LP über 2 Wochen in verschiedenen Konzentrationen von CSF (in DMEM/1% FCS) sowie in DMEM/10% FCS und reinem DMEM (Kontrollproben) inkubiert. Für die induzierte Differenzierung wurde statt DMEM chondrogenes Differenzierungsmedium (10% Supplement im Basalmedium) verwendet. Bei der chondrogenen Differenzierung bilden die Zellen chondrogene Pellets, die nach der Alcianblau-Färbung als runde und sehr dichte Zellhaufen von dunkelblauer Farbe erscheinen. Die blaue Farbe zeigt die Synthese von Proteoglykanen durch Chondrozyten an. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13 bis 15 dargestellt.

Nach 2 Wochen Inkubation zeigten BM-hMSC keine spontane Differenzierung, weder in den Kontrollproben DMEM/10% FCS und DMEM (Abb. 13A und 13E) noch in 20, 60 oder 80% CSF (Abb. 13B, C, D). In allen fünf Ansätzen waren die Zellen gleichmäßig in den Zellkulturwells verteilt mit diffuser hellblauer Färbung. Im Gegensatz dazu führte die Induktion der chondrogenen Differenzierung mittels des komplementierten Differenzierungsmediums zur Bildung chondrogener Pellets (Abb. 13F-J). In der Positivkontrolle wurde ein dunkelblaues, klar abgegrenztes Zellpellet in der Mitte des Wells detektiert (Abb. 13F). In Gegenwart von zusätzlich 20% CSF differenzierten BM-hMSC

ebenfalls und bildeten ein chondrogenes Pellet, welches hier aber von nicht-differenzierten Zellen umgeben war (Abb. 13G). Bei Erhöhung des CSF-Gehalts auf 60% war ein chondrogenes Pellet ebenfalls gut zu erkennen und dunkelblau gefärbt, aber von einem Ring aus heller gefärbten sowie nicht-differenzierten Zellen umgeben (Abb. 13H). Bei 80% CSF wurde kein deutliches chondrogenes Pellet mehr ausgebildet (Abb. 13I). Hier konnte lediglich ein rundlicher, dunkelblauer Zellhaufen mit helleren Anteilen detektiert werden, wobei die umgebenden Zellen hier dichter waren als in allen anderen Proben. In der negativen Kontrollprobe (reines Basalmedium) bildeten die Zellen wenige sternförmige Zellhaufen, die hellblau gefärbt waren, aber kein ausgeprägtes chondrogenes Pellet (Abb. 13J).

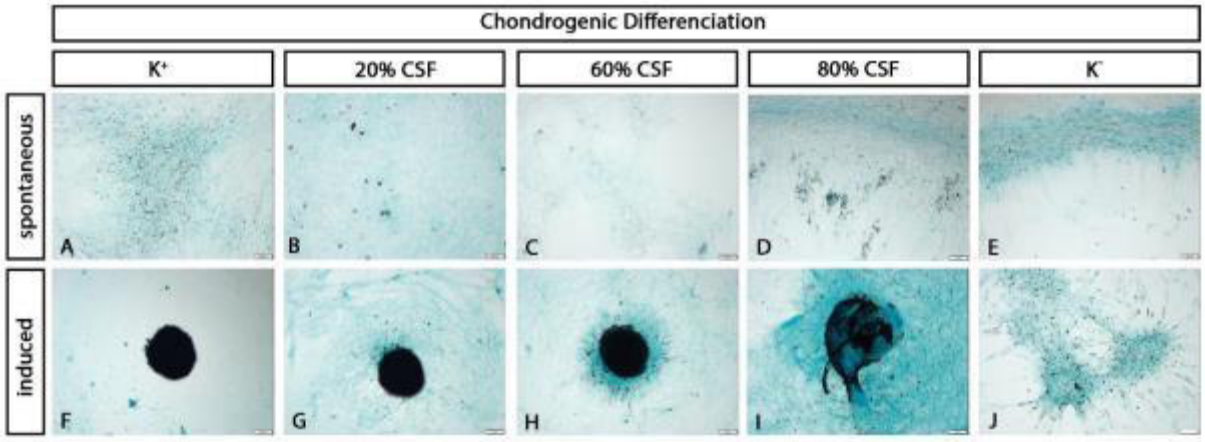


Abbildung 13: Chondrogene Differenzierung von BM-hMSC. (A-E) Spontane Differenzierung in (A) DMEM/10% FCS, (B-D) DMEM/1% FCS mit 20, 60 und 80% CSF und (E) DMEM. (F-J) Induzierte Differenzierung im (F) Differenzierungsmedium, (G-I) Differenzierungsmedium mit 20, 60 und 80% CSF und (J) Basalmedium. Spontane chondrogene Differenzierung von BM-hMSC tritt nicht auf, während eine induzierte Differenzierung in allen Ansätzen zu sehen ist. In reinem Basalmedium ist kein ausgeprägtes chondrogenes Pellet zu sehen, die Zellen sind jedoch zusammengerückt und bilden sternförmige Zellcluster. Die Zellen sind mit Alcianblau gefärbt, um sezernierte Proteoglykane zu markieren (dunkelblau). Maßstab unten rechts ≙ 100 µm.

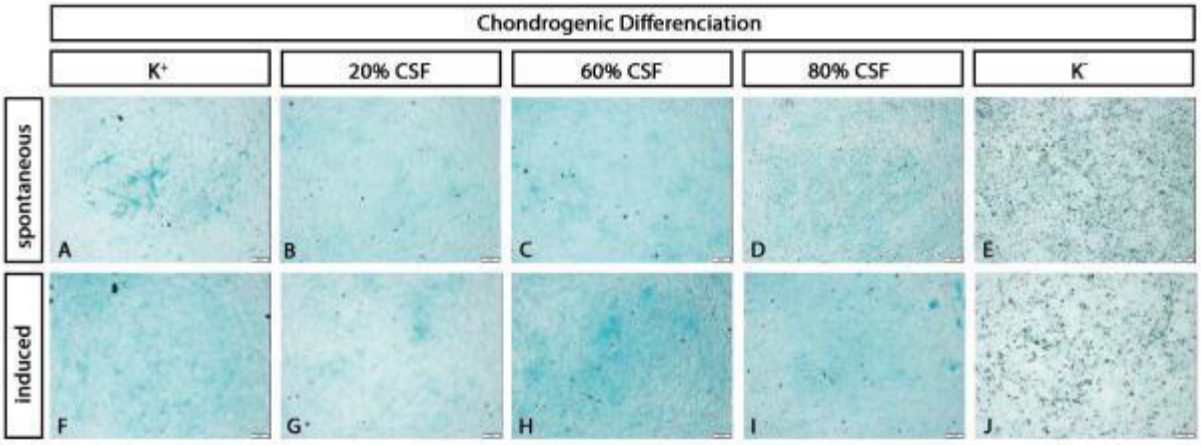


Abbildung 14: Chondrogene Differenzierung von OSC ET. (A-E) Spontane Differenzierung in (A) DMEM/10% FCS, (B-D) DMEM/1% mit 20, 60 und 80% CSF und (E) DMEM. (F-J) Induzierte Differenzierung in (F) Differenzierungsmedium, (G-I) Differenzierungsmedium mit 20, 60 und 80% CSF und (J) Basalmedium. Olfaktorische Stammzellen OSC ET zeigen weder eine spontane noch eine induzierte chondrogene Differenzierung. Die Zellen sind mit Alcianblau gefärbt, um sezernierte Proteoglykane zu markieren (dunkelblau). Maßstab unten rechts ≙ 100 µm.

