

Abschlussbericht zum Vorhaben

„Isolierung, neurotrophes Potential und Transfer-Eignung von olfaktorischen „Ensheathing“-Zellen als Voraussetzung für den Einsatz zur neuronalen Regeneration nach Rückenmarktraumata“ (FR256)

Laufzeit

01.07.2016 – 31.06.2019

Berichtszeitraum

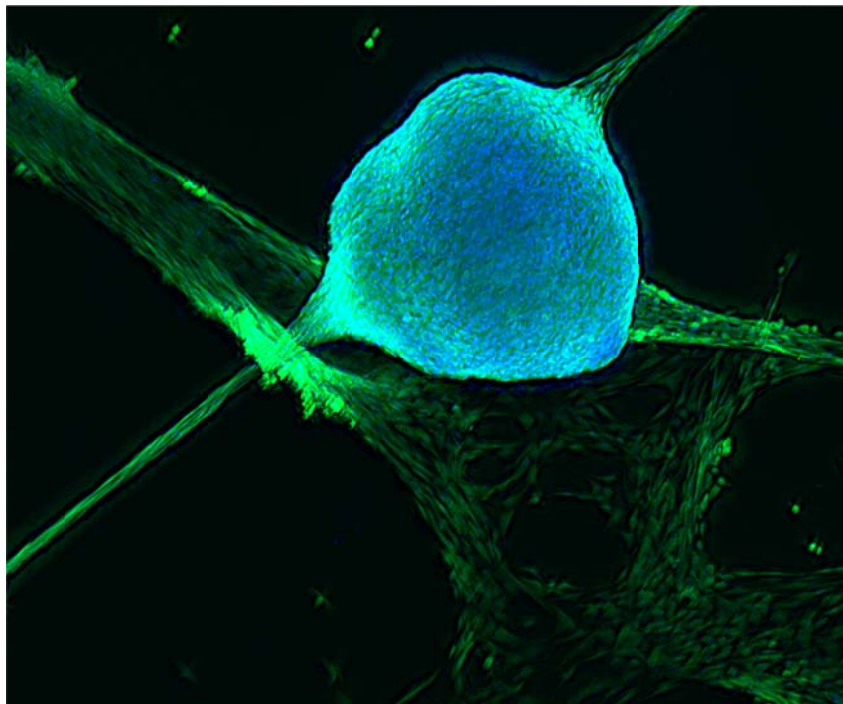
01.07.2016 – 31.06.2019

Bericht vom 07.11.2019

Autoren

Jun.-Prof. Dr. Christina Sengstock; Chirurgische Forschung
Prof. Dr. Manfred Köller; Chirurgische Forschung

Chirurgische Universitätsklinik und Poliklinik
BG Universitätsklinikum Bergmannsheil GmbH
Bürkle-de-la-Camp-Platz 1



Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung

2. Forschungszweck/-ziel

3. Methodik

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

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

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

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

8. Literaturverzeichnis

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Kurzfassung deutsch

Eine Strategie zur Behandlung von traumatischen Rückenmarksläsionen könnte eine autologe Zelltherapie sein. Dabei stellt die olfaktorische Mukosa (OM) eine attraktive Zellquelle dar. Die neuroregenerativen Eigenschaften olfaktorischer multipotenter Stammzellen (OSC) und olfaktorischer Ensheathing-Zellen (OEC) wurden erfolgreich in Tiermodellen gezeigt [1]. Neueste Studien zeigen, dass auch in der respiratorischen Mukosa (RM) Zellen mit neuroregenerativen Eigenschaften vorzufinden sind, die sogenannten Inferior turbinate stem cells (ITSC). Bislang gibt es allerdings keine standardisierten Methoden zur Zellisolierung und Charakterisierung was eine Grundvoraussetzung für den therapeutischen Einsatz darstellt und für die Qualität und Sicherheit essentiell ist. Ziel dieser Arbeit war es, die OEC zu isolieren und nach anschließender Aufreinigung diese zu charakterisieren sowie deren Funktionalität zu bestimmen. Zudem wurde das Verhalten der aufgereinigten Zellen in einer Plasma-Clot-Matrix aus koaguliertem Blutplasma untersucht, welche als Trägermatrix für die Zellen bei einer möglichen Transplantation dienen kann. Durch den Einsatz enzymatischer und mechanischer Methoden konnten Zellen sowohl aus der olfaktorischen Epithelzellschicht als auch aus der Lamina Propria (LP) erfolgreich isoliert, kultiviert und expandiert werden. Des Weiteren war eine Isolierung von Zellen aus der LP der respiratorischen Mukosa den sogenannten ITSC möglich, wobei diese Zellen eine stärkere und schnellere Proliferation als die olfaktorischen Zellen aufwiesen, die durch verschiedene Stimuli beeinflusst werden konnte. Zelluläre und funktionelle Unterschiede zwischen respiratorischer und olfaktorischer Mukosa zeigten sich sehr deutlich. Aus der ET der RM konnten beispielsweise keine vitalen, adhärenen Zellen isoliert werden. Lediglich in der LP der OM konnten p75 (OEC-Marker) positive Zellen in jungen Passagen detektiert werden. Jedoch zeigten sowohl olfaktorische, als auch respiratorische Zellen aus der Lamina propria CD90 (Stammzellmarker) positive Zellen, deren prozentueller Anteil mit zunehmender Passagenanzahl zunahm.

Die Reinheit bzw. die mögliche Kontamination mit Mukus-produzierenden Zellen wurde durch Analyse der Expression des Mucins MUC5AC, sowie CD90, Nestin, p75NTR und EpCAM untersucht. Mucin-positive Zellen konnten direkt nach der Isolierung sowohl in den Zellfraktionen der Epithelzellschicht als auch der Lamina propria der OM nachgewiesen werden. Im Zuge der Kultivierung und Passagierung der Zellen gingen diese allerdings verloren. Durch die Durchführung des Neurosphären-Assay war es möglich, OSC aus der Epithelzellschicht der OM aufzureinigen. Diese waren Nestin- und CD90-positiv und konnten im Vergleich zu Knochenmarksstammzellen nicht in Zellen der mesenchymalen Richtung differenzieren (osteogene und adipogene Differenzierung). Allerdings zeigten diese aufgereinigten Stammzellen in neuronalem Differenzierungsmedium eine Neuronen-ähnliche Morphologie, wobei diese Zellen positive für den neuronalen Marker β -III Tubulin waren. Die frisch isolierte Zellfraktion aus der LP der OM zeigte sowohl p75NTR-positive OEC als auch CD90-positive mesenchymale Stammzellen. Der Anteil der p75NTR-positiven Zellen nahm allerdings im Zuge von weiteren Passagen ab. Durch eine immunomagnetische Aufreinigung konnte eine Anreicherung von p75NTR positiven/ CD90-negativen Zellen OEC werden. Die funktionelle Charakterisierung der aufgereinigten OEC-Fraktion ergab, dass einige Zellen in der Lage waren zu phagozytieren, was ein typisches Charakteristikum von OEC darstellt. Eine Analyse der Zellkulturüberstände von olfaktorischen Ensheathing Zell-Fraktionen mithilfe eines Human Growth Factor Antibody Arrays ergab keine verstärkte Freisetzung neurotropher Faktoren, wie NGF, BDNF oder NT-4/5 im Vergleich zum reinen Zellkulturmedium. Jedoch zeigte sich eine verstärkte Expression von Insulin-like growth factor bindenden Proteinen in diesen Zellkultur-überständen. Diese konditionierten

Zellkulturüberstände führten bei neuronalen embryonalen Stammzellen zu einer Veränderung der Morphologie, wobei diese Zellen eine Neuronen-ähnliche Morphologie aufwiesen und langgestreckte Zellfortsätze aufwiesen. Bei einer möglichen Zelltherapie stellt der autologe Plasma-Clot eine geeignete Zellträgermatrix dar. Die Analyse des Verhaltens der isolierten und aufgereinigten Zellen in solch einer Matrix zeigte, dass diese vital waren, proliferierten und dreidimensional angeordnet waren. Physiologisch würde sich eine solche Matrix nach einer bestimmten Zeit auflösen, wobei die Degradation der Plasma-Clot Matrix in vitro nach sieben Tagen beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend konnten sowohl OEC als auch OSC und ITSC erfolgreich isoliert, aufgereinigt und charakterisiert werden. Es zeigte sich allerdings dass eine reine OEC Zellfraktion mit einer hohen Zellausbeute nicht gewonnen werden konnte. Mukusproduzierende Zellen und Epithelzellen gingen durch die Kultivierung der Zellen allerdings verloren. Die Isolierung und Charakterisierung der OSC war hingegen sehr erfolgreich.

Kurzfassung englisch

A promising strategy to treat spinal cord injuries could be an autologous cell therapy. Due to the lifelong neurogenesis, the olfactory mucosa (OM) might be an attractive cell source. The neuroregenerative properties of olfactory multipotent stem cells (OSC) and olfactory ensheathing cells (OEC) have been successfully demonstrated in animal models [1]. Recent studies have shown that cells with neuroregenerative properties are also found in the respiratory mucosa (RM), the so-called inferior turbinate stem cells (ITSC). Up to now, there are no precise and standard methods for cell isolation and characterization, which is a prerequisite for the therapeutical use and essential for quality and safety. The aim of this study was it to isolate OEC and to characterize these cells after subsequent purification as well as to determine their functionality. In addition, the behavior of the enriched cells was investigated in a plasma-clot-matrix of coagulated blood plasma, which can serve as a carrier-matrix for the cells in case of potential transplantation. Using enzymatic and mechanical methods, cells from both the olfactory epithelial cell layer and the lamina propria were successfully isolated, cultured and expanded. Furthermore, it was possible to isolate cells from the LP of the respiratory mucosa the so called ITSC, whereby these cells had a stronger and faster proliferation than the olfactory cells, which could be influenced by different stimuli. Cellular and functional differences between respiratory and olfactory mucosa could be observed clearly. For example, no vital, adherent cells could be isolated from the ET of RM. Only in the LP of the OM p75 (OEC marker) positive cells could be detected in young passages. However, both olfactory and respiratory cells from the lamina propria showed CD90 (stem cell marker) positive cells, whereby the percentage increased with increasing number of passages.

The purity and possible contamination with mucus-producing cells was examined by analysis of the expression of the mucin MUC5AC, as well as CD90, nestin, p75NTR and EpCAM. Mucin-positive cells could be detected immediately after isolation in both cell-fractions of the epithelial cell layer and the lamina propria of OM. However, during cultivation and passage of the cells these were lost. By performing the neurosphere assay, it was possible to purify olfactory stem cells from the epithelial cell layer of OM. These cells were positive for nestin and CD90 and could not differentiate into cells of the mesenchymal direction compared to bone-marrow stem cells (osteogenic and adipogenic differentiation). However, these purified stem cells displayed a neuronal-like morphology in neuronal differentiation medium and were positive for the neuronal marker β -III Tubulin. The freshly isolated cell fractions from the

lamina propria showed both p75NTR-positive olfactory ensheathing cells and CD90-positive mesenchymal stem cells. However, the share of p75NTR-positive cells decreased during further passages. Via immunomagnetic purification, an enrichment of p75NTR positive/ CD90 negative cells could be achieved. The functional characterization of the purified cell fractions revealed that some of these cells were capable of phagocytosis, which is a typical characteristic of olfactory ensheathing cells. Analysis of cell culture supernatants from the olfactory ensheathing cell fractions using a human growth factor antibody array revealed no increased release of neurotrophic factors such as NGF, BDNF or NT-4/ 5 compared to pure cell culture medium. However, increased expression of insulin-like growth factor binding proteins was found in those cell culture supernatants. These conditioned cell culture supernatants caused a change in the morphology of neuronal embryonic stem cells, which had a neuron-like morphology and elongated cell processes. In a possible cell therapy, the autologous plasma clot represents a suitable cell carrier matrix. The analysis of the behavior of the isolated and purified cells in such a matrix showed that they were vital, proliferate and arranged three-dimensional. Physiologically, such a matrix would dissolve after a certain time, whereby the degradation of the plasma clot matrix could be observed in vitro after seven days.

In summary, olfactory ensheathing cells as well as olfactory stem cells and ITSC were successfully isolated, purified and characterized. However, it was found that a pure OEC cell fraction with a high cell yield could not be obtained. However, mucus-producing cells and epithelial cells were lost by cultivating the cells. The isolation and characterization of the OSC was very successful.

1. Problemstellung

Traumatische Rückenmarksläsionen führen oft zu schweren sensorischen und motorischen Beeinträchtigungen, die bis zur Querschnittslähmung (Paraplegie oder Tetraplegie) führen können [1-2]. Rückenmarkschäden werden vornehmlich durch Hochrasanzverletzungen z.B. durch Sport, Straßenverkehr oder Arbeitsverletzungen hervorgerufen. Hierbei kommt es häufig zu einem Kontinuitätsverlust der Wirbelsäule mit instabilen Frakturen durch direkter Scheer-, 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 Wirbelsäulenabschnitt [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, BDNF, 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 Zelleistungen 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) sind für therapeutische Transplantationen besonders 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. Neueste Studien zeigen, dass auch in der respiratorischen Mukosa (RM) Zellen mit neuroregenerativen Eigenschaften vorzufinden sind, die sogenannten Inferior turbinate stem cells (ITSC).

Generell ist in verschiedenen Studien gezeigt worden, dass die Anwendung von OEC isoliert aus der OM (20 Patienten [16], 8 Pat. [17], 1 Pat. [18]) sowie aus dem OB (16 Pat. [19], 300 Pat. [17], 6 Pat. [18]) bei Patienten mit Rückenmarktraumata zu keinen adversen Effekten führt und bei einer neuronalen Regeneration förderlich sein kann. Den Berichten von Huang et al. [19] fehlt allerdings eine genaue Beschreibung der verwendeten Zellen, so dass eine Beurteilung nicht sinnvoll erscheint. Ein weiterer, von den Autoren als erfolgreich berichteter Einsatz von OEC bei einem Querschnitts-Patienten wurde kürzlich von Tabakow et al. [20] publiziert. In dieser Fallstudie zeigt sich bei der Charakterisierung der Zellen, wie in vielen anderen Studien auch, dass eine Mischkultur von Zellen verwendet (nur 16% p75NGFR-positive OEC; Rest Fibroblasten) wurde, welche nicht genau charakterisiert wurden. Somit ist bei genauer Auswertung der Daten zu konstatieren, dass dieses Fallbeispiel von Tabakow et al. [20] erst ein Hinweis für die klinische Wirksamkeit ist.

Es wurde ebenfalls die Idee der Transplantation der Gesamtmukosa von Lima et al. [16] und Dlouhy et al. [17] umgesetzt, wobei sich ebenfalls Verbesserungen der Motorik und Sensorik zeigten. Allerdings wurden auch schwerwiegende Komplikationen durch die Transplantation hervorgerufen, indem Mukus-produzierende Zellen, welche in der Epithelschicht zu finden sind, mit transplantiert wurden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit der Aufreinigung von olfaktorischen Stamm- und Ensheathing-Zellen und deren Trennung von umliegendem Gewebe, um eine saubere Zellfraktion zu erhalten. Grundsätzlich ist die Isolierung und genaue Charakterisierung des Transplantates die Voraussetzung für einen klinischen Einsatz im ATMP-Verfahren, um eine größtmögliche Sicherheit für Patienten zu gewährleisten.

2. Forschungszweck/-ziel

Im vorliegenden Projekt sollen humane olfaktorische „Ensheathing“-Zellen (OEC) aus der olfaktorischen Mukosa isoliert, charakterisiert und funktionell analysiert werden. Für den möglichen Einsatz zur neuronalen Regeneration nach Rückenmarktraumata ist die Etablierung von Methoden, die eine klinische Umsetzung ermöglichen besonders relevant. Dafür ist es essentiell, die beste Methode zur Isolierung mit der höchsten Zellausbeute zu finden, die Zellcharakterisierung und Funktionalität als Qualitätskontrollen durchzuführen und geeignete Zellträgersysteme (autologer Plasma-Clot als Transfer-Matrix) zu etablieren.