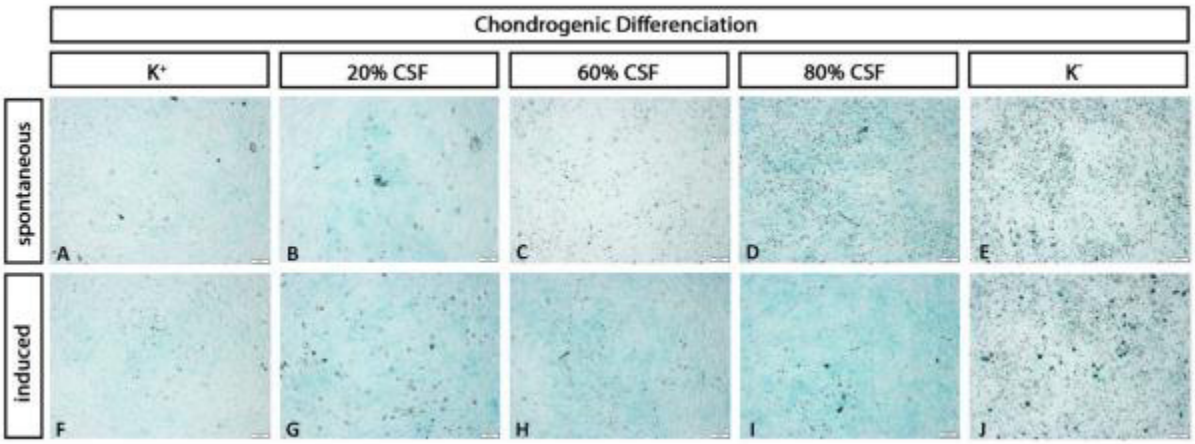


Abbildung 15: Chondrogene Differenzierung von OSC LP. (A-E) Spontane Differenzierung in (A) DMEM/10% FCS, (B-D) DMEM/1% mit 20, 60 und 80% CSF und (E) DMEM. (F-J) Induzierte Differenzierung in (F) Differenzierungsmedium, (G-I) Differenzierungsmedium mit 20, 60 und 80% CSF und (J) Basalmedium. Olfaktorische Stammzellen OSC LP zeigen weder eine spontane noch eine induzierte chondrogene Differenzierung. Die Zellen sind mit Alcianblau gefärbt, um sezernierte Proteoglykane zu markieren (dunkelblau). Maßstab unten rechts ≙ 100 µm.

Im Falle der OSC ET (Abb. 14A-J) und OSC LP (Abb. 15A-J) wurde weder eine spontane (Abb. 14A-E und 15A-E) noch eine induzierte (Abb. 14F-J und 15F-J) chondrogene Differenzierung beobachtet. In allen Proben mit und ohne CSF bzw. Differenzierungsmedium waren die Zellen gleichmäßig in den Zellkulturwells verteilt und hellblau gefärbt, während chondrogene Pellets nicht detektiert werden konnten.

Damit zeigen diese Ergebnisse, dass der Zusatz von CSF das chondrogene Differenzierungspotenzial von BM-hMSC reduziert, während die OSC auch unter induzierten Bedingungen mit und ohne zusätzliches CSF überhaupt kein chondrogenes Differenzierungspotenzial zeigen.

4.6 Adipogenes Differenzierungspotential von humanen mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen

Zusätzlich zum chondrogenen Differenzierungspotenzial in Gegenwart von CFS wurde das adipogene Differenzierungspotenzial von humanen mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen analysiert. Hierzu wurden die Zellen in adipogenem Differenzierungsmedium (10% Supplement im Basalmedium) sowie mit zusätzlich 20, 60 oder 80% CSF im Differenzierungsmedium oder in DMEM/10% FCS kultiviert. Nach zweiwöchiger Inkubation wurde die intrazelluläre Lipidvakuolen-Bildung in differenzierten Zellen durch die Oil-Red-Färbung detektiert.

Wie in Abbildung 16A zu erkennen ist, zeigte die Positivkontrolle von BM-hMSC (adipogenes Differenzierungsmedium) multiple reife Adipozyten mit dunkelrot gefärbten Lipidvakuolen. Auch in Gegenwart von CSF konnten reife Adipozyten detektiert werden, deren Anzahl allerdings mit steigendem CSF-Gehalt deutlich abnahm (Abb. 16B, C, D). Im Zellkulturmedium (DMEM/10% FCS) konnte dagegen keine spontane Differenzierung beobachtet werden (Abb. 16E).

Im Gegensatz zu den BM-hMSC konnten für die OSC ET und OSC LP lediglich einige wenige reife Adipozyten ausschließlich in der jeweiligen Positivkontrolle beobachtet werden (Abb. 16F, K). In Gegenwart von CSF (Abb. 16G-I und L-N) sowie in Abwesenheit von adipogenen Stimuli (Abb. 16J, O) kam es weder zur induzierten noch zur spontanen adipogenen Differenzierung.

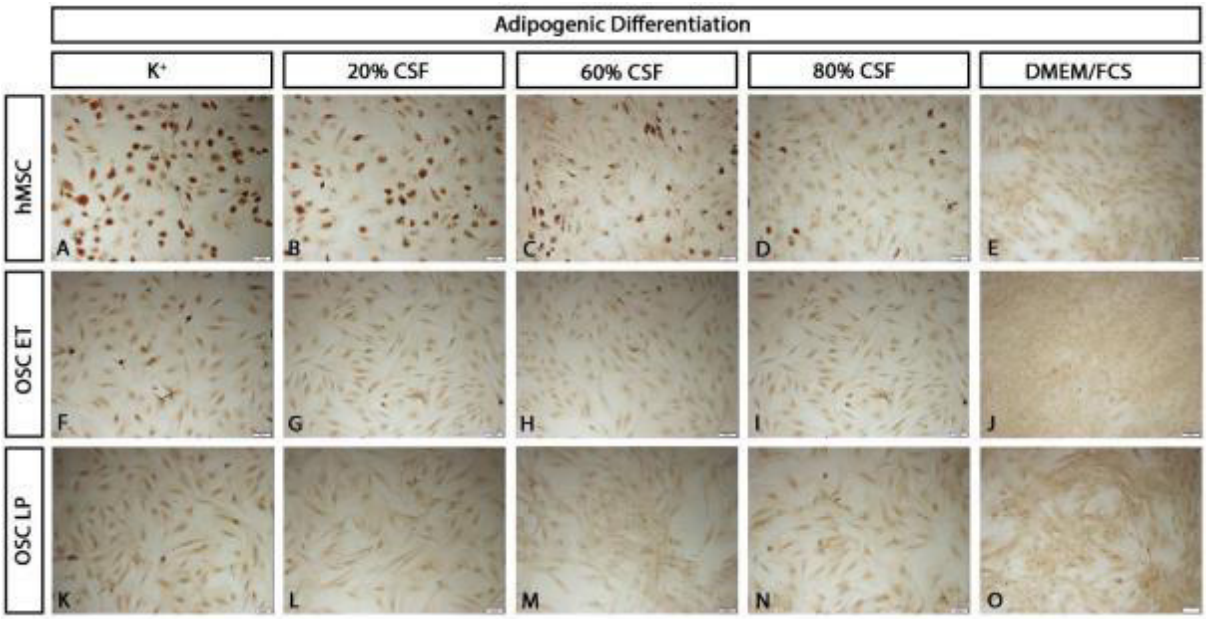


Abbildung 16: Adipogene Differenzierung von BM-hMSC und olfaktorischen Stammzellen. Adipogene Differenzierung von (A-E) BM-hMSC, (F-J) OSC ET und (K-O) OSC LP im (A, F, K) Differenzierungsmedium, (B-C und G-I und L-N) Differenzierungsmedium mit 20, 60 und 80% CSF und (E, J, O) DMEM/10% FCS. BM-hMSC zeigen eine induzierte Differenzierung, die mit steigendem CSF-Gehalt deutlich abnimmt (A-D), aber keine spontane Differenzierung (E). Für olfaktorische Stammzellen OSC ET und OSC LP zeigen nur die Positivkontrollen eine geringfügige Induktion (F, K), in Gegenwart von CSF sowie in Abwesenheit von adipogenen Stimuli findet jedoch keine Differenzierung statt (G-H, L-O). Die Zellen wurden mit Oil Red gefärbt, um Lipidvakuolen zu markieren (dunkelrot). Maßstab unten rechts ≙ 100 µm.

Insgesamt ergab die Untersuchung des adipogenes Differenzierungspotentials, dass die Adipogenese der BM-hMSC (ebenso wie die Chondrogenese, vgl. Kapitel 4.5) mit steigendem CSF-Gehalt zunehmend inhibiert wurde. Im Falle der olfaktorischen Stammzellen OSC ET und OSC LP konnte in Gegenwart von CSF kein adipogenes Differenzierungspotentials identifiziert werden.

4.7 Osteogenes Differenzierungspotential von humanen mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen

Die Analyse des ostegenen Differenzierungspotentials von BM-hMSC, OSC ET und OSC LP erfolgte analog zur chondrogenen Differenzierung. Für die spontane Differenzierung wurden die Zellen in DMEM/10% FCS, in reinem DMEM oder in DMEM/1% FCS mit 20, 60 oder 80% CSF inkubiert. Für die induzierte Differenzierung wurde osteogenes Differenzierungsmedium (10% Supplement im Basalmedium) verwendet, wobei reines Basalmedium als Negativ- und Basalmedium mit 10% Supplement als Positivkontrolle dienten. Nach 2 Wochen Kultivierung der verschiedenen Ansätze, wurden osteogen differenzierte Zellen mittels Alizarin Rot S nachgewiesen, welches extrazelluläre Kalziumablagerungen in mineralisierten reifen

Osteoblasten komplexiert und diese intensiv rot färbt. Die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen sind in den Abbildungen 17 bis 19 dargestellt.

Die Kultivierung von BM-hMSC im Zellkulturmedium DMEM ist in Abbildung 17A-E zu sehen, wobei die hohe Zelldichte in diesen Ansätzen sowie die fehlende Kalzinierung der Zellmatrix für starke Zellproliferation und gegen Differenzierung sprechen. Eine spontane Differenzierung der BM-hMSC zu Osteoblasten wurde also nicht beobachtet.
Im osteogenen Differenzierungsmedium mit Supplement (Positivkontrolle) wurden dagegen sowohl morphologische Veränderungen als auch eine intensive Rotfärbung der mineralisierten Matrix und damit eine ausgeprägte induzierte Differenzierung detektiert (Abb. 17F). Auch in Gegenwart von CSF konnte die Mineralisierung der Zellen beobachtet werden, allerdings stark reduziert im Vergleich zur Positivkontrolle sowie deutlich abnehmend mit steigendem CSF-Gehalt (Abb. 17G-I), sodass bei 80% CSF keine differenzierten Zellen mehr zu beobachten waren (vergleichbar mit der Negativ-kontrolle (Abb. 17J)).

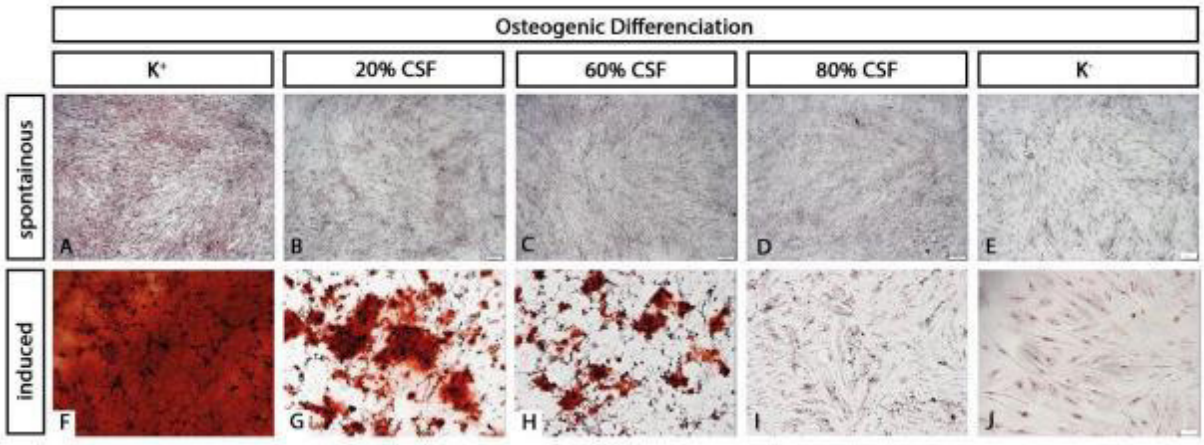


Abbildung 17: Osteogene Differenzierung von BM-hMSC. (A-E) Spontane Differenzierung in (A) DMEM/10% FCS, (B-D) DMEM/1% FCS mit 20, 60 und 80% CSF und (E) DMEM. (F-J) Induzierte Differenzierung im (F) Differenzierungsmedium, (G-I) Differenzierungsmedium mit 20, 60 und 80% CSF und (J) Basalmedium. Spontane osteogene Differenzierung von BM-hMSC tritt nicht auf (A-E), während eine ausgeprägte induzierte Differenzierung in der Positivkontrolle (F) auftritt. In Gegenwart von CSF kommt es ebenfalls zur Induktion, allerdings stark reduziert im Vergleich zur Positivkontrolle sowie deutlich abnehmend mit steigendem CSF-Gehalt (G-I). Die Zellen sind mit Alizarin Rot S gefärbt, um extrazelluläre Kalziumablagerungen zu markieren (rot). Maßstab (A-J) ≙ 200 µm; Maßstab (F-J) ≙ 100 µm.

Im Falle der olfaktorischen Stammzellen OSC ET wurde ähnlich wie bei den BM-hMSC in den Ansätzen im Zellkulturmedium eine erhöhte Zelldichte (Abb. 18A-E) im Vergleich zum Differenzierungsmedium (Abb. 18F-J) beobachtet, extrazelluläre Kalziumablagerungen konnten jedoch in keinem der OSC ET Ansätze detektiert werden. Insgesamt konnte für die OSC ET damit weder eine spontane noch eine induzierte Osteogenese beobachtet werden.
Die Untersuchung der osteogene Differenzierung der OSC LP ergab, dass auch dieser Zelltyp nicht spontan zu Osteoblasten differenzierte, sofern kein osteogener Stimulus vorhanden war (Abb. 19A-E). Allerdings konnte für die OSC LP im Gegensatz zu den OSC ET eine gewisse Induktion der Mineralisierung in der Positivkontrolle beobachtet werden, da hier einige wenige rot gefärbte Zellcluster zu sehen waren (Abb. 19F). Insgesamt konnte in

Gegenwart von CSF (Abb. 19G-I) ebenso wie in der Negativkontrolle (Abb. 19J) jedoch kein osteogenes Differenzierungspotential identifiziert werden.

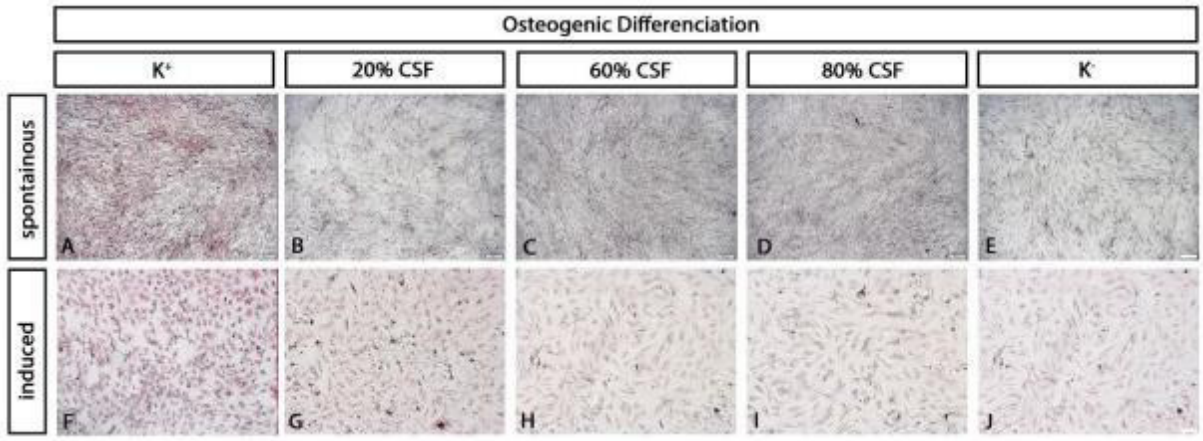


Abbildung 18: Osteogene Differenzierung von OSC ET. (A-E) Spontane Differenzierung in (A) DMEM/10% FCS, (B-D) DMEM/1% mit 20, 60 und 80% CSF und (E) DMEM. (F-J) Induzierte Differenzierung in (F) Differenzierungsmedium, (G-I) Differenzierungsmedium mit 20, 60 und 80% CSF und (J) Basalmedium. Olfaktorische Stammzellen OSC ET zeigen weder eine spontane noch eine induzierte osteogene Differenzierung. Die Zellen sind mit Alizarin Rot S gefärbt, um extrazelluläre Kalziumablagerungen zu markieren (rot). Maßstab (A-E) in (E) ≙ 200 µm; Maßstab (F-J) in (J) ≙ 100 µm.