Eindeutiger Forschungsbedarf besteht für die weitere Umsetzung der bisherigen Erkenntnisse hin zu einem klinischen Einsatz der OEC:

- Isolation von OEC zur Vermeidung von kontaminierenden Mukos-produzierenden Mukosa-Zellen*
- geeignetste Isolierungsmethode mit der höchsten Ausbeute an OEC
- Proliferation von OEC zur Bereitstellung ausreichender Zellzahlen für einen klinischen Einsatz
- Testung geeigneter autologer Transport-Matrices für die OEC-Transplantation
- Umfangreiche zellbiologische Charakterisierung der Transplantat-Zellen als Voraussetzung für ein Genehmigungsverfahren

* Dlouhy et al. (2014)

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 der OEC durch die differentielle Adhärenz nach Nash et al.
- Isolierung der OEC mittels p75 beads+/CD90+ nach Singh et al.
- Isolierung und Anreicherung der OEC durch NT3-Stimulation nach Bianco et al.
- Immunhistochemische Untersuchung der OEC
- Proliferationsverhalten der OEC
- FACS-Phänotypisierung
- Analyse der Freisetzung neurotropher Faktoren
- Phagozytose-Eigenschaft der isolierten OEC
- Einfluss löslicher Faktoren der OEC auf neuronale Stammzellen
- Analyse der Zellviabilität, der Zellproliferation und Zellorientierung in einer Plasmaclot-Matrix

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

Tabelle 1: Detaillierter Arbeits- und Zeitplan(grau: durchgeführt)

| Arbeitspakete | 2016 | | | | | | | | | | | | 2017 | | | | | | | | | | | | Laufzeit Monate |
|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|--------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| AP 1: optimale Aufreinigungsmethode der OEC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 14 M |
| Entnahme der olfaktorischen Mukosa (PD Dr. A. Minovi) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Isolierung der OEC durch differentielle Adhärenz nach Nash | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Isolierung der OEC mittels p75 beads+/CD90- nach Singh | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Isolierung und Anreicherung der OEC durch NT3 Stimulation nach Bianco | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AP 2: Charakterisierung der isolierten humanen OEC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 14 M |
| Immunhistochemische Untersuchung der OEC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proliferationsverhalten der OEC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FACS-Phänotypisierung in Abhängigkeit von der Zellzahl | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AP 3: Funktionalität der isolierten humanen OEC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 14 M |
| Analyse der Freisetzung neurotropher Faktoren | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Phagozytose-Eigenschaft der isolierten und expandierten OEC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Einfluss löslicher Faktoren von OEC auf Proliferation von H9 Zellen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Einfluss der OEC-Faktoren auf neuronale Differenzierung von H9-Zellen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AP 4: Verhalten in einer Plasmaclot-matrix | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 13 M |
| Analyse der Zellviabilität, der Zellproliferation und Zellorientierung in einer Plasmaclot-matrix | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sekretion neurotropher Faktoren aus der Plasmaclot-Matrix | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Analyse der neuronalen Differenzierung von H9 Zellen in der Träger-Matrix | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AP 5: Dokumentation und Auswertung | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | 13 M |
| Verdatung der Ergebnisse | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zwischenbericht | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

M: Monate; AP: Arbeitspakete

3.1.2 Tatsächliche Arbeits- und Zeitabläufe

Die gesetzten Ziele wurden alle im Projektzeitraum erreicht. Allerdings war es aufgrund der zu geringen Zellausbeute von OEC (angereicherte Zellzahl max. 1000 Zellen pro Biopsie) nicht möglich ausreichende und messbare Mengen neurotropher Faktoren aus der Plasmaclot-Matrix und die neuronale Differenzierung der H9 Zellen in einer Träger-Matrix zu detektieren.

Zu den geplanten Untersuchungen wurden noch zusätzliche Untersuchungen durchgeführt:

- Einsatz weiterer Isolierungs- und Aufreinigungsmethoden (siehe Abbildung 1) um die Ausbeute der Zellfraktionen zu erhöhen

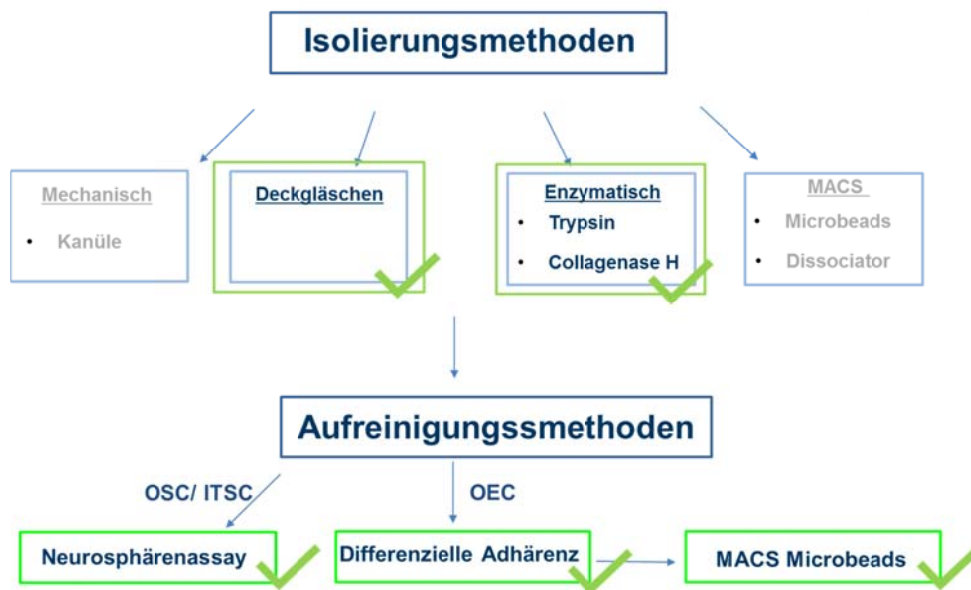


Abbildung 1: Schematische Darstellung der verwendeten Isolierungs- und Aufreinigungsmethoden für die OEC aus der Lamina propria, der OSC aus der Epithelschicht der OM, sowie der ITSC aus der RM. Die grünen Haken und Kästchen kennzeichnen die erfolgreichen Methoden, mit denen die Zellfraktionen isoliert und aufgereinigt werden konnten.

- Einsatz von Forskolin und Bovinem Pituitary Extrakt als Proliferationsstimulus für OEC
- Aufreinigung und Charakterisierung olfaktorischer Stammzellen aus der Epithelschicht
- Aufreinigung und Charakterisierung von ITSC aus der respiratorischen Mukosa
- Untersuchungen zum zellulären und funktionellen Unterschied zwischen respiratorischer und olfaktorischer Mukosa
- Degradationsverhalten der Plasmaclot-Matrix

3.2. Verwendete Methoden

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 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 Naphazolin getränkter Watte für die Dauer von 10 Minuten 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 OEC und OSC aus der olfaktorischen Mukosa und ITSC aus der respiratorischen Mukosa

Zur Trennung der Epithelschicht (ET) von der Lamina propria (LP) wurden die Gewebestücke der olfaktorischen Mukosa (OM) sowie der respiratorischen Mukosa (RM) mittels Pinzette zerkleinert bzw. zerpflückt. Die OSC/OEC der OM, sowie die ITSC der respiratorischen Mukosa wurden anschließend nach verschiedenen Methoden isoliert und kultiviert. Die Gewebestücke der Lamina propria und der Epithelschicht wurden dazu in HBSS gewaschen und anschließend die Zellen mittels verschiedener Isolierungsmethoden (z.B. enzymatisch, mechanisch, MACS Dissociator) isoliert (siehe Abb. 2). In der Abbildung 2 sind die verwendeten Isolierungsmethoden dargestellt. Die mechanische Isolierung erfolgte nach Delorme et al., 2009; die Deckgläschenmethode nach Girard et al., 2011; die MACS Dissociator Methode nach den Herstellervorgaben von Miltenyi und die enzymatische Isolierung der Zellen nach Paviot et al., 2011; Ramon-Cueto et al., 1998; Matigan et al., 2010; Kachramanoglou et al., 2013; Hauser et al., 2012 und Hashemi et al., 2016.

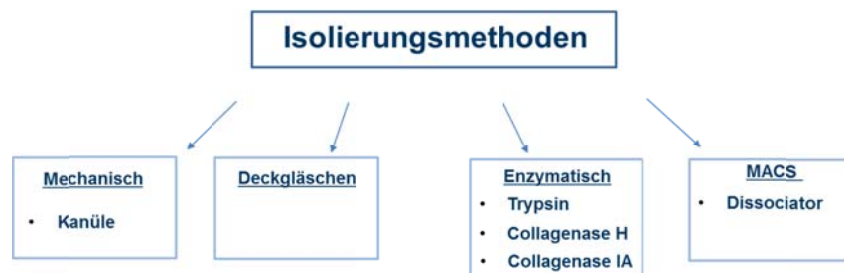


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verwendeten Isolierungsmethoden zur Isolation von OEC/OSC aus der olfaktorischen Mukosa und ITSC aus der respiratorischen Mukosa.

Die isolierten Zellgemische wurde in DMEM/F-12 Glutamax/10%FCS ausgesät und bei 37°C inkubiert. Nach ca. 14 Tagen konnten die adhärennten Zellen in Zellkulturflaschen expandiert werden.

Zur weiteren Aufreinigung der Zellgemische wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden angewandt. Das isolierten Zellgemische aus der ET und LP der OM wurde z.B. nach der Methode von Nash *et al.*, 2011 (differentielle Adhärenz); sowie dem MACS Microbeadsystem zur immunomagnetischen Zellseparation (positive /negative Selektion) und mittels des Neurosphärenassays nach Reynolds und Rietze, 2005 aufgereinigt.

Nach erfolgter Isolierung und erster Analyse der Zellpopulationen, wurden die gewonnenen Zellgemische weiter aufgereinigt, um die OEC von den OSC aus der OM zu trennen und somit möglichst reine Zellpopulationen zu erhalten (siehe Abb.1). Da sich die enzymatische Isolierung als die geeignetste Isolierung für OEC und OSC/ITSC zeigte bzw. die

Deckgläschenmethode zur Isolierung von OSC und ITSC, wurden die Zellen dieser Isolierungsmethoden weiter mit verschiedenen Methoden aufgereinigt.

Wie Abbildung 1 zeigt, wurden die isolierten Zellen aus der OM und RM mittels 3 verschiedener Methoden aufgereinigt: Die Aufreinigung mittels differenzieller Adhärenz nach Nash et al., 2001 und das MACS Microbeadssystem zur Aufreinigung von OSC aus der Epithelschicht und OEC aus der Lamina propria, sowie dem Neurosphären Assay, zur weiteren Aufreinigung von OSC aus der olfaktorischen bzw. ITSC aus der respiratorischen Mukosa. Diese aufgereinigten Zellfraktionen wurden anschließend lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch analysiert.

Kryokonservierte humane mesenchymale Knochenmarkstammzellen (BhMSC) als Positivkontrolle, wurden von der Fa. Lonza Walkersville Inc. (Walkersville, MD, USA) bezogen und somit war kein Ethikvotum notwendig.

3.3 Proliferationsverhalten

3.3.1 Alamarblue Assay

Zur Bereitstellung ausreichender Zellzahlen für einen klinischen Einsatz ist eine Zellvermehrung wünschenswert.

Zur Untersuchung der metabolischen Zellaktivität in unterschiedlichen Medien, welche mit der Zellproliferation korreliert, wurde der AlarmaBlue-Assay verwendet.

Die Zellen wurden zuerst auf 48-Well-Platten mit einer Zellzahl von 1×10^4 in normalem Zellkulturmedium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium ausgetauscht gegen:

- 1.) DMEM/F-12 Glutamax/10%FCS (Kontrollansatz)
- 2.) DMEM/F-12 Glutamax/0%FCS
- 3.) DMEM/F-12 Glutamax/0,2%FCS
- 4.) DMEM/F-12 Glutamax/10%FCS/1xG5-Supplement
- 5.) DMEM/F-12 Glutamax/10%FCS/1xNeurotrophin 3-Supplement
- 6.) DMEM/EGF 20 ng/mL/FGF-2 40ng/mL/Heparin 0,5 U/ml/1xB27 Supplement

Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (BhMSC) dienten als Kontrollansätze. Nach ca. 3 Tagen Inkubation wurde dem Medium AlamarBlue im Verhältnis 1:10 zugegeben. Die Zellen wurden ca. 2 Stunden bei 37°C inkubiert, bis ein Farbumschlag von Blau nach Rot zu beobachten war. Die photometrische Analyse erfolgte am Fluoreszenzreader FLUOstar Optima.

3.3.2 BCA Protein Assay

Der BCA Protein Assay wird für die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in einer Probe verwendet und gibt Aufschluss über die Zellproliferation in den unterschiedlichen Medien. Dafür wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Lysis-Puffer für 30 Minuten bei 8°C auf dem Schüttler lysiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, in Eppendorf-Gefäße überführt und für 5 Minuten bei 14.000g zentrifugiert. Es folgte der Assay mit Hilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Dazu wurde eine BCA-Standard-Reihe zur Kontrolle erstellt und auf eine 96- Well-Platte gegeben. Die Proben wurden der Reihe nach aufgetragen und die verschiedenen Reagenzien des Kits

aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C erfolgte die Messung der optischen Dichte am MRX Microplate Reader.

3.4 Immunhistochemische Untersuchung der olfaktorischen Ensheathing-Zellen

Um die Reinheit der isolierten Zellen zu bestimmen, wurden immunhistochemische Untersuchungen der isolierten OEC durchgeführt. Dafür wurden die Zellen auf ChamberSlides ausgesät, fixiert und ggf. permeabilisiert und folgende Antikörper zur Charakterisierung verwendet: Nestin (neuronale Stammzellen; Gliazellen und Astrozyten), p75^{NGF} (Schwann-Zellen und OEC), GFAP (Gliazellen), CD326, EpCAM (Epithelzellen), MUC5AC (Mucus-produzierende Zellen, Stammzellmarker CD90 sowie β -Tubulin III (unreife und reife olfaktorische Rezeptorneurone). Zusätzlich wurden die Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt. Um die Reinheit der isolierten Zellfraktionen auch nach längerer Zeit in Zellkultur zu bestimmen, wurde neben den frisch isolierten Zellen auch Zellen nach einer Kultivierungszeit von mehr als 21 Tagen untersucht.

3.5 FACS-Phänotypisierung in Abhängigkeit von der Zellzykluszahl

Um die Identität und Reinheit der isolierten und expandierten olfaktorischen Zellen zu bestimmen, wurden diese Zellen auf ihr selektives Oberflächenexpressionsmuster mittels FACS-Analyse nach verschiedenen Zellzyklen analysiert, weil die Expression der Epitope abhängig von der Zellteilung ist. Folgende Oberflächenexpressionsmarker wurden eingesetzt: CD34, CD45, CD90, CD105, Epcam, Nestin, Cytokeratin-18, Cytokeratin-14, NCAM, HNK-1 sowie p75NTR und O4 (OEC-Marker).

3.6 Analyse der Freisetzung neurotropher Faktoren

Ein wichtiger Aspekt beim Einsatz isolierter und expandierter OEC ist deren Funktionalität nach entsprechender Expansion. Da kürzlich gezeigt wurde, dass OEC parakrine Faktoren freisetzen [Yang et al. 2015], wurden Zellkulturüberstände nach der Isolierung und Kultivierung über Human Neuro Discovery Array C2 und Human Stem Cell Array C1 hinsichtlich der Freisetzung neurotropher, parakriner Faktoren analysiert (z.B. CNTF, S100 sowie NGF, BDNF).

3.7 Phagozytose-Eigenschaft der isolierten OEC

Eine besondere Eigenschaft der OEC ist die Phagozytose degenerierter Zellen, welcher ein wichtiger Mechanismus im Rahmen axonaler Regeneration ist. Bei der Phagozytose handelt es sich um eine spezielle Form der Endozytose, bei der kleine Partikel wie Zelltrümmer, Viruspartikel oder Bakterien aktiv in eine Zelle aufgenommen werden. Die Aufnahme geschieht in Phagosomen, die anschließend mit Lysosomen verschmelzen, angesäuert werden und zum Phagolysosom reifen.