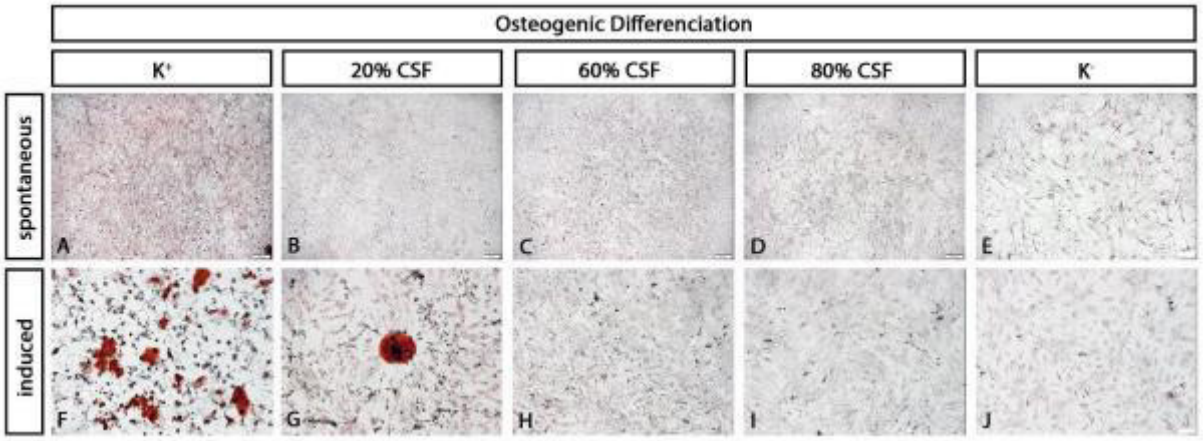


Abbildung 19: Osteogene Differenzierung von OSC LP. (A-E) Spontane Differenzierung in (A) DMEM/10% FCS, (B-D) DMEM/1% mit 20, 60 und 80% CSF und (E) DMEM. (F-J) Induzierte Differenzierung in (F) Differenzierungsmedium, (G-I) Differenzierungsmedium mit 20, 60 und 80% CSF und (J) Basalmedium. Olfaktorische Stammzellen OSC LP zeigen keine spontane osteogene Differenzierung (A-E), aber eine geringfügige Induktion der Positivkontrolle (F) sowie in Gegenwart von 20% CSF (G). Die Zellen sind mit Alizarin Rot S gefärbt, um extrazelluläre Kalziumablagerungen zu markieren (rot). Maßstab (A-E) in (E) ≙ 200 µm; Maßstab (F-J) in (J) ≙ 100 µm.

Vergleichbar mit den Untersuchungen des chondrogenen und des adipogenen Differenzierungspotentials, zeigte auch die Untersuchung der osteogenen Differenzierung, dass BM-hMSC in Anwesenheit entsprechender Stimuli zwar in Osteoblasten differenzieren können, die Zugabe von CSF dieses Differenzierungspotenzial jedoch deutlich reduziert. Die CSF-bedingte Reduktion der Chondro-, Adipo- und Osteogenese war jeweils abhängig von der CSF-Konzentration und nahm mit steigendem CSF-Gehalt zu.

Keiner der drei untersuchten Zelltypen (BM-hMSC, OSC ET, OSC LP) zeigte das Potential spontan zu differenzieren, weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von CSF. Der Zusammenhang zwischen reduziertem Differenzierungspotenzial und der CSF-Zugabe konnte auch für die olfaktorischen Stammzellen beobachtet werden, war hier allerdings weitaus weniger ausgeprägt als im Falle der BM-hMSC, da die OSC insgesamt ein deutlich geringeres, bis kein Potential zur Differenzierung gezeigt haben.

4.8 Neuronales Differenzierungspotential von humanen mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen

Während der Proliferationsanalyse mittels Calcein-AM-Färbung wurden morphologische Veränderungen der Kulturen von BM-hMSC, OSC ET und OSC LP in Gegenwart von CSF beobachtet. Diese morphologischen Veränderungen traten nach mehreren Tagen Kultivierung (≥ 5 Tage) bei höheren CSF-Konzentrationen von ≥ 70% auf und sind für den jeweiligen Zelltyp in den Abbildungen 20 bis 22 repräsentativ gezeigt.

In Gegenwart geringer CSF-Konzentrationen von 10% waren BM-hMSC dicht gepackt und von ähnlicher Form und Größe (Abb. 20A, C). Die flachen Zellen hatten eine überwiegend dreieckige bis längliche Morphologie, ohne größere Ausstülpungen oder Fortsätze. Dagegen wurden die Zellen in 80% CSF deutlich länger, ihre Morphologie veränderte sich zu einer bipolaren Form mit langen Zellfortsätzen, die miteinander verbunden zu sein schienen (Abb. 20B, D). Aufgrund dieser veränderten Morphologie erschienen die Zellen Neuronen-ähnlich.

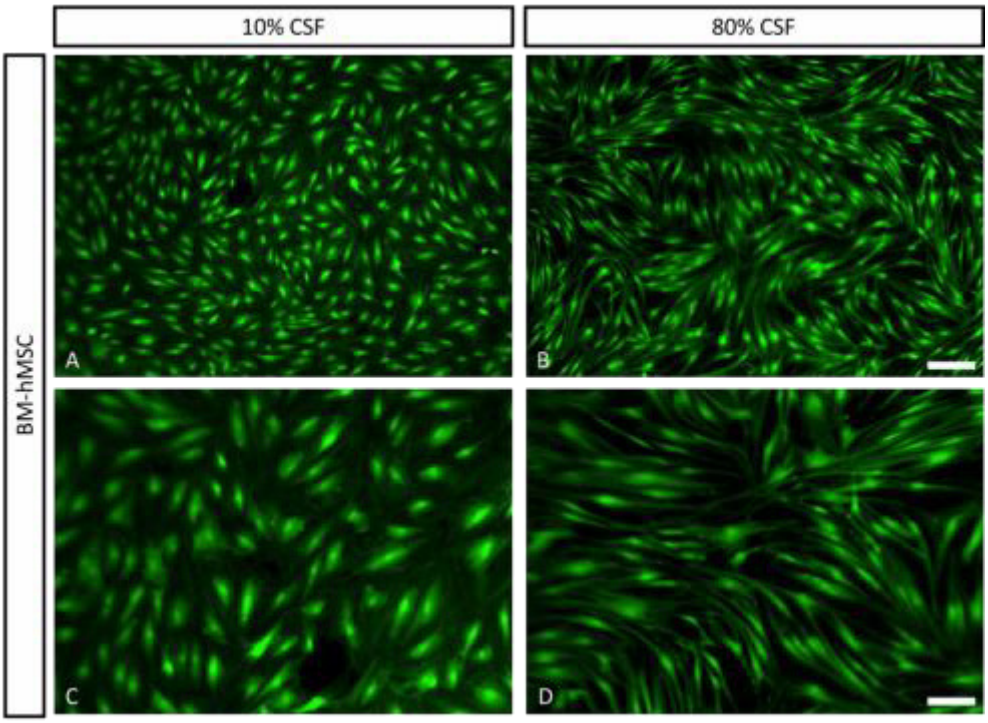


Abbildung 20: Morphologische Veränderungen von BM-hMSC in Gegenwart von CSF. BM-hMSC in (A, C) 10% CSF und (B, D) 80% CSF. In niedrigen CSF-Konzentrationen weisen die flachen Zellen ähnliche Form und Größe auf, die Morphologie erscheint dreieckig bis länglich, jedoch ohne lange Fortsätze. In höheren CSF-Konzentrationen nehmen die Zellen eine deutlich länglichere Form an, mit bipolarer Morphologie und langen Fortsätzen. Die Zellen sind mit Calcein-AM (grün) gefärbt. Maßstab (A, B) ≙ 200 µm; Maßstab (C, D) ≙ 100 µm.

Im Vergleich zu den BM-hMSC variierten sowohl Form als auch Größe der OSC ET in 10% CSF deutlich, und es konnten sowohl dünne, längliche als auch größere, runde Zellen beobachtet werden (Abb. 21A, C). In 80% CSF nahmen diese Variationen ab, obwohl dennoch unterschiedliche Morphologien vorhanden waren, und die OSC ET wurden länglicher und zeigten (ähnlich wie die BM-hMSC) eine bipolare Morphologie (Abb. 21B, D). Anders als bei den BM-hMSC waren die Zellfortsätze allerdings weniger ausgeprägt.
Die OSC LP bildeten in Gegenwart von 10% CSF ein kopfsteinpflasterartiges Muster aus rundlichen Zellen variabler Größe (Abb. 22A, C). Dagegen nahmen die Zellen in 80% CSF eine deutlich länglichere, bipolare Form an (Abb. 22B, D), die jedoch ähnlich wie bei den OSC ET weniger ausgeprägt war als bei den BM-hMSC.

Aufgrund der beobachteten morphologischen Veränderungen der mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen in einen Neuronen-ähnlichen Phänotyp bei höheren CSF-Konzentrationen, wurde anschließend die mögliche Induktion der Zellen zur neuronalen Differenzierung unter Zugabe von CSF untersucht.

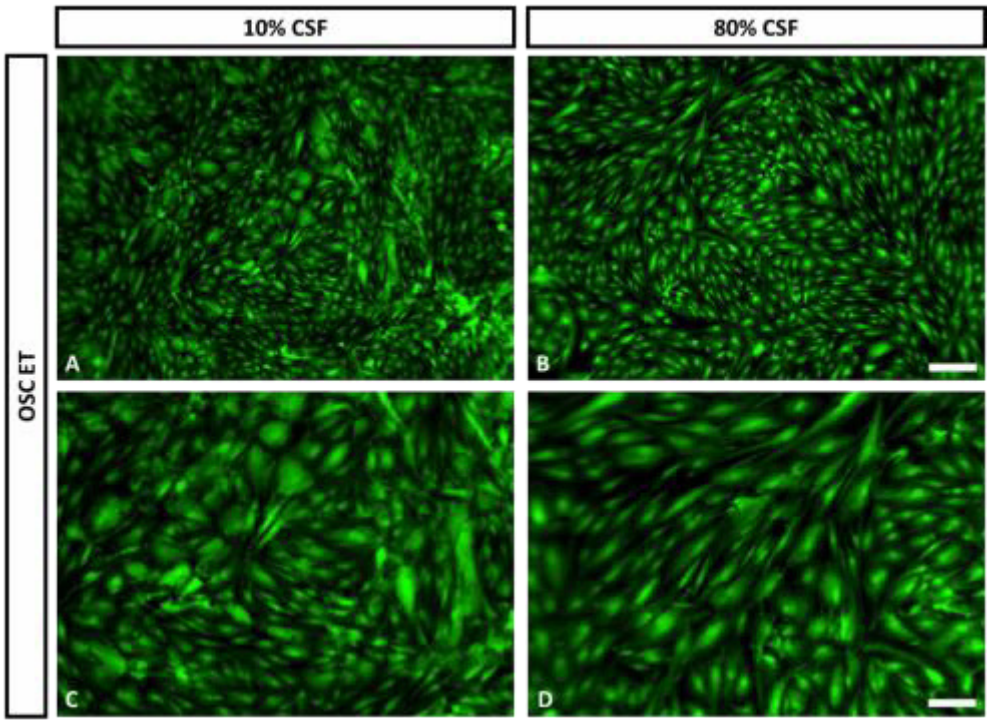


Abbildung 21: Morphologische Veränderungen von OSC ET in Gegenwart von CSF. OSC ET in (A, C) 10% CSF und (B, D) 80% CSF. In niedrigen CSF-Konzentrationen weisen die Zellen unterschiedliche Morphologien auf, wobei sowohl dünne, längliche als auch größere, runde Zellen auftreten. In höheren CSF-Konzentrationen nehmen die Zellen eine deutlich länglichere Form mit bipolarer Morphologie an. Die Zellen sind mit Calcein-AM (grün) gefärbt. Maßstab (A, B) ≙ 200 µm; Maßstab (C, D) ≙ 100 µm.

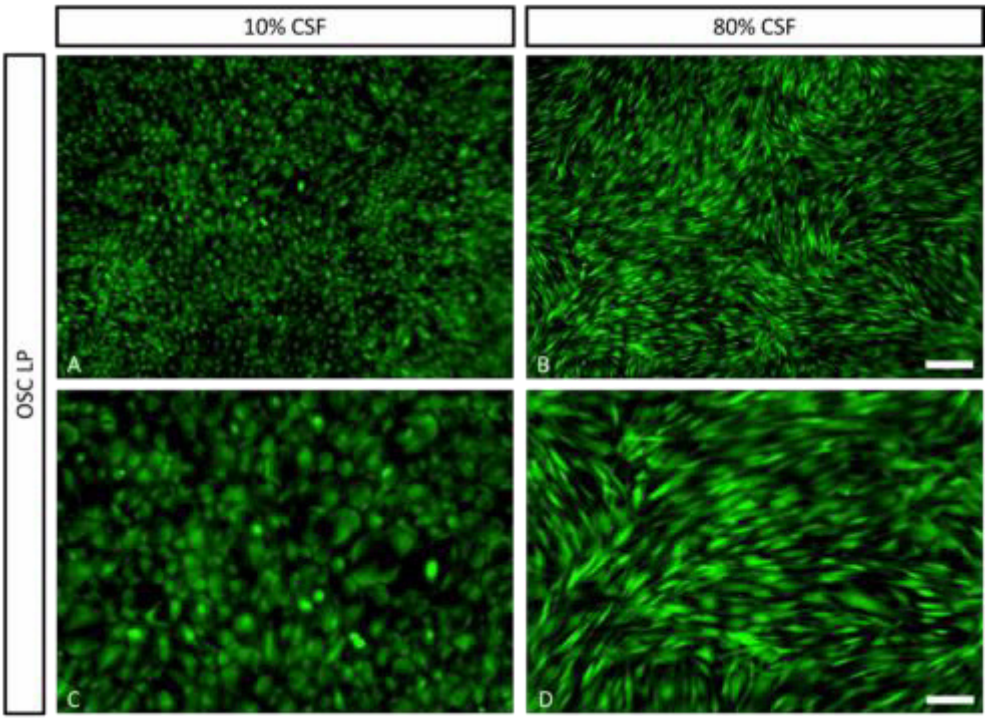


Abbildung 22: Morphologische Veränderungen von OSC LP in Gegenwart von CSF. OSC LP in (A, C) 10% CSF und (B, D) 80% CSF. In niedrigen CSF-Konzentrationen weisen die Zellen eine rundliche Form mit variabler Größe auf und bilden ein kopfsteinpflasterartiges Muster. In höheren CSF-Konzentrationen nehmen die Zellen eine deutlich länglichere Form mit bipolarer Morphologie an. Die Zellen sind mit Calcein-AM (grün) gefärbt. Maßstab (A, B) ≙ 200 µm; Maßstab (C, D) ≙ 100 µm.