Um die Phagozytoseeigenschaften von OEC zu untersuchen, wurde der Phagozytose-Assay durchgeführt. Dazu wurden OEC-Fraktionen, die aus der LP der OM gewonnen und immunomagnetisch aufgereinigt wurden, verwendet. Als Positivkontrolle dienten PMN, die aus EDTA-Vollblut gewonnen wurden (English und Andersen 1974) und als Negativkontrolle BhMSC. Die zu untersuchenden Zellen wurden in eine 4-Well-Glaskammer ausgesät und über Nacht kultiviert, bis sie adhärent gewachsen waren. Danach wurden die Zellen mit 1×10^6 Fluorescein Isothiocyanat (FITC) markierten avitalen *Escherichia Coli* (*E. Coli*) Biopartikel (Invitrogen) behandelt. Die Inkubation der Biopartikel erfolgte über Nacht. Am

nächsten Tag wurden die Biopartikel durch mehrmaliges Waschen mit PBS aus den Kammern entfernt. Im Anschluss wurden die Lysosomen der Zellen mittels Lyotracker® Red DND-99 (Invitrogen) nach Herstellerangaben gefärbt. Die Auswertung geschah mit dem CLSM.

3.8 Einfluss löslicher Faktoren von OEC auf neuronale Stammzellen

Neueste Studien mit OEC zeigen, dass die Proliferation von neuronalen Stammzellen durch lösliche Faktoren der OEC inhibiert und die Migration sowie die neuronale Differenzierung gefördert werden soll [Sethi et al. 2014]. Um den Einfluss von OEC Überständen auf das Zellverhalten (Viabilität/ Morphologie) zu untersuchen, wurden H9-Zellen verwendet. Für die Kultivierung von H9-Zellen wurden die Kulturgefäße zunächst mit 0,001 % Poly-L-Ornithin (Sigma-Aldrich) beschichtet. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde das Gefäß zweimal mit aq. dest. gewaschen und anschließend mit 10 µg/ml Laminin (Sigma-Aldrich) überschichtet. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Gefäße zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS überschichtet und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Für die Untersuchung des Einflusses von OEC-Überständen wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well einer 24-Well-Kulturplatte in H9-Zellkulturmedium ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert, sodass die Zellen adhären konnten. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Als Kontrolle diente H9-Zellkulturmedium. Zudem wurden H9-Zellen mit Überständen von OEC Fraktionen, die durch immunomagnetische Isolierung gewonnen wurden, behandelt.

3.9 Differenzierungspotenzial der OSC aus der OM und ITSC aus der RM

Das Differenzierungspotenzial der gewonnenen und mittels Neurosphären-Assay aufgereinigten OSC (OM)/ITSC (RM) wurde hinsichtlich ihrer Fähigkeit, in neuronale als auch mesodermale (adipogen und osteogene Differenzierung) Richtung zu differenzieren, untersucht.

3.9.1 Osteogene Differenzierung

Bei einer osteogenen Differenzierung wird die Fähigkeit von Zellen, sich in Knochenzellen zu differenzieren, untersucht. Durch die Mineralisierung von Calcium kann ein Nachweis des Differenzierungspotenzials durchgeführt werden.

Für die osteogene Differenzierung wurde der StemPro™ Osteogenesis Kit (Gibco) verwendet. Es wurden 2×10^4 Zellen in DMEM/F-12, Glutamax™ Supplement, 10 % FCS auf einer 24-Well-Kulturplatte ausgesät. Humane mesenchymale Knochenmarks-Stammzellen (BhMSC) dienten als Positivkontrolle und wurden in RPMI1640, 10 % FCS kultiviert. Nach 72 h wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch osteogenes Differenzierungsmedium ersetzt. Die Ansätze wurden für 21 Tage bei 37 °C inkubiert. Zellen in DMEM/F-12, Glutamax™ Supplement, 10 % FCS dienten als Kontrolle. Für den Nachweis des Differenzierungspotenzials wurde eine Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) Färbung durchgeführt. Alizarin Red S färbt kalzifizierte Zellmatrices an, die durch die Mineralisierung während der Differenzierung entstehen. Für die Färbung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min in 10 % Formaldehyd fixiert und anschließend dreimal mit ddH₂O gewaschen. Eine 1%ige Alizarin Red S Lösung wurde in Ethanol angesetzt, gefiltert und im Anschluss auf die Zellen gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden dann unter fließendem Wasser gewaschen

und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Ansätze unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

3.9.2 Adipogene Differenzierung

Bei einer adipogenen Differenzierung wird die Fähigkeit von Zellen, sich in Fettzellen zu differenzieren, untersucht. Durch die Einlagerung von Lipiden kann ein Nachweis des Differenzierungspotenzials durchgeführt werden.

Für die adipogene Differenzierung wurde der StemPro™ Adipogenesis Kit (Gibco) verwendet. Es wurden 2×10^4 Zellen in DMEM/F-12, Glutamax™ Supplement, 10 % FCS auf 24-Well-Kulturplatten ausgesät. BhMSC dienten als Positivkontrolle und wurden in RPMI1640, 10 % FCS kultiviert. Nach 48 h wurde das Zellkulturmedium (DMEM/F-12, Glutamax™ Supplement, 10 % FCS) entfernt und durch adipogenes Differenzierungsmedium (Gibco) ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen bei 37 °C wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bodipy® 493/503 (Invitrogen) gefärbt. Dazu wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1 µg/ml Bodipy® für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit 150 mM NaCl gewaschen. Es wurde zudem eine Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342 in PBS für 5 Minuten bei RT durchgeführt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop BX-61 (Olympus).

3.9.3 Neuronale Differenzierung

Um die neuronale Differenzierung zu untersuchen wurde der StemPro™ Neurogenesis Kit (Gibco) verwendet. Es wurden 1×10^4 Zellen pro Well einer 4-Well-Glaskulturplatte in DMEM/F-12, Glutamax™ Supplement, 10 % FCS ausgesät. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch neuronales Differenzierungsmedium (Gibco) ersetzt. Alle drei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Nach sieben Tagen wurden die Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen β -III Tubulin gefärbt. Dazu wurde zunächst nach zweimaligem Waschen mit PBS die Permeabilisierung der Zellen mit BD Perm&Wash 1:10 in Aqua dest. für 30 Minuten bei RT durchgeführt. Anschließend wurden die vorher fixierten Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit 3%FCS/PBS zum Blocken für die Vermeidung von unspezifischen Bindungsstellen für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS konnte die Inkubation bei RT im Dunkeln mit dem β -Tubulin III Antikörper (10µg/ml) in 3%FCS/PBS erfolgen und im Anschluss die Zellkernfärbung mittels Hoechst 33342 in PBS für 5 Minuten bei RT durchgeführt werden. Danach wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen und mit 500µl PBS bedeckt und im Zeiss CLSM analysiert.

3.10 Verhalten von Zellen in einer autologen Plasmaclot-Matrix

Ein autologer Plasma-Clot könnte eine geeignete Transfer-Matrix von Zellen bei Transplantationen sein, weil dafür ausschließlich autologes Material eingesetzt werden könnte und allogene oder xenogene Zusätze wie bei kommerziellen Fibrinmatrices oder biodegradierbaren Trägersubstanzen nicht nötig sind. Zusätzlich enthält der Plasma-Clot Wachstumsfaktoren, welche sich positiv auf die Zellviabilität und -proliferation auswirken. Des Weiteren ist die viskoelastische Konsistenz des Plasmaclots ideal für den Bereich Knochenmark. Deshalb wurde in diesem Projekt das Verhalten der OEC in einer Plasma-Clotmatrix untersucht.

3.10.1 Herstellung einer der Plasmaclot-Matrix

Thrombozytenfreies (Plasma Ethikvotum16-5753_5-BR) wurde durch Zentrifugation (2000 x g, 45 min) aus Citrat-Blut freiwilliger Spender gewonnen. Für die Herstellung der Plasmaclot-Matrix wurde je Ansatz zunächst Plasma in ein steriles Schraubröhrchen vorgelegt. Die humanen Zellfraktionen und zellfreies Blutplasma wurden im Volumenverhältnis 1:1 verwendet. Nach Zugabe von 5 % (bezogen auf Plasmavolumen) einer 10 %igen CaCl_2 -Lösung zur Koagulation wurden die Ansätze in Kavitäten einer 24-Well-Zellkulturplatte pipettiert und bis zur vollständigen Koagulation der Plasmaclot-Matrix im Brutschrank inkubiert. Nach Koagulation wurden die Clots mit DMEM/HAM F12 + 10%FCS bedeckt.

3.10.2 Einfluss der Plasmaclot-Matrix auf die Viabilität und Proliferation von OEC

Zum Nachweis der Zellvitalität und zur Beurteilung der Zellverteilung bzw. -orientierung in einer Plasmaclot-Matrix wurde nach 24 h und 5 Tagen ein fluoreszenz-basierter Assay durchgeführt, um durch eine differenzierende Zwei-Farben-Markierung (Calcein-AM Propidiumjodid) vitale und avitale Zellen gleichzeitig sichtbar zu machen (Konfokales Laserscanning Mikroskop; CLSM).

3.10.3 Sekretion neurotropher Faktoren aus der Plasmaclot-Matrix

Die Freisetzung von Faktoren wie z.B. Platelet-derived growth factor, Neuropeptid Y und S100 sowie NGF, BDNF, Neurothrophin-3 und 4 aus der Plasmaclot-Matrix ins Zellkulturmedium sollte über Human Growth Factor Antibody Array und ELISA analysiert werden.

3.10.4 Analyse der neuronalen Differenzierung von Zellen in der Träger-Matrix

Eine Voraussetzung der Verwendung solch einer Trägermatrix bei Zelltransplantation ist, dass die Funktionalität der Zellen nicht eingeschränkt wird. Deshalb sollte der Einfluss von OEC auf die Migration und die neuronale Differenzierung von H9 Zellen durch eine 3D *in vitro*-Kokultur von OEC und H9 Zellen untersucht werden. Dafür wurden Plasmaclot-Matrices mit unterschiedlichen Zellzahlen von OEC hergestellt werden (Zellzahl 10.000-50.000/ml Clotvolumen). Nach Koagulation der OEC beladenen Plasmaclot-Matrix sollen H9 Zellen auf dieser Plasmaclot-Matrix ausgesät werden. Die Migration der H9 Zellen in den Clot (Richtung der OEC) auf dieser beladenen Matrix soll immunhistochemisch (CLSM) analysiert werden. Dabei soll untersucht werden, ob die H9 Zellen sich in Richtung der OEC (p75 markiert), welche sich im inneren der Plasmaclot-Matrix (AlexaFluor 594-markiertem Fibrinogen) befinden, ausrichten. Die Migration (μm) der H9 Zellen in die Trägermatrix soll mit dem Laser-Scanning Mikroskop (z-stack-Tool) der Software Zeiss2010 bestimmt werden. Die neuronal Differenzierung der H9 Zellen auf der Trägermatrix soll mittels β -Tubulin III, sowie Neurofilament für die Axonausrichtung qualitativ bestimmt werden.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

4.1. Isolierung und Kultivierung von olfaktorischen Stammzellen/ITSC

4.1.1 Isolierung von Zellen aus der Epithelschicht der OM und RM

Zur Isolierung von Zellen aus der Epithelschicht (ET) der olfaktorischen und respiratorischen Mukosa wurden zunächst nach der Trennung der Gewebsschichten die einzelnen Gewebsstücke mechanisch mittels einer Mikropipette zerkleinert. Nach ca. 3 Tagen konnten adhärenente, fibroblasten-ähnliche Zellen sowie epitheliale Zellcluster beobachtet werden (Abb. 3). Diese konnten allerdings nur aus der ET der olfaktorischen Mukosa (Abb. 3A und B) isoliert werden, wohingegen aus der ET der respiratorischen Mukosa keine adhärenente Zellen isoliert werden konnten (Abb. 3C und D). Die ausgebreiteten, epithel-ähnlichen Zellcluster waren allerdings nur kurzlebig und starben nach ca. 7 Tagen in Kultur oder nach dem Einsatz von Trypsin beim passagieren ab. Nach dieser Zeit zeigten sich nur noch langgestreckte Zellen mit einer fibroblasten-ähnlicher Morphologie. Abbildung 3 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der isolierten Zellen aus der Epithelschicht der olfaktorischen (Abb. 3A und B) und respiratorischen Mukosa (Abb. 3C und D), 3 und 7 Tage nach erfolgter Isolation nach Paviot *et al.*, 2011.

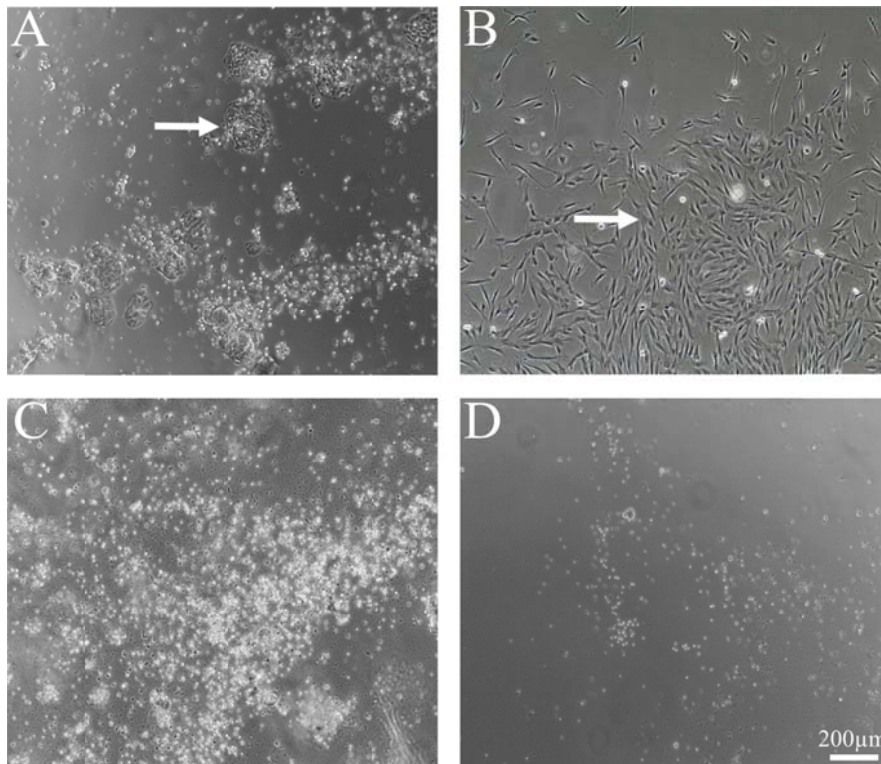


Abbildung 3: Isolierte Zellen der Epithelschicht der olfaktorischen (A-B) und respiratorischen Mukosa (C-D). Die isolierten Zellen der olfaktorischen Mukosa zeigten zu Beginn nach ca. 3 Tagen epitheliale Zellcluster (A, weißer Pfeil), die nach ca. 7 Tagen abstarben, sowie Zellen mit fibroblasten-ähnlicher Morphologie (B, weißer Pfeil). Aus der respiratorischen Mukosa konnten weder nach 3 Tagen (C), noch nach 7 Tagen (D) adhärenente, vitale Zellen isoliert werden.

Wie in Abbildung 3 zu erkennen, konnten lediglich bei Zellen aus der OM nach ca. 3 Tagen in Kultur vereinzelt Epithel-ähnliche Zellcluster, sowie langgestreckte fibroblasten-ähnliche

Zellen beobachtet werden. Diese adärenten, langgestreckten Zellen zeigten nach ca. 10 Tagen eine homogene Verteilung, wohingegen die epithelialen Zellcluster verschwanden. Aus der Epithelschicht der RM konnten selbst nach längerer Inkubation keine adhärenenten, vitalen Zellen isoliert werden.

4.1.2 Charakterisierung der OSC aus der Epithelschicht der OM

Zur Charakterisierung der isolierten Zellen wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt um die Reinheit der gewonnenen Zellfraktionen zu bestimmen. Dazu wurden die gewonnenen Zellfraktionen nach Isolierung auf 4-Well-Glaskammern ausgesät und nach dem Einsatz von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern am CLSM untersucht. Neben den typischen Stammzellmarker CD90 und dem neuronalen Marker Nestin, wurde die Expression von EpCAM als Epithelzellmarker und MUC5AC als Marker für Mukus-produzierende Zellen untersucht.