Das neuronale Differenzierungspotenzial von BM-hMSC, OSC ET und OSC LP wurde sowohl im neuronalen Differenzierungsmedium (10% Supplement im Basalmedium) als auch im neuronalen Differenzierungsmedium mit 80% CSF-Zusatz untersucht. Nach Kultivierung der Zellen für 5 bis 10 Tage wurden neuronal differenzierte Zellen mittels Immunfluoreszenz anhand der beta-III-Tubulin-Expression detektiert.

BM-hMSC bildeten sowohl im neuronalen Differenzierungsmedium (Abb. 23A) als auch unter Zugabe von 80% CSF (Abb. 23B) beta-III-Tubulin positive Zellen. In beiden Ansätzen zeigten die Zellen eine multipolare Neuronen-ähnliche Morphologie, wobei in Anwesenheit von CSF jedoch komplexere Verzweigungen der Dendriten-ähnlichen Fortsätze beobachtet werden konnten (Abb. 23B).
Für OSC ET konnten ebenfalls in beiden Ansätzen beta-III-Tubulin positive Zellen detektiert werden (Abb. 24). Im Vergleich zum Differenzierungsmedium ohne CSF-Zusatz (Abb. 24A) wurden in Gegenwart von 80% CSF jedoch mehr multipolare, Neuronen-ähnliche Zellen mit stärkerer beta-III-Tubulin-Expression gebildet (Abb. 24B, C). Ähnlich wie bei den BM-hMSC waren auch bei den OSC ET die Fortsätze bei CSF-Zugabe deutlich länger und komplexer, wobei auch Verzweigungen der Fortsätze identifiziert werden konnten.
OSC LP differenzierten ebenso wie die BM-hMSC und die OSC ET in Neuronen-ähnliche, beta-III-Tubulin positive Zellen sowohl im neuronalen Differenzierungsmedium allein (Abb. 25A) als auch bei Zugabe von 80% CSF (Abb. 25B). Die Anzahl differenzierten Zellen nahm auch hier in Gegenwart von CSF deutlich zu, ebenso wie die Komplexität und die Verzweigungen der Fortsätze.

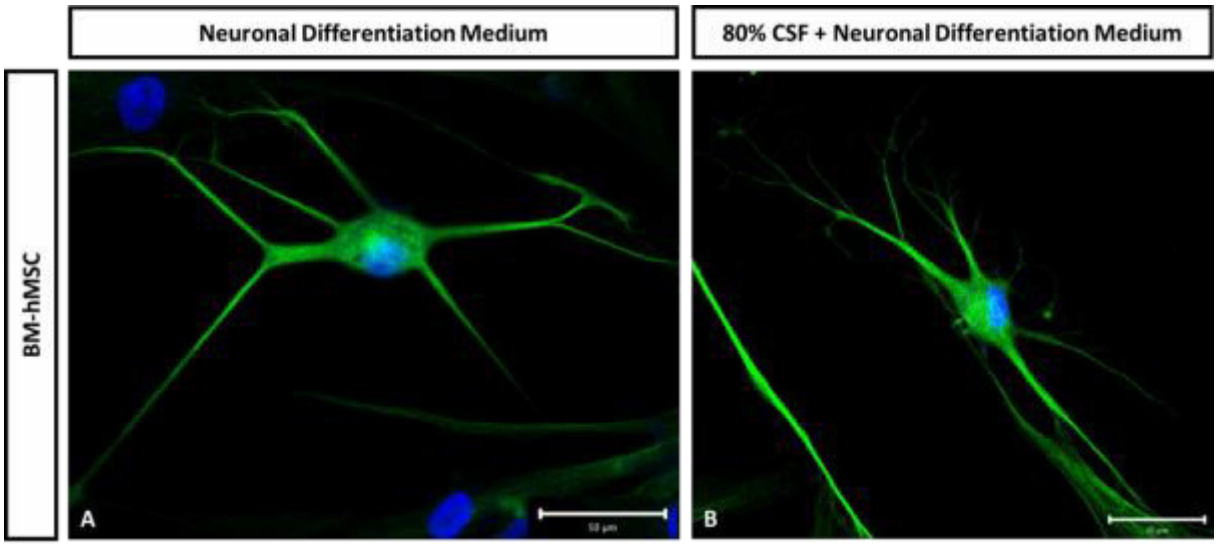


Abbildung 23: Induzierte neuronale Differenzierung von BM-hMSC in CSF. (A) BM-hMSC im neuronalen Differenzierungsmedium und (B) im neuronalen Differenzierungsmedium mit 80% CSF. Die Zellen wurden mit beta-III-Tubulin (grün) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau) markiert. BM-hMSC sind mit und ohne CSF-Zugabe beta-III-Tubulin positiv. In Gegenwart von 80% CSF (B) nimmt die Anzahl differenzierter Zellen deutlich zu, ebenso wie die Komplexität und die Verzweigungen der Fortsätze. Maßstab ≙ 50 µm.

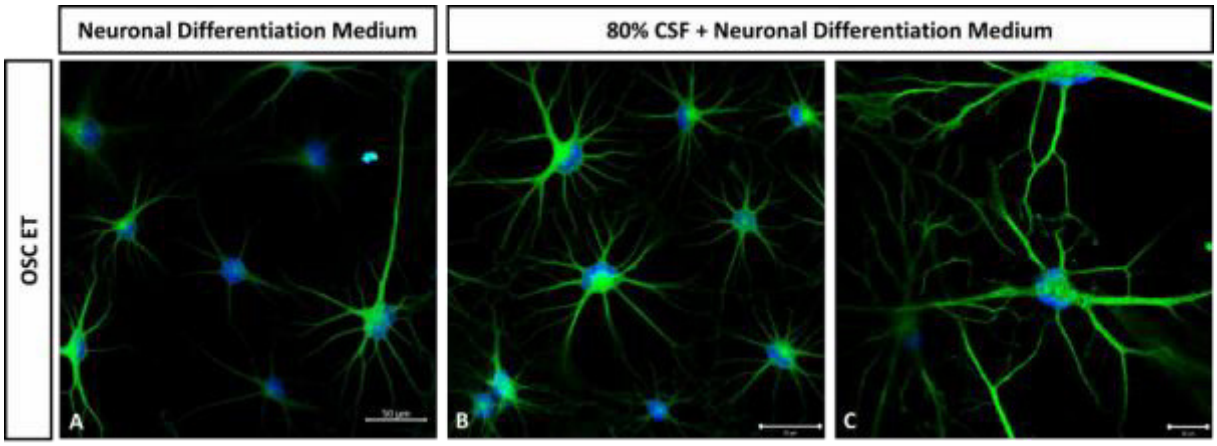


Abbildung 24: Induzierte neuronale Differenzierung OSC ET in CSF. (A) OSC ET im neuronalen Differenzierungsmedium und (B, C) im neuronalen Differenzierungsmedium mit 80% CSF. Die Zellen wurden mit beta-III-Tubulin (grün) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau) markiert. OSC ET sind mit und ohne CSF-Zugabe beta-III-Tubulin positiv. In Gegenwart von 80% CSF (B, C) nimmt die Anzahl differenzierter Zellen deutlich zu, ebenso wie die Komplexität und die Verzweigungen der Fortsätze. Maßstab (A, B) ≙ 50 µm, Maßstab (C) ≙ 20 µm.

Die Untersuchung der neuronalen Differenzierung hat somit ergeben, dass alle drei untersuchten Zelltypen in Gegenwart geeigneter Stimuli ein neuronales Differenzierungspotential aufweisen und multipolare Neuronen-ähnliche Zellen bilden können. Dieses Differenzierungspotential wurde durch die Zugabe von 80% CSF deutlich verstärkt, insbesondere im Falle der OSC ET, wodurch längere, komplexere und stärker verzweigte Fortsätze entstehen konnten.
Im Gegensatz zum chondrogenen, adipogenen und osteogenen Differenzierungspotential, das in Anwesenheit von CSF deutlich reduziert wurde, wurde die neuronale Differenzierung durch CSF begünstigt und führte zu stärker differenzierten Zellen mit zahlreichen komplexen

Verzweigungen. Insbesondere OSC ET haben eine vielversprechende neuronale Differenzierungsfähigkeit gezeigt. Diese Befunde stehen im Einklang mit einer möglichen Anwendung von Stammzellen bei SCI, um geschädigtes und zerstörtes neuronales Gewebe zu ersetzen.

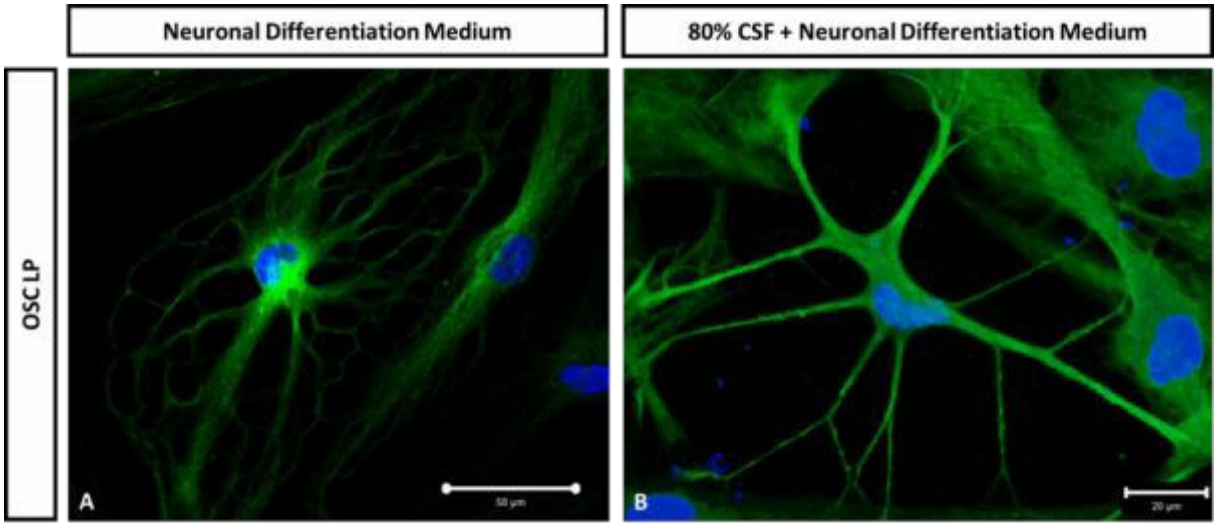


Abbildung 25: Induzierte neuronale Differenzierung von OSC LP in CSF. (A) OSC LP im neuronalen Differenzierungsmedium und (B) im neuronalen Differenzierungsmedium mit 80% CSF. Die Zellen wurden mit beta-III-Tubulin (grün) und die Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau) markiert. OSC LP sind mit und ohne CSF-Zugabe beta-III-Tubulin positiv. In Gegenwart von 80% CSF (B) nimmt die Anzahl differenzierter Zellen deutlich zu, ebenso wie die Komplexität und die Verzweigungen der Fortsätze. Maßstab (A) ≙ 50 µm, Maßstab (B) ≙ 20 µm.

5. Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

Für das Vorhaben relevante Ergebnisse, Veröffentlichungen und Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte von **nicht** am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen liegen nicht vor. Eine Publikation der erzielten Gesamt-Ergebnisse ist aktuell in Bearbeitung. Bisherige Kongressbeiträge sind wie folgt:

1. 8. Jährliche Konferenz des deutschen Stammzellnetzwerkes. Vortrag und Posterbeitrag; Titel der Beiträge: „Influence of Cerebrospinal Fluid on Olfactory Stem Cells: Prerequisite for Cell Therapy after Spinal Cord Injury"

2. 34. Jahrestagung der deutschsprachigen medizinischen Gesellschaft für Paraplegiologie e.V. Abstract und Vortrag; Titel: „Einfluss von Cerebrospinalflüssigkeit auf olfaktorische Stammzellen: Voraussetzungen für die Zelltherapie nach Rückenmarksverletzung"

6. Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Ziel dieses Projektes war es, den Einfluss von CSF auf humane mesenchymale sowie olfaktorische Stammzellen für den möglichen Einsatz zur neuronalen Regeneration nach Rückenmarktraumata zu untersuchen. Die Etablierung von Methoden, die eine klinische Umsetzung ermöglichen, ist besonders relevant. Die folgenden Forschungshypothesen im Projekt FR309 konnten bestätigt werden:

I. OSC, MSC bleiben in CSF vital und proliferieren
II. Die Funktionalität von OSC, MSC (Proliferation, Migration) bleibt in CSF erhalten
III. Spontane Differenzierung (chondrogen, adipogen, osteogen) von MSC, OSC tritt in CSF nicht auf
IV. Neurotrophe Faktoren der CSF fördern die neuronale Differenzierung von OSC, MSC

Schlussfolgerungen

Experimentell konnten OSC aus der olfaktorischen Mukosa isoliert, kultiviert und expandiert werden. Die Funktionalität sowie deren Verhalten im Kontakt zu CSF wurden erfolgreich untersucht.
Grundsätzlich ist die genaue Charakterisierung des Einflusses von CSF auf das Transplantat die Voraussetzung für den klinischen Einsatz im ATMP-Verfahren, um eine größtmögliche Sicherheit für Patienten zu gewährleisten. Wie die Ergebnisse veranschaulichen, konnten keine adversen Effekte von CSF auf die eingesetzten humanen Zellen beobachtet werden. Sowohl mesenchymale als auch olfaktorische Stammzellen wurden in ihrer Viabilität sowie der Proliferationsrate nicht durch CSF beeinträchtigt. Ebenfalls wurde keine Inhibition der Migrationseigenschaften der Zellen durch die Anwesenheit von CSF beobachtet. Die Differenzierbarkeit der Zellen in chondrogene, adipogene und osteogene Linien ist durch CSF konzentrationsabhängig beeinträchtigt worden, während das neuronale Differenzierungspotential durch die Anwesenheit von CSF begünstigt wurde, was zu einer veränderten Morphologie in Neuronen-ähnliche Zellen mit langgestreckten, verzweigten Zellfortsätzen führte.
Zusammenfassend konnten keine adversen Effekte von CSF auf die untersuchten humanen Stammzellen festgestellt werden, während die Bildung von Neuronen-ähnlichen Zellen begünstigt wurde, was die Möglichkeit der autologen Zelltransplantation zur Behandlung von Rückenmarkstrauma unterstreicht.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Mit diesem Projekt wurden wichtige Voraussetzungen für den klinischen Einsatz von Zelltherapien geschaffen. Die erzielten Ergebnisse werden aktuell zu einer Publikation zusammengefasst (Titel: „Influence of cerebrospinal fluid on olfactory stem cells: prerequisite for cell therapy after spinal cord injury“). Zwar konnten keine reinen OEC-Fraktionen mit einer hohen Zellzahl generiert werden, die Ergebnisse zeigten allerdings, dass isolierte OSC ein sehr hohes neuronales Differenzierungspotential aufweisen, welches durch die Anwesenheit von CSF nicht beeinträchtigt, sondern vielmehr begünstigt wird. Somit stellen

OSC eine leicht zugängliche Quelle für autologe Zelltherapien nach Rückenmarkstrauma dar.
Der klinische Einsatz von Zelltransplantaten aus Biopsien der humanen olfaktorischen Mukosa als reproduzierbares Standardverfahren setzt hohe Qualitätsansprüche voraus, die eine Herstellung im Reinraum erforderlich machen. GMP-gerechte Isolierungs- und Aufarbeitungsmethoden der Zellen, die für eine klinische Umsetzung geeignet sind, sowie die Erfüllung der umfassenden europäischen und nationalen arzneimittelrechtlichen Vorgaben sind die Grundvoraussetzung für den Einsatz am Menschen. Nur so kann die Sicherheit dieser neuen Therapieform für den Patienten garantiert werden.