Abbildung 4 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Expression von Nestin und CD90 der Zellen aus der ET der OM. Es ist zu erkennen, dass die isolierten Zellen aus der ET der OM sowohl Nestin (Abb. 7A), als auch CD90 (Abb. 7B) exprimieren.

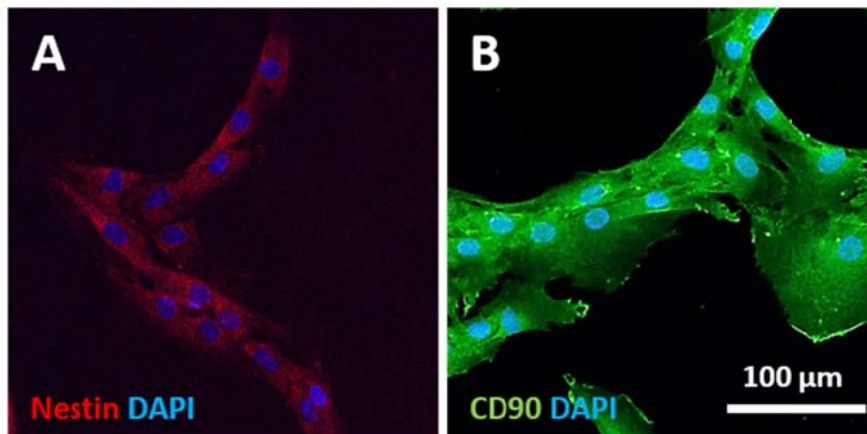


Abbildung 4: Repräsentative CLSM-Aufnahmen von Zellen aus der ET der OM. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen aus der ET der OM nach der Nestin (A) und CD90 (B) Färbung. Die Zellen der ET der OM wurden nach erreichter Konfluenz in 4-Well-Glaskammern ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Nestin und CD90 behandelt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt.

Um Mukus-produzierende Zellen nachzuweisen, wurde eine Untersuchung des Mucins MUC5AC durchgeführt, wobei hBMSC als Kontrollgruppe mitgefärbt wurden, da diese negativ für MUC5AC und positiv für CD90 sind. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

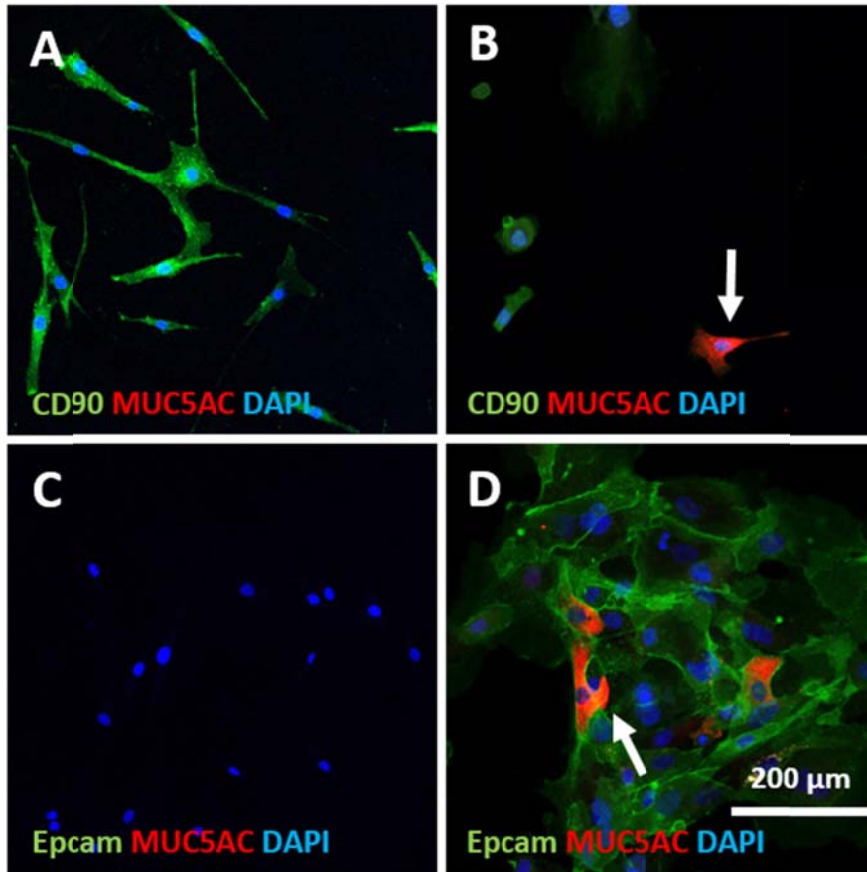


Abbildung 5: Repräsentative CLSM-Aufnahmen der frisch isolierten Zellen aus der ET der OM. Dargestellt sind die Zellen nach der EpCAM, MUC5AC, CD90 und DAPI Färbung (B, D). hBMSC dienten als Kontrolle (A, C). Die Zellen der OM wurden direkt nach der Isolierung in 4-Well-Glaskammern ausgesät und mit CD90 (grün) und MUC5AC (rot) gefärbt (A, B). (C) und (D) zeigen den Nachweis von EpCAM (grün) und MUC5AC (rot). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Weiße Pfeile zeigen MUC5AC-positive Zellen.

Abbildung 5 zeigt, dass der Oberflächenmarker CD90 sowohl von hBMSC als auch von Zellen aus der ET der OM exprimiert wird (Abb. 5A+B). Die frisch isolierten Zellen der OM weisen des Weiteren eine Vielzahl an EpCAM-positive Zellen (Abb. 5D), und einige MUC5AC-positive Zellen auf (weiße Pfeile, Abb. 5B+D). Die als Kontrolle dienenden hBMSC sind negativ für MUC5AC und EpCAM (Abb. 5C).

Neben den frisch isolierten Zellen wurden Zellen nach einer Kultivierungszeit von mehr als 21 Tagen ebenfalls untersucht, um die Reinheit nach der Kultivierung und dem damit verbundenen Einsatz von Trypsin zu kontrollieren. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 6 dargestellt.

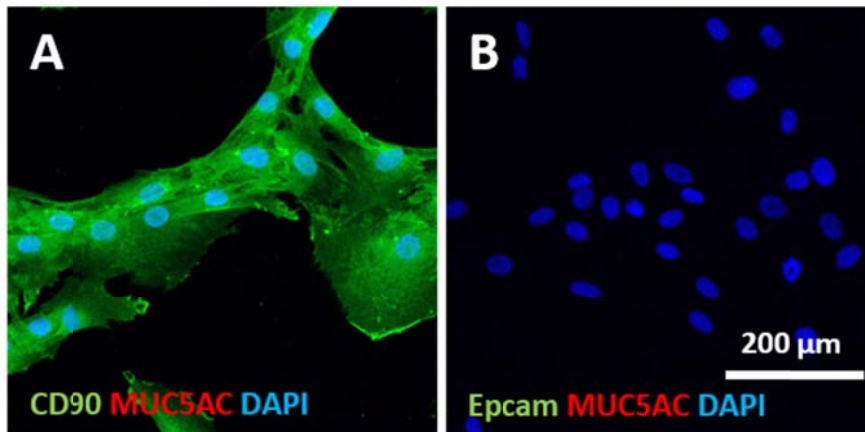


Abbildung 6: Repräsentative CLSM-Aufnahmen der immunhistochemischen Charakterisierung von isolierten und kultivierten Zellen aus der ET der OM. Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen nach Kultivierung und Passagieren (1.P). (A) zeigt den Nachweis von CD90 (grün) und MUC5AC (rot), (B) von EpCAM (grün) und MUC5AC (rot). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt.

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse des immunhistochemischen Nachweises von MUC5AC-produzierenden Zellen, der CD90 und EpCAM Expression nach erfolgter Kultivierung und Passage. Es zeigt sich, dass die Zellen der ET der OM CD90-positiv sind (Abb. 6A). Eine Expression von EpCAM und MUC5AC der Zellen ist nach einer Kultivierungszeit von mehr als 21 Tagen nicht mehr zu detektieren (Abb. 6B).

4.1.3 Aufreinigung der OSC mittels Neurosphären-Assay

Um Stammzellen aus der ET der OM aufzureinigen wurde der sogenannte Neurosphären-Assay eingesetzt. Dieser dient dazu, neuronale Stamm- und Vorläuferzellen aus einem Zellgemisch zu separieren. Die gebildeten Zellcluster können dabei nach erfolgtem Ablösen eingesammelt und kultiviert werden. Dabei werden im Zuge des Neurosphären-Assays 24-Well-Zellkulturplatten vorab mit 100 µg/ml PLL beschichtet. Die isolierten und kultivierten Zellen aus 4.1.1 werden nach dem ersten Passagieren in Anwesenheit des Neurosphärenmediums (0,5 U/ml Heparin, 50 ng/ml EGF, 50 ng/ml bFGF, 1xB27 Supplement, 1 % ITS in DMEM/F-12 GlutamaxTM Supplement) ausgesät. In Abbildung 7 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der Neurosphärenbildung dargestellt. Wie anhand der Abbildung zu erkennen ist, beginnen die Zellen nach etwa fünf Tagen zusammenzulaufen (weiße Pfeile, Abb. 7A). Nach zwei weiteren Tagen bilden sich erste Zellcluster die in der Folge Neurosphären bilden (weißer Pfeil, Abb. 7B). Eine immunhistologische Charakterisierung der gebildeten Neurosphären wurde ebenfalls durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Dazu wurden die gebildeten Neurosphären eingesammelt und auf PLL-beschichtete 4-Well-Glasplatten überführt. Die gebildeten Neurosphären wurden daraufhin am CLSM untersucht, wobei die Expression der Marker CD90 und Nestin analysiert wurde. Es ist zu erkennen, dass die Zellen der gebildeten Neurosphären den Oberflächenmarker CD90 (Abb. 8B) und intrazellulär Nestin (Abb. 8C) exprimieren.

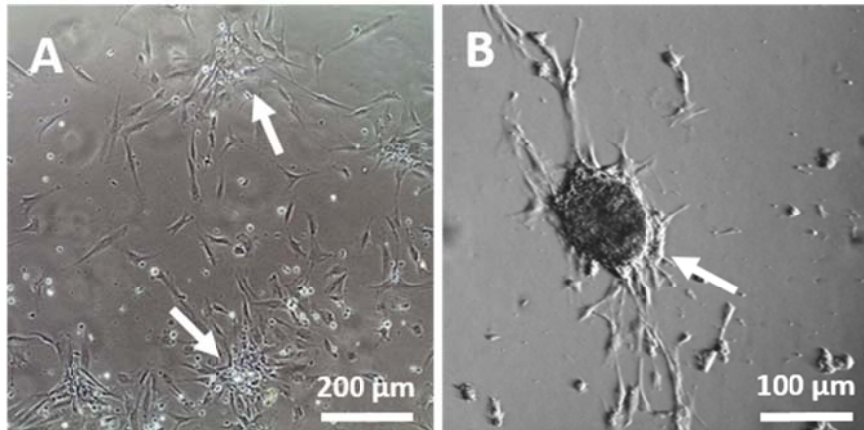


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Neurosphärenbildung. Es wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen aus der ET der OM pro Well einer PLL-beschichteten 24-Well-Kulturplatte ausgesät und mit Neurosphärenmedium (0,5 U/ml Heparin, 50 ng/ml EGF, 50 ng/ml bFGF, 1xB27 Supplement, 1 % ITS in DMEM/F-12 GlutamaxTM Supplement) kultiviert. Nach fünf div war ein Zusammenlaufen der Zellen zu beobachten (A), wobei nach weiteren fünf Tagen diese dann Neurosphären bildeten (B).

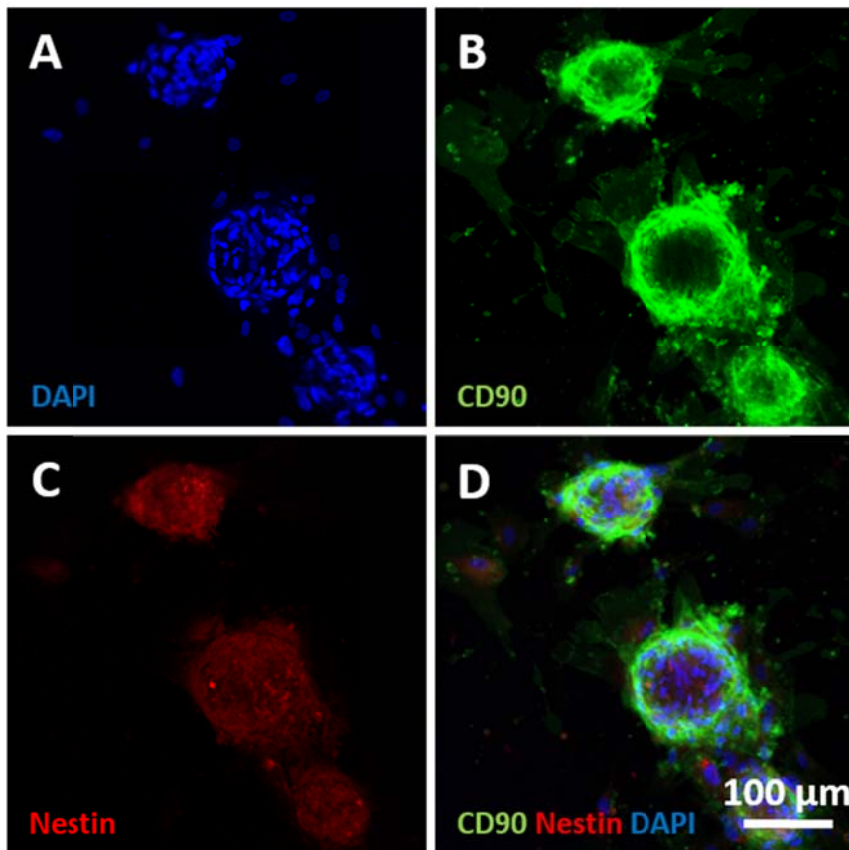


Abbildung 8: CLSM-Aufnahmen von immunhistochemisch gefärbten Neurosphären aus der ET der OM. Die gebildeten Neurosphären wurden mit Antikörpern gegen CD90 und Nestin und Hoechst 33342 gefärbt. In (A) ist die Färbung der Zellkerne mit Hoechst 33342 dargestellt, in (B) ist der Nachweis von CD90 und in (C) von Nestin gezeigt. In (D) ist eine Überlagerung der Fluoreszenzen dargestellt.

4.1.4 Differenzierungspotenzial der aufgereinigten olfaktorischen Stammzellen

Das mesenchymale und neuronale Differenzierungspotenzial der so aufgereinigten OSC aus der ET der OM wurde anschließend untersucht. Zur Charakterisierung der Zellen, wurde analysiert, ob diese Zellen adipogen, osteogen und neuronal differenzieren können. Hierzu wurden die StemPro™ Adipogenesis, StemPro™ Osteogenesis und StemPro™ Neurogenesis Kits verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst in Kulturplatten ausgesät und mit den entsprechenden Kits behandelt.

Das Differenzierungspotenzial in adipogene Richtung nach der Neurosphärenbildung im Vergleich zu hBMSC wurde untersucht. Dazu wurden die Zellen in einer Zellzahl von 2×10^4 pro Well einer 24 Well Kulturplatte ausgesät und für 14 Tage in adipogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Anschließend erfolgte der quantitative Nachweis mittels Bodipy®493/503, welches intrazelluläre Lipide der differenzierten Zellen grün anfärbt. In Abbildung 9 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellen nach der adipogenen Differenzierung dargestellt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt.

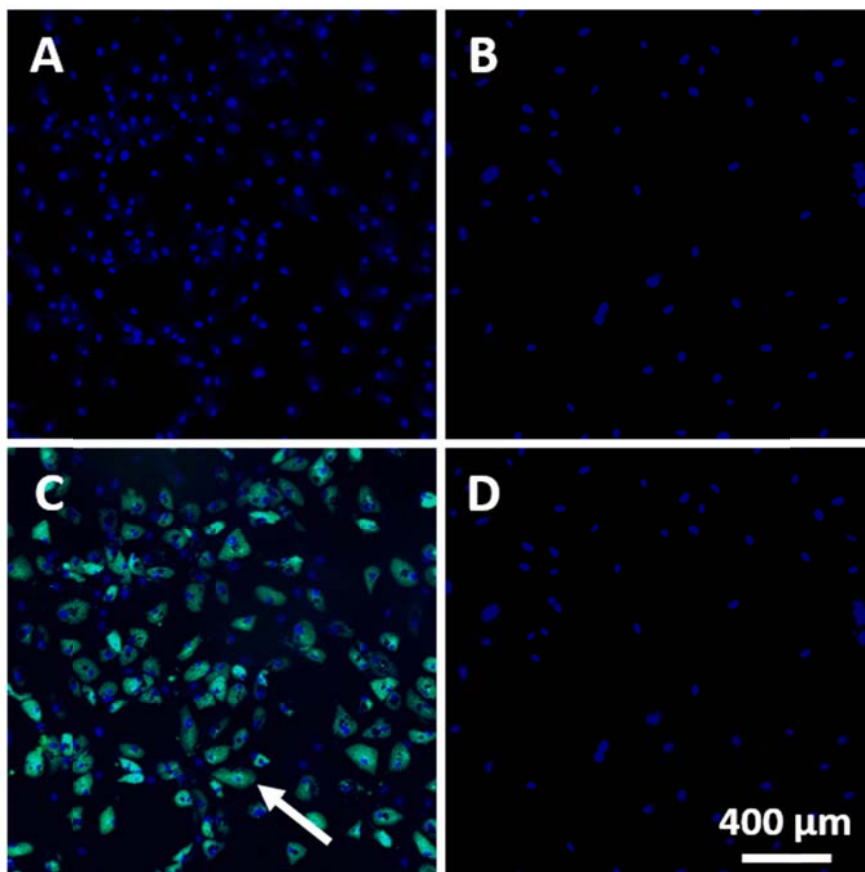


Abbildung 9: Analyse des adipogenen Differenzierungspotenzials der OSC nach der Neurosphärenbildung im Vergleich zu hBMSC. Es wurden 2×10^4 Zellen pro Well einer 24-Well Kulturschale ausgesät. Nach 48 h wurde ein Medienwechsel durchgeführt und adipogenes Differenzierungsmedium eingesetzt. Nach 14 Tagen wurde eine Bodipy®/ Hoechst 33342 Färbung durchgeführt. Als Negativkontrolle (A, B) wurden Zellen mit DMEM/F-12 Glutamax™ Supplement, 10% FCS behandelt. (C) zeigen die Ergebnisse der adipogenen Differenzierung von hBMSC. In (D) ist die adipogene Differenzierung von OSC nach der Bildung von Neurosphären dargestellt. Der weiße Pfeil zeigt eine differenzierte Zelle.

Wie in Abbildung 9 zu erkennen, zeigen die, mittels Neurosphären-Assay aufgereinigten OSC, nach der Inkubation in adipogenem Differenzierungsmedium keine Anzeichen für eine adipogene Differenzierung (Abb. 9A+B). Im Vergleich dazu zeigen hBMSC eine starke Bodipy Färbung, was für eine adipogene Differenzierung spricht (weißer Pfeil, Abb. 9C).

Das Differenzierungspotenzial der OSC in osteogene Richtung nach der Bildung von Neurosphären im Vergleich zu hBMSC als Positivkontrolle wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden 2×10^4 Zellen pro Well einer 24-Well-Kulturplatte ausgesät und im Anschluss für 21 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Anschließend wurde die Kalzifizierung der Zellen mit dem Farbstoff Alizarin Red S, der Calcium-Ablagerungen anzeigt, nachgewiesen. In Abbildung 10 sind die licht-mikroskopischen Aufnahmen der Zellen nach der osteogenen Differenzierung dargestellt.

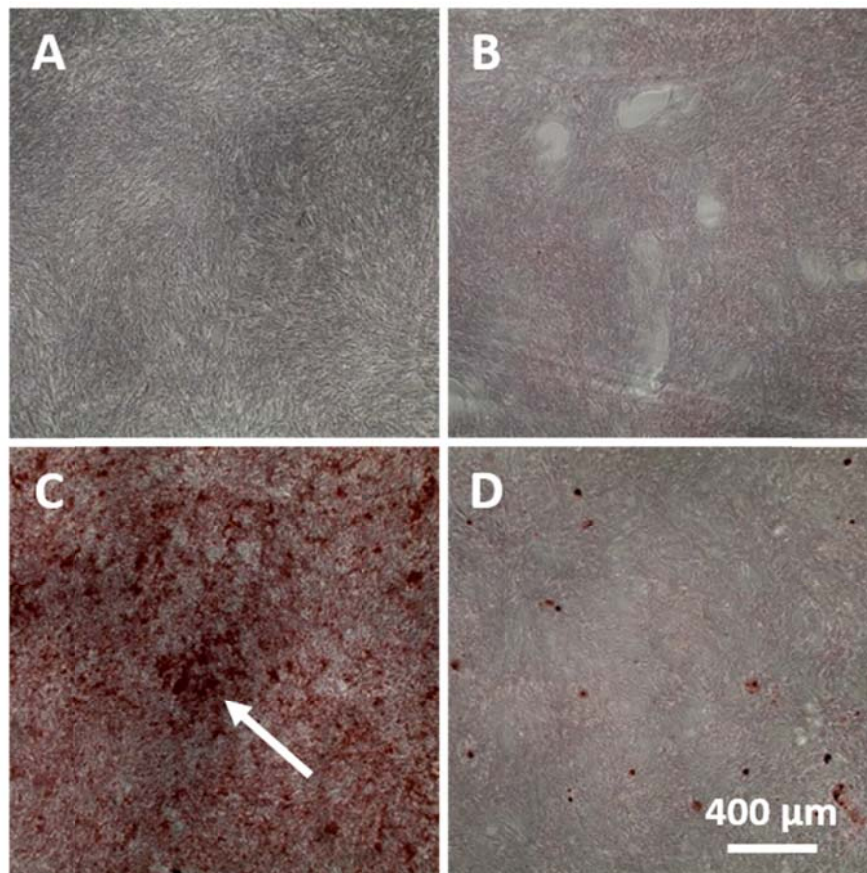


Abbildung 10: Analyse des osteogenen Differenzierungspotenzials von OSC nach der Neurosphärenbildung im Vergleich zu hBMSC. Es wurden 2×10^4 Zellen pro Well einer 24-Well Kulturschale ausgesät. Nach 72 h wurde ein Medienwechsel durchgeführt und osteogenes Differenzierungsmedium eingesetzt. Nach 21 Tagen wurde eine Alizarin Red S Färbung durchgeführt. Als Negativkontrolle (A, B) dienten Zellen in Zellkulturmedium (DMEM/F-12 GlutamaxTM Supplement, 10% FCS). Die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung von hBMSC (C) und von OSC nach der Neurosphärenbildung (D) sind dargestellt. Der weiße Pfeil zeigt kalzifizierte Zellen.

Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, zeigen die aufgereinigten OSC nach Inkubation in osteogenem Medium (Abb. 10D) ähnlich wie Zellen in reinem Zellkulturmedium (Abb. 10B) keine Kalzifizierung. Bei der Inkubation von hBMSC in osteogenem Differenzierungsmedium ist eine intensive Rotfärbung zu erkennen (weißer Pfeil, Abb. 10C), die für eine osteogene Differenzierung spricht (Abb. 10C) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in reinem Zellkulturmedium (Abb. 10A).

Das Differenzierungspotenzial in neuronale Richtung wurde nach der Neurosphärenbildung im Vergleich zu hBMSC ebenfalls untersucht. Dazu wurden die Zellen in einer Zellzahl von $1,5 \times 10^4$ pro Well einer 4-Well-Glaskammer ausgesät und für sieben Tage in neuronalem Differenzierungsmedium inkubiert, wobei alle drei Tage ein Medienwechsel erfolgte. Anschließend erfolgte die Analyse der Expression von β -III Tubulin als Marker für die neuronale Differenzierung, dabei werden Mikrotubuli neuronaler Zellen durch β -III Tubulin Antikörper spezifisch angefärbt. Eine Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 wurde ebenfalls durchgeführt. In Abbildung 11 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der neuronalen Differenzierung von OSC nach der Neurosphärenbildung dargestellt.

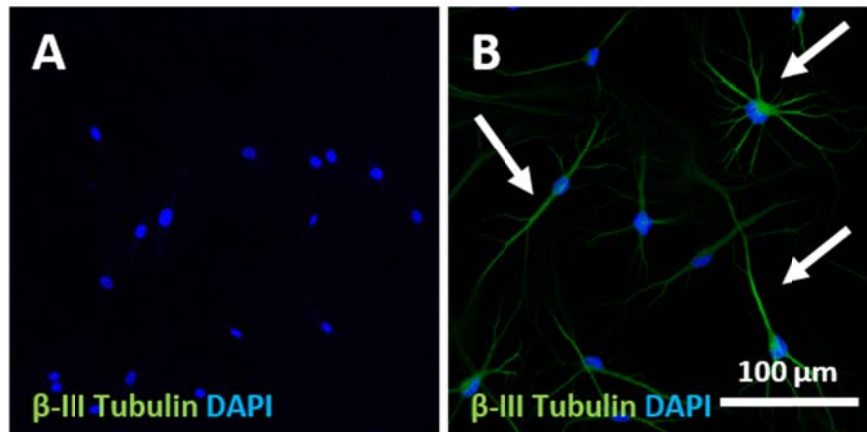


Abbildung 11: Analyse des neuronalen Differenzierungspotenzials von OSC nach der Neurosphärenbildung. Es wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well einer 4-Well-Glaskammer ausgesät und für sieben Tage in neuronalem Differenzierungsmedium inkubiert (B). Als Negativkontrolle wurden die Zellen in Zellkulturmedium inkubiert (A). Die weißen Pfeile zeigen β -III Tubulin positive Zellen.

In Abbildung 11 ist zu erkennen, dass die aufgereinigten OSC nach der Inkubation in neuronalem Differenzierungsmedium eine Neuronen-ähnliche Morphologie aufweisen und diese Zellen β -III Tubulin positiv sind (weiße Pfeile, Abb. 11B). Die Bildung von Zellfortsätzen und Dendriten-ähnlichen Strukturen konnte beobachtet werden. In reinem Zellkulturmedium zeigen diese Zellen keine Expression von β -III Tubulin (Abb. 11A).

4.2. Isolierung von OEC/ITSC aus der Lamina propria

Zur Isolierung von OEC (OM) und ITSC (RM) aus der Lamina propria, wurden verschiedene Isolierungsmethoden angewandt. Es wurden enzymatische (Trypsin bzw. Collagenase) und mechanische Isolierungsmethoden genutzt, sowie die Deckgläschenmethode und der MACS Dissociator. Folgende Abbildung 12 stellt die verschiedenen Isolierungsmethoden schematisch dar.

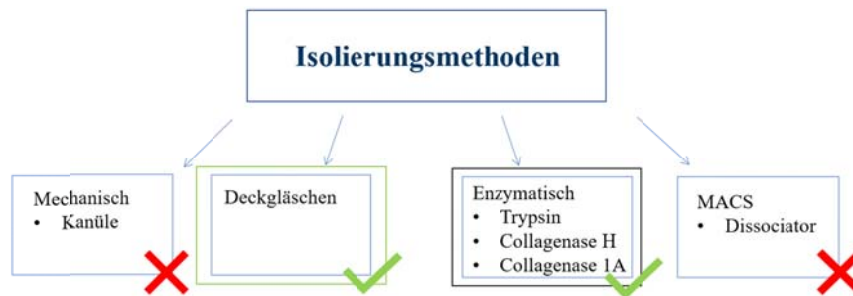


Abbildung 12: Schematische Darstellung der verwendeten Isolierungsmethoden zur Isolation von Zellen aus der Lamina propria. Die grünen Haken kennzeichnen die erfolgreichen Methoden, bei denen vitale Zellen isoliert und kultiviert werden konnten. Das rote X kennzeichnet die Methoden, bei denen keine vitalen Zellen isoliert wurden.

Wie Abbildung 12 zeigt, wurden 4 unterschiedliche Isolierungsverfahren untersucht: die mechanische Isolierung, die Deckgläschenmethode, die enzymatische Isolierung mit Trypsin bzw. Collagenase und die Isolierung mittels des MACS Dissociator.

Die mechanische Zerkleinerung mittels einer Kanüle nach Delorme et al., 2009, sowie die Isolierung mittels des MACS Dissociator, als auch die Isolierung mit Hilfe von Collagenase 1 A nach Hashemi et al., 2016 zeigten im Gegensatz zu den anderen Methoden keine adhärenenten, vitalen Zellen und sind somit als Isolierungsmethode nicht geeignet (siehe Abb. 4).

4.2.1 Isolierung mittels Deckgläschenmethode

Die Deckgläschenmethode nach Girard et al., 2011 zeigte nach ca. 9-14 Tagen aus den Gewebstücken ausgewachsene adhärenente, vitale Zellen, sowohl bei der OM als auch bei der RM. Die folgende Abbildung 13 zeigt repräsentative Aufnahmen der LP der OM unter einem Deckglas nach 3 Tagen (Abb. 13A), 9 Tagen (Abb. 13B) und 15 Tagen (Abb. 13C).

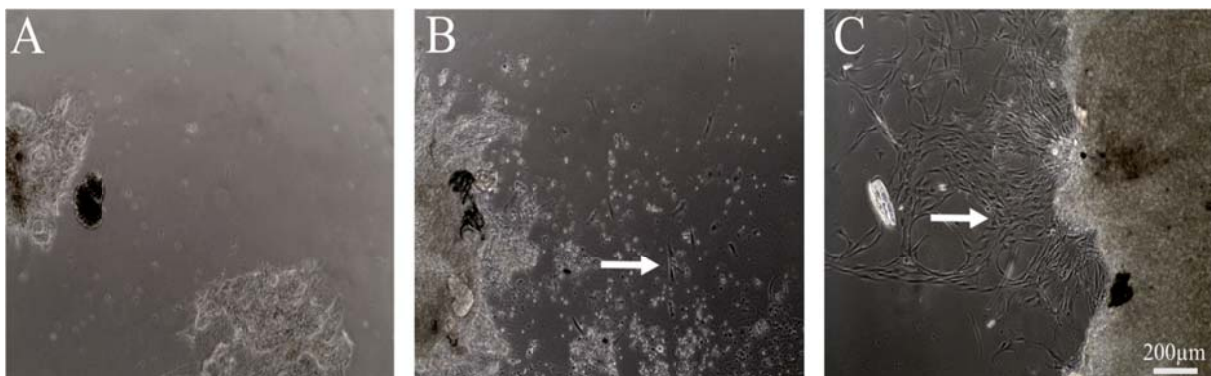


Abbildung 13: Auswachsene Zellen aus der LP der olfaktorischen Mukosa nach 3-15 Tagen in Kultur. Innerhalb der ersten 3 Tage nach der Isolierung zeigten sich keine auswachsenden Zellen (A). Erste vitale, adhärenente Zellen konnten nach 9 Tagen (B) beobachtet werden, die eine fibroblasten-ähnliche Morphologie (weiße Pfeile) aufwiesen und proliferierten (C).

Die Zellen, isoliert aus der LP der olfaktorischen und respiratorischen Mukosa, wiesen alle eine homogene fibroblasten-ähnliche Morphologie auf (Abb. 13B und C) und konnten nach ca. 20 Tagen auf 15cm² und anschließend auf 75cm² Zellkulturflaschen unter Zellkulturbedingungen expandiert werden.

4.2.2 Enzymatische Isolierungsmethoden

Bei der enzymatischen Isolierungsmethode (Collagenase H bzw. Trypsin) zeigten alle Biopsien der olfaktorischen Mukosa nach bereits ca. 3-7 Tagen adhärenente Zellen, welche alle eine fibroblasten-ähnliche Morphologie aufwiesen. Isolierte Zellen aus der respiratorischen Mukosa zeigten ebenfalls fibroblasten-ähnliche Zellen, als auch epitheliale Zellcluster mit typischer Morphologie eines Plattenepithels (Abb. 14). Abbildung 14 zeigt beispielhaft die fibroblasten-ähnlichen Zellen und die Zellcluster der respiratorischen Mukosa.