Weiteres experimentelles Vorgehen

Nach der Etablierung der Isolierungs- und Charakterisierungsarbeiten sowie der Analyse von Zellviabilität und Zellfunktionalität im Kontakt zu CSF ist die Grundvoraussetzung für humane zelltherapeutische Ansätze nach Rückenmarkstraume geschaffen.
Zukünftig wäre der nächste Schritt die Analyse eines geeigneten Trägermaterials, das möglichst autolog und geeignet für den Einsatz im und am Rückenmark ist. In den vergangenen Studien (FR219 und FR256) konnten wir den autologen Plasmaclot als geeignetes Trägermaterial etablieren. Die Kombination von CSF mit dem Plasmaclot könnte ein neues und autologes Trägermaterial für die Nervenregeneration darstellen. Ein derartiges System zur Neuroregeneration ließe sich am Tiermodell (Ratte) hinsichtlich Sicherheit und Wirksamkeit überprüfen.
Des Weiteren ist die Untersuchung des Verhaltens von humanen mesenchymalen und olfaktorischen Stammzellen in einer simulierten Umgebung des geschädigten Rückenmarks notwendig. Da nach einer Rückenmarksläsion Entzündungsreaktionen auftreten und gliale Narbenstrukturen entstehen, sind die Untersuchung in einem inflammatorischen Milieu sowie die Interaktion mit astroglialen Zellen von großem Interesse.
Seit Anfang 2014 verfügt das Universitätsklinikum Bergmannsheil Bochum über einen Reinraum. Die Inbetriebnahme sowie die Zertifizierung werden allerdings noch Zeit in Anspruch nehmen. Es soll eine Übertragung der optimierten Aufarbeitungskette unter Reinraumbedingungen nach Abschluss des ablaufenden Projektes (FR309) erfolgen. Dr. med. Aach und Dr. med. Grasmücke werden für eine Umsetzung der erzielten Ergebnisse in tierexperimentelle Anwendung und in Vorbereitung zur klinischen Anwendung sorgen.

8. Literaturverzeichnis

[1] Vismara I, Papa S, Rossi F, Forloni G, Veglianese P. *Current options for cell therapy in spinal cord injury*. Trends in molecular medicine 2017; 23:831-849.

[2] Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, Kotter MRN, Druschel C, Curt A, Fehlings MG. *Traumatic spinal cord injury*. Nat Rev Dis Primers 2017; 3:17018.

[3] Kattail D, Furlan JC, Fehlings MG. *Epidemiology and clinical outcomes of acute spine trauma and spinal cord injury. Experience from a specialized spine trauma center in Canada in comparison with a large national registry.* The Journal of trauma 2009. 67:936-943.

[4] Maynard FM, Bracken MB, Creasey G, Ditunno JF, Donovan WH, Ducker TB, et al. *International Standards for Neurological and Functional Classification of Spinal Cord Injury*. Spinal cord 2009. 35: 266-274.

[5] Traumaregister DGU® *Jahresbericht* 2018 für den Zeitraum 2017; Sektion NIS der DGU / AUC.

[6] Aikman K, Olifee JL, Kelly MT, et al. *Sexual health in men with traumatic spinal cord injuries: A review and recommendations for primary health –care providers*. American Journal of Mens Health 2018;12:2044-2054.

[7] Kirshblum S, Millis S, McKinley W, et al. *Late neurologic recovery after traumatic spinal cord injury*. Arch Phys Med Rehabil 2004. 85;1811-1817.

[8] Varma AK, Das A, Wallace G4th, et al. *Spinal cord injury: a review of current therapy, future treatments, and basic science frontiers.* Neurochem Res 2013. 38;895-905.

[9] Goldshmit Y, Jona G, Schmukler E, Solomon S, Pinkas-Kramarski R, Ruban A. *Blood glutamate scavenger as a novel neuroprotective treatment in spinal cord injury.* Jouranl of Neurotrauma 2018.35: https://doi.org/10.1089/neu.2017.5524

[10] Curt A. *Human neural stem cells in chronic spinal cord injury.* Expert Opinion On Biological Therapy 2012. 12;271-273.

[11] Fu H, Hu D, Zhang L, Shen X, Tang P. *Efficacy of oligodendrocyte progenitor cell transplantation in rat modeks with traumatic thoracic spinal cord injury: A systemic review and meta-analysis.* Jouranl of Neurotrauma 2018.35: https://doi.org/10.1089/neu.2017.5606

[12] Dalamagkas K, Tsintou M, Seifalian AM. *Stem cells for spinal cord injuries bearing translational potential*. Neural Regen Res 2018;13: 35-42.

[13] Watzlawick R, Rind J, Sena ES, Brommer B, Zhang T, Kopp MA, Dirnagl U, Macleod MR, Howells DW, Schwab JM. *Olfactory ensheathing cell transplantation in experimental spinal cord injury: effect size and reporting bias of 62 experimental treatments: a systematic review and meta-analysis.* PLoS Biol. 2016 14:e1002468.

[14] Ulndreaj A, Badner A, Fehlings MG. *Promising neuroprotective strategies for traumatic spinal cord injury with a focus on the differential effects among anatomical levels of injury.* F1000Research 2017;6:1-13

[15] Badner A, Ahad MS, Fehlings MG. *Spinal cord injuries: how could cell therapy help?* Expert opinion on biological therapy 2017. 17:529-541.

[16] Lima C, Escada P, Pratas-Vital J, et al. *Olfactory mucosal autografts and rehabilitation for chronic traumatic spinal cord injury.* Neurorehabil Neural Repair 2010. 24;10-22.

[17] Dlouhy BJ, Awe O, Rao Rc, et al. *Autograft-derived spinal cord mass following olfactory mucosal cell transplantation in a spinal cord injury patient*. J Neurosurg Spine 2014. 21;618-622.

[18] Huang H, Chen L, Wang H, et al. *Safety of fetal olfactory ensheathing cell transplantation in patients with chronic spinal cord injury. A 38-month follo-up with MRI.* Chinese Journal Of Reparative And Reconstructive Surgery 2006. 20;439-443.

[19] Huang H, Wang H, Chen L, et al. *Influence factors for functional improvement after olfactory ensheathing cell transplantation for chronic spinal cord injury.* Chinese Journal Of Reparative And Reconstructive Surgery 2006. 20;434-438.

[20] Tabakow P, Raisman G, Fortuna W, et al. *Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantatiob of bulbur olfactory ensehathing cells with peripheral nerve bridging.* Cell Transplant 2014. 23;1631-1655.

[21] Cushing, Harvey. 1925. 'The third circulation and its channels', *Lancet*, 2: 851-57. da Silva Meirelles, Lindolfo, Pedro Cesar Chagastelles, and Nance Beyer Nardi. 2006. 'Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues', *Journal of Cell Science*, 119: 2204-13.

[22] Damkier, H. H., P. D. Brown, and J. Praetorius. 2013. 'Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus', *Physiol Rev*, 93: 1847-92.

[23] Spector, Reynold, S. Robert Snodgrass, and Conrad E. Johanson. 2015. 'A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans', *Experimental Neurology*, 273: 57-68.

[24] Paviot, A., N. Bon-Mardion, C. Duclos, J. P. Marie, and N. Guerout. 2011. 'Although olfactory ensheathing cells have remarkable potential to sustain nerve regeneration, they cannot be applied to a severe vagus nerve section/resection model', *Muscle Nerve*, 43: 919-20.

[25] Nash, H. H.; Borke, R. C.; Anders, J. J. (2001): New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. In: *Glia* 34 (2), S. 81–87.

[26] Kachramanoglou, Carolina; Law, Stuart; Andrews, Peter; et al. Culture of Olfactory Ensheathing Cells for Central Nerve Repair: The Limitations and Potential of Endoscopic Olfactory Mucosal Biopsy, NEUROSURGERY 2013

[27] Hauser, Stefan; Widera, Darius; Qunneis, Firas; Müller, Janine; Zander, Christin; Greiner, Johannes et al. (2012): Isolation of novel multipotent neural crest-derived stem cells from adult human inferior turbinate. In: *Stem cells and development* 21 (5), S. 742–756. DOI: 10.1089/scd.2011.0419.