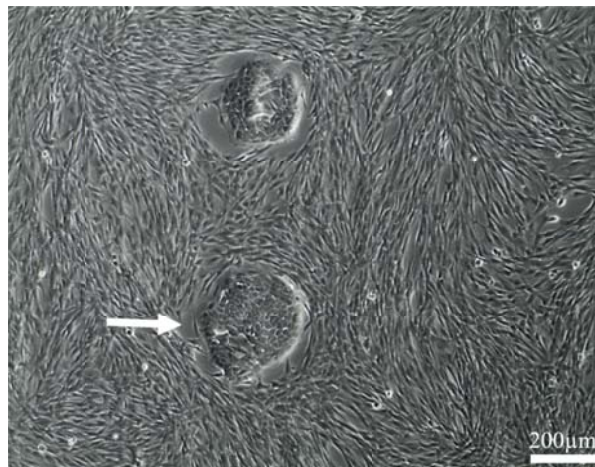


Abbildung 14: Humane respiratorische Zellen mit epithelialen Zellclustern (weißer Pfeil). Humane respiratorische Zellen nach ca. 10 Tagen in Zellkultur nach der Isolierung mit 0,01%Trypsin/0,05%EDTA.

Wie in Abbildung 14 zu erkennen, konnte mittels dieser enzymatischen Isolierungsmethode ein Zellgemisch aus langgestreckten fibroblasten-ähnlichen Zellen und epithel-ähnlichen Zellclustern isoliert werden. Diese epithelialen Zellcluster (Abb. 14, weißer Pfeil) verschwanden allerdings nach wenigen Tagen in Kultur. Somit wurden nach ca. 14 Tagen nur Zellen mit fibroblasten-ähnlicher Morphologie kultiviert und expandiert.

4.2.3 FACS-Phänotypisierung von OSC und ITSC aus der LP

Zur genauen Charakterisierung der isolierten olfaktorischen (OSC aus der OM) und respiratorischen Zellen (ITSC aus der RM) wurde die Durchflusszytometrie verwendet, wobei BhMSC aus dem Knochenmark als Kontrolle dienten.

Das Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmarker, welche unter anderem auch auf Stammzellen (CD90, CD105), auf Epithelzellen (Epcam), Stützzellen (Cytokeratin-18), oder auf olfaktorischen Ensheathing-Zellen (p75, O4) exprimiert werden, wurden analysiert.

Wie in Tabelle 2 zu erkennen, sind BhMSC positiv für die Stammzellmarker CD90 und CD105. Diese Ergebnisse konnte auch für die Zellen der OM und RM LP beobachtet werden. Der prozentuale Anteil dieser Zellen nahm mit steigender Passagenanzahl zu. Außerdem zeigte sich, dass in der Lamina propria der OM auch 12% p75 positive OEC zu erkennen sind, wobei in den anderen Zellfraktionen der Anteil unter 5% lag. Ähnliche Daten zeigten sich bei der Verteilung der Epithelzellen (Epcam positiv). Auch hier zeigten die Zellgemische direkt nach Isolierung Epcam positive Zellen bei der OM, als auch bei der RM,

wobei der prozentuale Anteil mit steigender Passagenanzahl unter 2 % sank. Der höchste Wert für p75 in der Lamina propria der olfaktorischen Zellen konnte dabei während der 0.-3.P ermittelt werden. Nach längerer Kultivierung, ab der 4. Passage, nahm der prozentuale Anteil dieser p75-positiven Zellen ab (unter 5%). Weder der neuronale Marker NCAM, noch der Schwanzzellmarker HNK-1 wurden auf den olfaktorischen oder respiratorischen Zellen exprimiert.

Tabelle 2: Zusammenfassung der ermittelten prozentualen Werte mit Standardabweichung der positiven Zellen der verschiedenen Gewebe in Abhängigkeit von der Passagenanzahl

| Oberflächenmarker | OM LP (0.-3.P) | OM LP (4.-6.P) | RM LP (0.-3.P) | RM LP (4.-6.P) | BhMSC |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------|
| CD90 | 79,1%±10 | 99,5%±1,6 | 61% ± 30 | 98,9%±1,4 | 98,5%±2 |
| CD105 | 99% ± 0,5 | 98,1% | 86,4% | 89% | 95%± 2,9 |
| Epcam | 46,1%± 34 | 1,5%±0,5 | 23,6%± 23 | 1,3% ± 3,5 | 0% |
| Cytokeratin-18 | | | | | 2% ± 2,1 |
| Cytokeratin-14 | 29,2% | | | | 23% |
| p75 | 12%± 11,6 | 3%±2,1 | 4% ± 3,1 | 3,1% ± 2,1 | 4%± 2,8 |
| NCAM | 0,1% | | 0,1% | | 0,1% |
| HNK-1 | 0,1% | | 0,2% | | 0,3% |

4.2.4 Proliferationsverhalten

Zur Bereitstellung ausreichender Zellzahlen für einen möglichen klinischen Einsatz, ist eine Zellvermehrung wünschenswert. Deshalb wurde die Proliferationsrate der isolierten Zellen mittels AlamarBlue und BCA Assay analysiert. Dazu wurde der prozentuale Anteil von FCS variiert (0, 0,2, 10% FCS), als auch die Anwesenheit von Proliferationsstimuli wie G5, NT3 für OEC sowie B27 für ITSC getestet. Die ermittelten Werte sind in Abbildung 15 dargestellt.

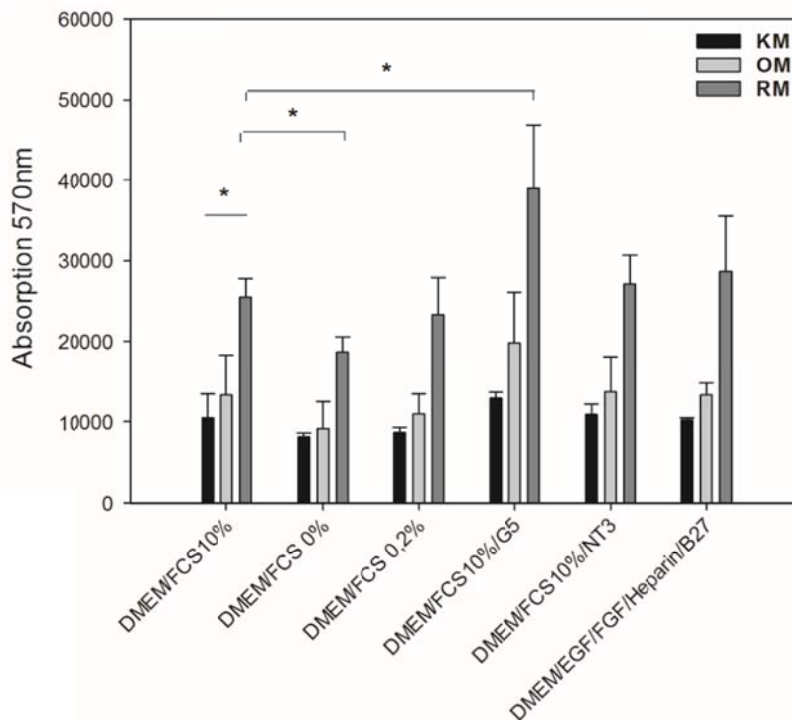


Abbildung 15: Gemessene Umsetzung des AlamarBlue Indikators für olfaktorische, respiratorische Zellen und BhMSC. BhMSC stellen hMSC des Knochenmarks dar, OM die Zellen aus der Lamina propria der olfaktorischen Mukosa und RM die isolierten Zellen aus der LP Schicht der respiratorischen Mukosa. Als Fehlerindikator ist die Standardabweichung angegeben. Statistik: One Way ANOVA und paarweiser Vergleich T-Test. Signifikante Unterschiede mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$), $n=4$.

Wie Abbildung 15 zeigt, proliferieren respiratorische Zellen im normalen Zellkulturmedium mit 10% FCS signifikant schneller als die BhMSC und die olfaktorischen Zellen. Die Zellen der RM zeigen zusätzlich eine signifikante Proliferationssteigerung bei Zugabe von G5 im Vergleich zum normalen Zellkulturmedium. Die Umsetzung ohne FCS zeigt hingegen eine Abnahme der Zellteilung. Die olfaktorischen Zellen zeigen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den BhMSC, die Zugabe von G5 zeigte jedoch eine proliferationssteigernde Tendenz.

Zusätzlich wurde die Proliferation mit Hilfe des BCA Assays ermittelt, welcher den Gesamtproteingehalt der Zellen in den verschiedenen Medien misst. In der folgenden Abbildung 16 sind die ermittelten Gesamtproteinkonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$) der olfaktorischen und respiratorischen Mukosa im Vergleich zu den BhMSC dargestellt.

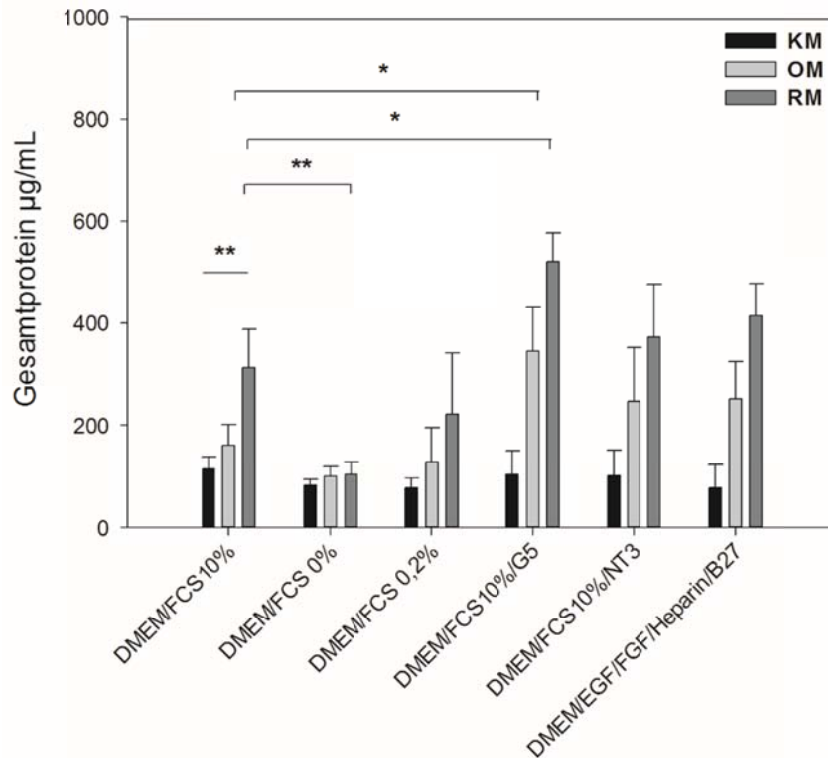


Abbildung 16: Gesamtproteingehalt der olfaktorischen, respiratorischen Zellen und BhMSC. BhMSC stellen hMSC des Knochenmarks dar, OM die Zellen aus der Lamina propria der olfaktorischen Mukosa und RM die isolierten Zellen aus der LP Schicht der respiratorischen Mukosa. Als Fehlerindikator ist die Standardabweichung angegeben. Statistik: One Way ANOVA und paarweiser Vergleich T-Test. Signifikante Unterschiede mit * gekennzeichnet (*: $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$), $n=4$.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, zeigen die Ergebnisse des BCA Assays, ähnlich wie der AlamarBlue Assay, einen signifikant höheren Gesamtproteingehalt der respiratorischen Zellen im normalen Zellkulturmedium, im Vergleich zu den olfaktorischen Zellen und den BhMSC. Wie auch beim AlamarBlue Assay ist die Proliferation der RM bei Zugabe von G5 signifikant gesteigert und zusätzlich zeigt sich hier auch eine Proliferationssteigerung der OM. Ohne zugesetzte Proteine ist eine signifikante Inhibition der Proliferation bei den Zellen der respiratorischen Mukosa zu beobachten.

4.2.5 Nachweis von Mucus-produzierenden Zellen

Nach erfolgreicher Isolierung der Zellen aus der LP der OM erfolgte die Charakterisierung mittels CLSM direkt nach der Isolierung sowie nach 21 Tagen Kultur. Dafür wurde die Expression von CD90, EpCAM und MUC5AC analysiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 17 dargestellt.

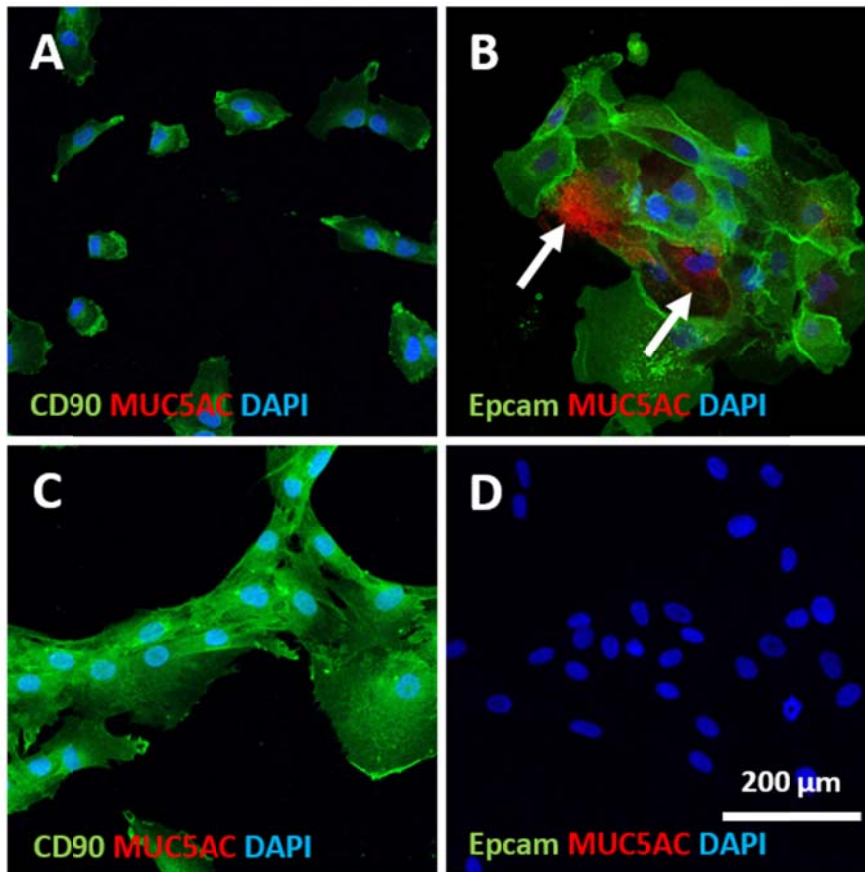


Abbildung 17: Repräsentative CLSM-Aufnahmen frisch isolierter Zellen aus der LP der OM (A, B) und Zellen nach Kultivierung und Passagieren (1.P) (C, D). Die frisch isolierten Zellen der LP der OM wurden direkt nach der Isolierung in 4-Well-Glaskammern ausgesät und für fünf Tage kultiviert. Des Weiteren wurden die für 21 Tage kultivierten Zellen nach der ersten Passage auf 4-Well-Glaskammern ausgesät und charakterisiert. (A) und (C) zeigen den Nachweis von CD90 (grün) und MUC5AC (rot). (B) und (D) zeigen den Nachweis von Epcam (grün) und MUC5AC (rot). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Die Pfeile zeigen Mucus-produzierende Zellen.

Wie in Abbildung 17 zu erkennen, zeigen frisch isolierte Zellen aus der LP der OM sowohl CD90-positive (Abb. 17A), Epcam-positiv Zellen (Abb. 17B) als auch wenige MUC5AC positive Zellen (weiße Pfeile, Abb. 17B). Neben den frisch isolierten Zellen wurden die isolierten Zellen nach einer Kultivierungszeit von mehr als 21 Tagen ebenfalls untersucht, um die Reinheit nach der Passage und dem verbundenen Einsatz von Trypsin zu kontrollieren. Es zeigt sich, dass die Zellen der LP der OM nach Kultivierung CD90-positiv sind (Abb. 17C). EpCAM- und MUC5AC-positive Zellen konnten nicht mehr gefunden werden (Abb. 17C+D).

4.2.6 Aufreinigung von olfaktorischen Ensheathing Zellen mittels MACS-Microbeads

Um OEC aus der isolierten LP OM Zellfraktion, wie unter 4.2.2 beschrieben, zu gewinnen, wurden diese Zellen mithilfe von p75NTR-gekoppelten Microbeads immunomagnetisch aufgereinigt. In Abbildung 18 sind lichtmikroskopische Aufnahmen vor und nach der der Aufreinigung mittels p75NTR-Microbeads der OEC-Fraktion dargestellt.

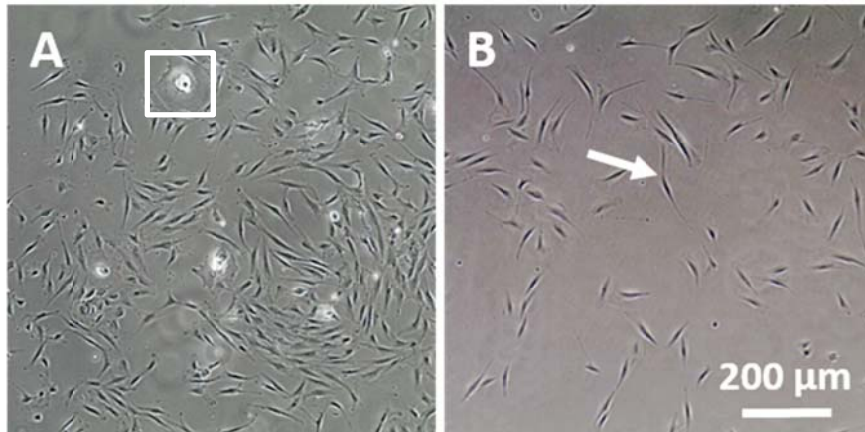


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von OEC-Fractionen vor (A) und nach der immunomagnetischen Aufreinigung mittels p75NTR-Microbeads (B). Die Zellen wurden nach der Aufreinigung mit p75NTR-Microbeads in einer 24-Well-Kulturschale in DMEM/F-12 GlutamaxTM Supplement, 1x G5 kultiviert. Der Pfeil zeigt eine ausgewählte Zelle mit einer lang-gestreckten Morphologie. Der Kasten zeigt einen epithelialen Zellcluster.

Abbildung 18 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen vor und nach der Aufreinigung von OEC-Fractionen aus der LP der OM. Wie in Abb. 18A zu erkennen, zeigt die Zellfraktion vor der immunomagnetischen Zellseparation Fibroblasten-ähnliche, adhärenente Zellen und wenige epitheliale Zellcluster (weißer Kasten, Abb. 18A). Nach der Separation der OEC mittels p75NTR-Microbeads sind nur adhärenente, Fibroblasten-ähnliche Zellen mit einer lang-gestreckten Morphologie zu erkennen (weißer Pfeil, Abb. 18B).

4.2.7 Charakterisierung der aufgereinigten olfaktorischen Ensheathing Zell-Fractionen

Um die Identität und Reinheit der aufgereinigten OEC-Fractionen zu bestimmen, wurden die Zellen anschließend durchflusszytometrisch charakterisiert. Zur Analyse der OEC-Fractionen wurde zum einen die Expression des typischen Stammzellmarkers CD90 und zum anderen die Expression des typischen OEC-Markers p75^{NTR} untersucht. In Abbildung 19 sind exemplarisch durchflusszytometrische Histogramme der Expression von CD90 und p75^{NTR} vor und nach der immunomagnetischen Aufreinigung dargestellt.

Abbildung 19 zeigt exemplarische durchflusszytometrische Histogramme einer OEC-Fraktion vor (Abb. 19A+C) und nach (Abb. 19B+D) der immunomagnetischen Aufreinigung. Es zeigt sich deutlich, dass durch die immunomagnetische Aufreinigung der OEC-Fractionen durch p75^{NTR}-gekoppelten Microbeads die p75^{NTR}-positiven OEC aufgereinigt und angereichert werden konnten. Zwar zeigen die Analysen keine reine OEC-Fraktion, aber der Anteil der CD90-positiven Zellen wurde sichtbar verringert. Abbildung 20 zeigt die quantitative Auswertung nach der immunomagnetischen Zellseparation.

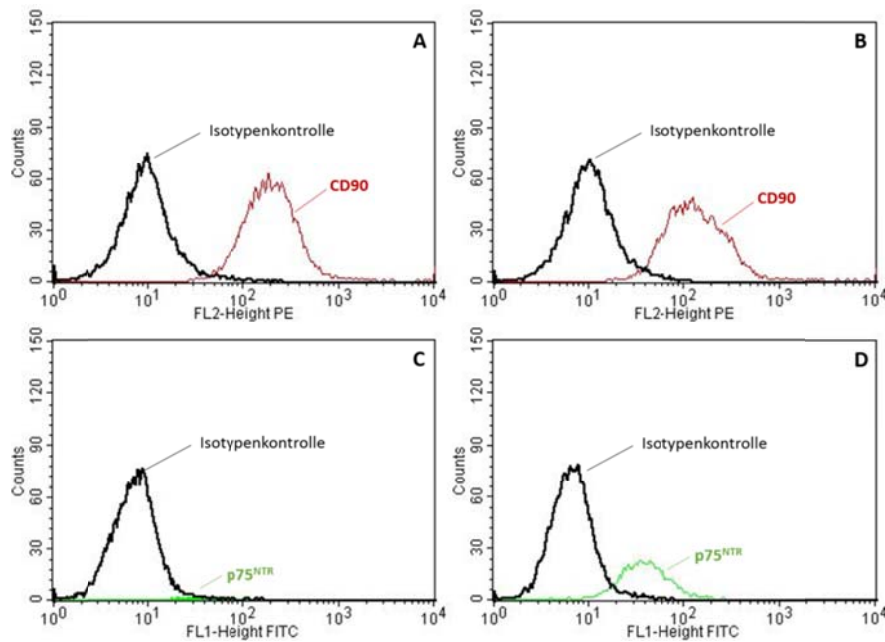


Abbildung 19: Exemplarische durchflusszytometrische Histogramme einer OEC-Fraktion vor (A, C) und nach (B, D) der immunmagnetischen Aufreinigung mit $p75^{NTR}$ -Antikörpern. Die Zellen wurden vor der Messung mit Antikörpern gegen CD90 (A, B) und $p75^{NTR}$ (C, D) behandelt. Der CD90 Antikörper war PE konjugiert, der $p75^{NTR}$ FITC. Die Isotypenkontrollen sind in schwarz aufgetragen. Die rote Kurve repräsentiert CD90-positive Zellen und die grüne Kurve $p75^{NTR}$ -positive Zellen.

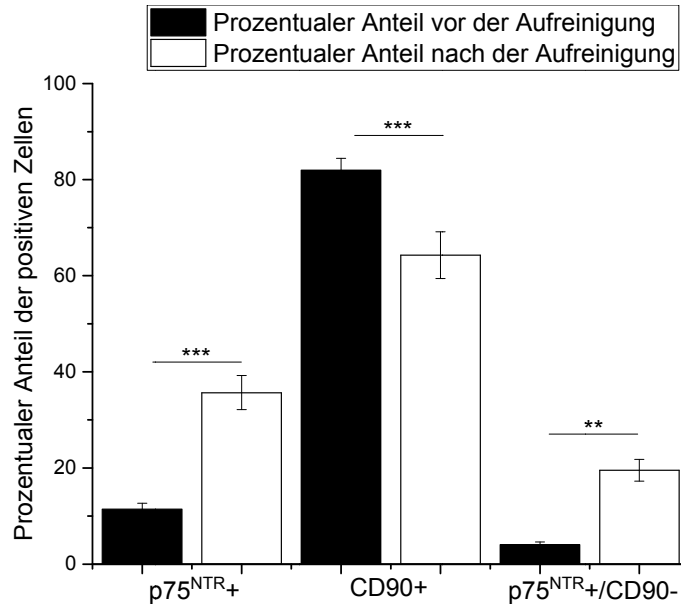


Abbildung 20: Statistische Verteilung der durchflusszytometrischen Analysen der einzelnen Zellpopulationen im Zuge der Isolierung von OECs vor und nach der immunmagnetischen Aufreinigung. Die Signifikanzen sind als $p > 0,01$ mit (**) und $p > 0,001$ mit (***) angegeben.

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass der Anteil von $p75^{NTR}$ -positiven Zellen durch die immunmagnetische Aufreinigung von ca. 10 auf 35,6 % anstieg. Durch die Aufreinigung konnte gleichzeitig der Anteil von CD90-positiven Zellen auf 64,2 % gesenkt werden. Da

OEC positiv für p75^{NTR} aber negativ für CD90 sind, wurde zusätzlich das Verhältnis von p75^{NTR}-positiven zu CD90-negativen Zellen dargestellt. Durch die immunomagnetische Aufreinigung konnten die OEC auf ca. 20 % angereichert werden.

4.2.8 Immunhistochemische Charakterisierung der OEC-Fraktionen

Zur weiteren Charakterisierung der aufgereinigten OEC-Fraktionen wurden zusätzlich immunhistochemische Aufnahmen der Zellen angefertigt. Die Expression von p75^{NTR} wurde dafür fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Zellkerne wurden mit dem Hoechst 33342 angefärbt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sind in

Abbildung 21 dargestellt.

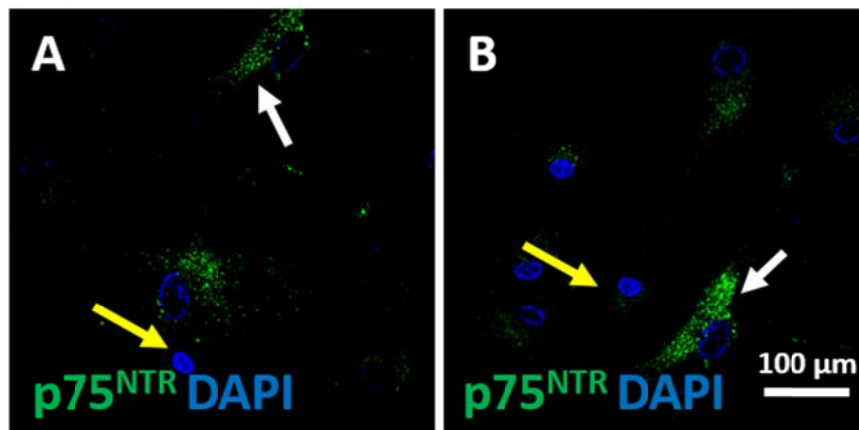


Abbildung 21: CLSM-Aufnahmen von zwei verschiedenen OEC-Fraktionen nach der immunomagnetischen Isolierung mit p75^{NTR} Microbeads. Die Zellen wurden direkt nach der Aufreinigung auf 4-Well-Kulturkammern ausgesät und nach 24 h mit p75^{NTR} (AF 488) Antikörper behandelt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 angefärbt. Die weißen Pfeile zeigen p75^{NTR}-positive Zellen, die gelben Pfeile solche die negativ für p75^{NTR} sind.

Wie in

Abbildung 21 zu sehen ist, zeigen zwei verschiedene aufgereinigte OEC-Fraktionen, ähnlich wie die durchflusszytometrischen Analysen, p75^{NTR}-positive Zellen (weiße Pfeile Abb. 21A+B). Jedoch sind auch Zellen zu erkennen, die p75^{NTR} gar nicht oder nur sehr schwach exprimieren (gelbe Pfeile Abb. 21A+B).

4.2.9 Einfluss von Bovinem Pituitary Extrakt und Forskolin auf die Kultivierung von olfaktorischen Ensheathing Zellen

Um die Ausbeute der OEC-Fraktionen zu erhöhen wurde zusätzlich die Kultivierung der frisch isolierten Zellen aus der OM LP in Anwesenheit der Stimulanzen Bovine Pituitary Extrakt und Forskolin untersucht. Dafür wurden die Zellen wie unter 3.2.2 beschrieben isoliert und anstatt wie bisher in DMEM/F-12 GlutamaxTM Supplement, 10 % FCS, 1xAAS in DMEM/F-12 GlutamaxTM Supplement, 1xAAS mit den Stimulanzen Bovine Pituitary Extrakt und Forskolin kultiviert. Wie Lim et al. beschreiben, soll dies die Ausbeute von p75^{NTR}-positiven Zellen deutlich erhöhen. Die Zellfraktion wurde nach Kultivierung von 21 Tagen mit den Stimulanzen Bovine Pituitary Extrakt und Forskolin durchflusszytometrisch

charakterisiert. Repräsentative durchflusszytometrische Histogramme sind in Abbildung 22 dargestellt.

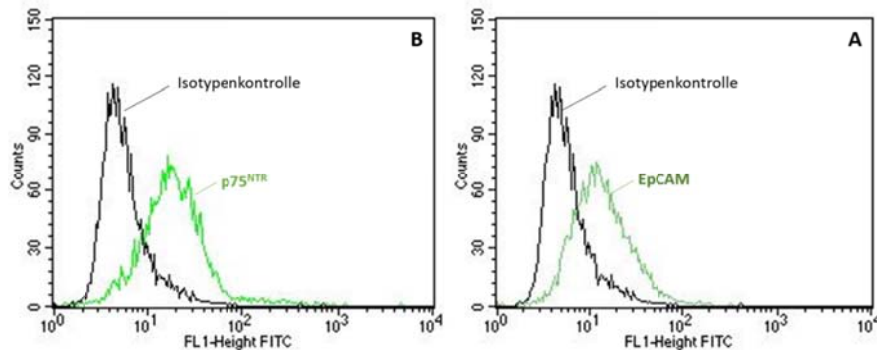


Abbildung 22: Histogramm einer Zellfraktion aus der OM LP, die in DMEM/F-12, 1xG5, 20 µg/ml Pituitary Extrakt, 2 mM Forskolin für 21 Tage kultiviert wurden. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen p75^{NTR} (FITC) (A) und Epcam (FITC) (B) markiert. In schwarz ist die Isotypenkontrolle dargestellt, die Signale von EpCAM und p75^{NTR} sind in grün aufgetragen.

Nach der Kultivierung der Zellfraktion in Stimulantien Bovine Pituitary Extrakt und Forskolin kann deutlich eine erhöhte p75^{NTR} Expression (Abb. 22A) und zudem eine Expression von EpCAM beobachtet (Abb. 22B). Es ist zu erkennen, dass auch Epcam exprimiert wird.

4.2.10 Phagozytose Eigenschaften von aufgereinigten OEC-Fraktionen

Eine besondere Eigenschaft der OEC ist die Phagozytose degenerierter Zellen, welche ein wichtiger Mechanismus im Rahmen der axonalen Regeneration ist. Diese phagozytische Eigenschaft der aufgereinigten OEC-Fraktionen wurde im Folgenden mit fluoreszenz-markierten avitalen *E.coli* untersucht. Die intrazellulären Lysosomen wurden für eine intrazelluläre Identifikation mit LysoTracker® Red S DND-99 angefärbt. LysoTracker® Red S DND-99 wird durch die Ansäuerung im Lysosomen angeregt, bei einer Wellenlänge von 590 nm zu fluoreszieren. Um das System zu testen wurden zunächst Voruntersuchungen mit PMN und BhMSC durchgeführt. PMN sind als professionelle Phagozyten in der Lage, Keime und Zellpartikel aufzunehmen. PMN wurden aus humanem EDTA-Vollblut isoliert. BhMSC sind keine typischen Phagozyten und dienen als Negativkontrolle. In Abbildung 23 sind entsprechende licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen dargestellt.

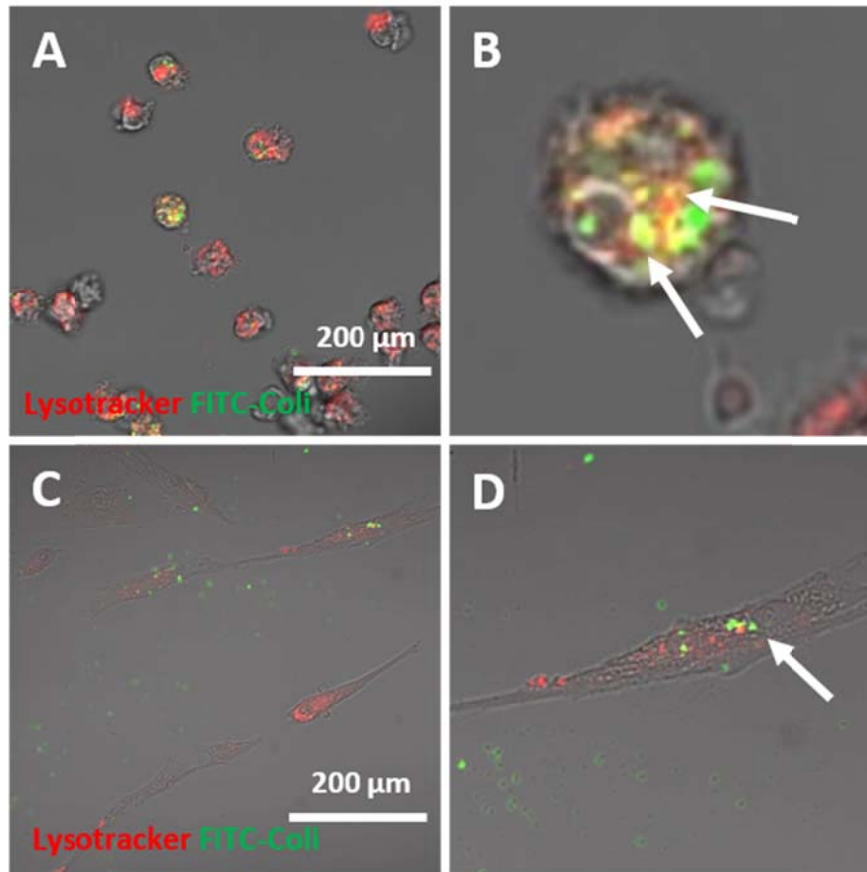


Abbildung 23: Phagozytoseeigenschaften von PMN und BhMSC. Als Kontrollen wurden 3×10^5 Granulozyten aus Citrat-Vollblut (A, B) und $1,5 \times 10^4$ hBMSC (C, D) in 4-Well-Glaskammern kultiviert. Nach 24 h wurden 1×10^6 Fluoreszenzmarkierte avitale *E. Coli* Partikel zugegeben und nach 24 h wurden die Zellen gewaschen und mit Lysotracker® Red DND-99 gefärbt. (B) und (D) zeigen eine digitale Vergrößerung von ausgesuchten Zellen. Die Pfeile zeigen gefärbte Lysosomen.

Abbildung 23 zeigt licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PMN als Positivkontrolle (Abb. 23A+B) und BhMSC als Negativkontrolle (Abb. 23C+D) nach Inkubation mit FITC-markierten avitalen *E. Coli* Biopartikeln und Färbung der Lysosomen. Es ist deutlich zu erkennen, dass Granulozyten (Abb. 23A+B) im Gegensatz zu BhMSC (Abb. 23C+D) FITC-markierte *E. Coli* Biopartikel phagozytieren (weiße Pfeile Abb. 23B+D). Zudem ist erkennbar, dass bei BhMSC weder intrazelluläre FITC markierte avitale *E. Coli* Biopartikel im Zelllumen noch in den Lysosomen aufweisen (Abb. 23D).

Nach dieser vorangegangenen Analyse von Kontrollzellen erfolgte anschließend die Untersuchung der Phagozytose-eigenschaften der aufgereinigten OEC-Fraktionen. Dafür wurden immunomagnetisch aufgereinigte OEC-Fraktionen ebenfalls über Nacht in einer 4-Well-Glaskammern kultiviert und am nächsten Tag mit 1×10^6 FITC-markierten avitalen *E. Coli* Biopartikeln für 24h inkubiert und anschließend die Lysosomen-angefärbt. Die Ergebnisse der Phagozytoseeigenschaften einer immunomagnetisch aufgereinigten OEC-Fraktion sind in Abbildung 24 dargestellt.

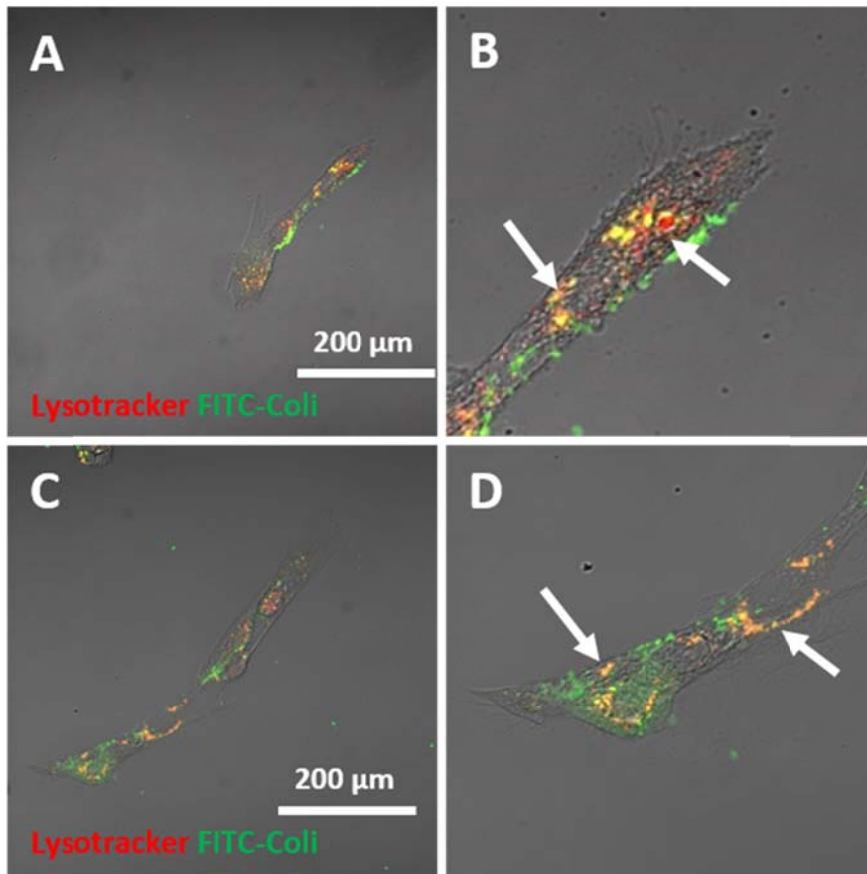


Abbildung 24: Analyse der Phagozytoseeigenschaften einer aufgereinigten OEC-Fraktion. Dazu wurde eine OEC-Fraktion zunächst (A, C) nach der immunomagnetischen Aufreinigung in 4-Well-Glaskammern über Nacht kultiviert und nach 24 h wurden 1×10^6 FITC-markierte avitale E.-Coli Biopartikel hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 24 h erfolgte die Lysotracker® Red DND-99Färbung. (B) und (D) zeigen digitale Vergrößerungen von Zellen, welche phagozytierte FITC-E. Coli aufzeigen. Die Pfeile zeigen phagozytierte Partikel im Lysosom.

Abbildung 24 zeigt deutlich Zellen, die FITC-markierte avitale E. Coli Biopartikel phagozytiert haben (weiße Pfeile Abb. 24A+C). Die Partikel sind nach 24 h vornehmlich in den Lysosomen zu finden.

Bei genauer Betrachtung fiel zudem auf, dass ein Großteil der Zellen keine intrazellulären Partikel aufwies. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

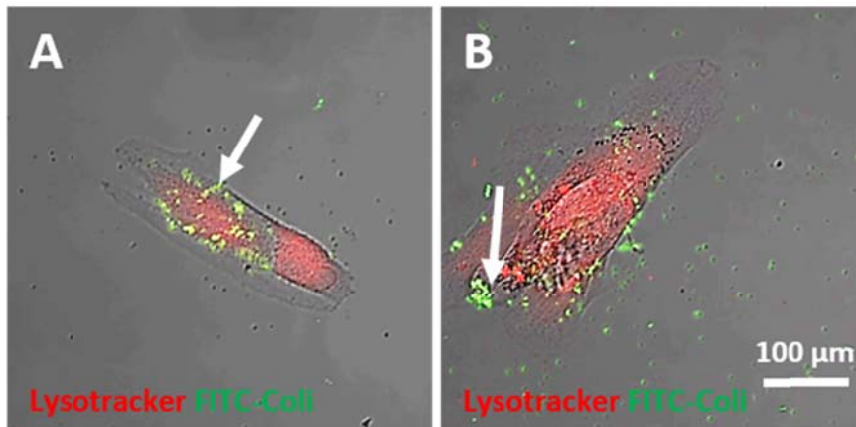


Abbildung 25: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen, die keine Partikel aufgenommen haben. Die Zellen wurden in 4-Well-Glaskammern über Nacht kultiviert. Nach 24 h wurden 1×10^6 Fluoreszenzmarkierte *E.-Coli* Biopartikel zugegeben. Nach 24 h wurden die Zellen gewaschen und mit Lysotracker™ Red DND-99 behandelt. Die Pfeile zeigen Keime, die zwar an der Zelle, aber nicht intrazellulär zu beobachten waren.

Wie in Abbildung 25 zu erkennen, wiesen viele Zellen keine intrazellulären *E.coli* auf, sondern diese Keime waren vornehmlich auf der Oberfläche, aber nicht co-lokalisiert mit den Lysosomen zu finden (weiße Pfeile Abb. 25A+B).

4.2.11 Sekretion neurotropher Faktoren der aufgereinigten OEC-Fraktionen

Ein wichtiger Aspekt beim Einsatz isolierter und expandierter Zellen ist deren Funktionalität. OEC sind dafür bekannt, verschiedene parakrine Faktoren zu sekretieren. Zur Detektion der sezernierten Faktoren im Zellkulturüberstand von immunomagnetisch aufgereinigten OEC-Fraktionen wurde der Human Growth Factor Antibody Array (Abcam) durchgeführt. Die Verwendung des Arrays zeigte eine sehr gute Auflösung und Visualisierung der Spots und hatte eine Detektionskapazität von 40 Proteinen. Repräsentative Proteinexpressionsmuster des reinen Kultivierungsmedium (DMEM/ F-12 Glutamax™ Supplement, 1x G5) und der Überstände aus kultivierten immunomagnetisch aufgereinigten OEC-Fraktionen sind in Abbildung 26 dargestellt.

Wie in Abbildung 26 zu erkennen ist, sezernieren die aufgereinigten OEC-Fraktionen Proteine, wie z.B. IGFBP-2 (*engl.: insulin-like growth factor binding protein-2*) (rote Markierung, Abb. 26B) und IGFBP-6 (*engl.: insulin-like growth factor binding protein-6*) (grüne Markierung, Abb. 26B). EGF und bFGF sind in dem Zellkultursupplement G5 enthalten und werden nicht berücksichtigt (blaue Markierungen, Abb. 26A+B).

Die Intensität der gemessenen Chemilumineszenz wurde mittels des Amersham™ Imager 600 in Graustufen sichtbar gemacht. Die semiquantitative Auswertung der Graustufen erfolgte am Computer mittels der Software ImageQuant XL. Dabei wurden die einzelnen Spots auf der Membran zu den Referenzspots der gleichen Membran normalisiert und anschließend als Verhältnis in Bezug zu den gleichen Spots einer Kontrolle eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

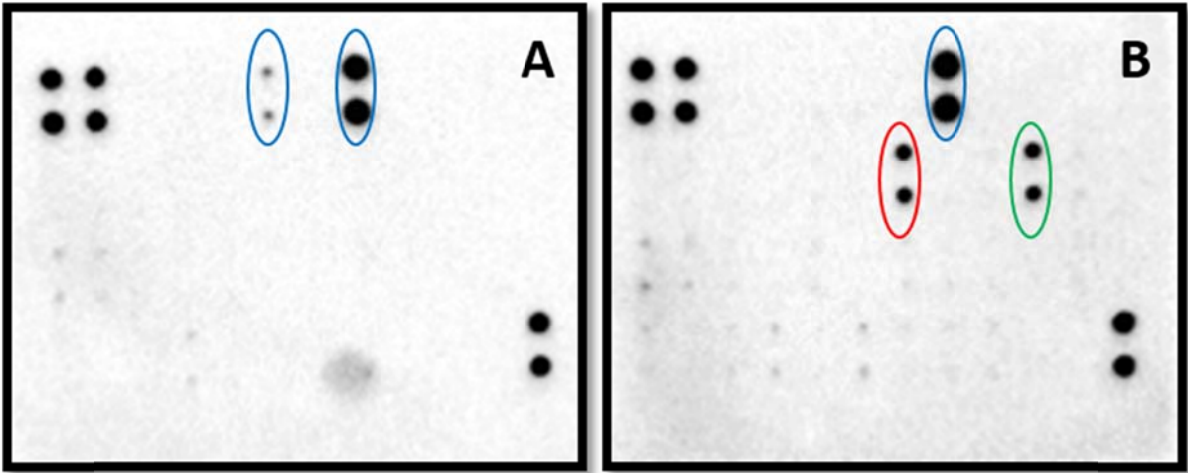


Abbildung 26: Lumineszenz-Detektion des Human Growth Factor Antibody Arrays. Dargestellt ist die Analyse von DMEM/ F-12 GlutamaxTM, 1x G5 (A) und exemplarisch der Überstand einer OEC-Fraktion (B). Die Expression von IGFBP-2 ist rot und von IGFBP-6 grün markiert. EGF und bFGF sind blau markiert.

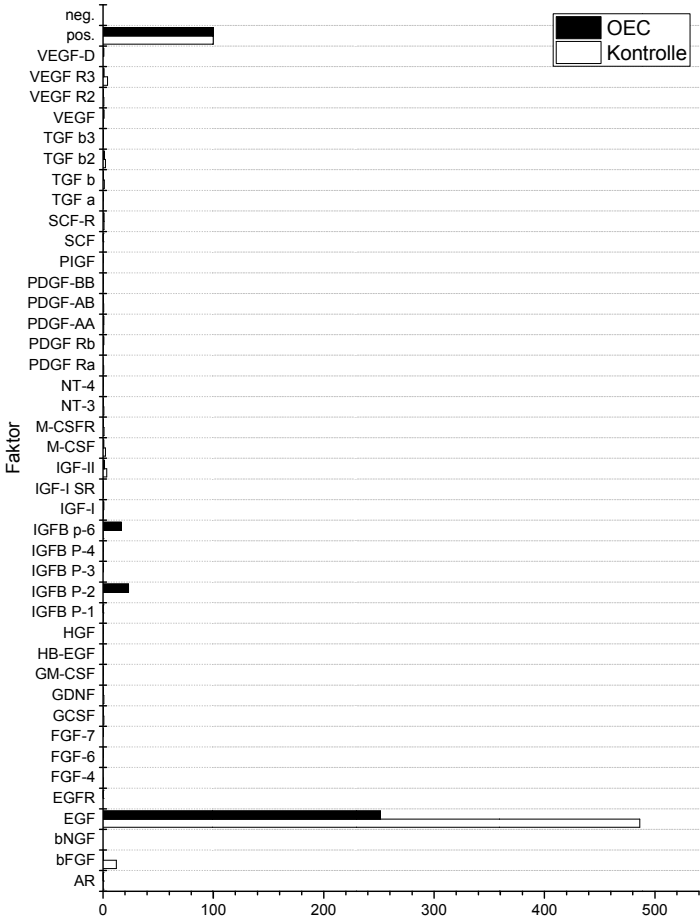


Abbildung 27: Ergebnisse des Human Growth Factor Antibody Array. Es wurden die Überstände von zwei OEC-Fractionen untersucht. Als Kontrolle diente DMEM/F-12 GlutamaxTM, 1x G5. Die Grauwerte der Membranen wurden mit dem Programm ImageQuant XL als Pixeldichte ausgewertet. Die Positivkontrollen der Membran wurden dann als 100 % gesetzt.

Die Proteinexpressionsdaten von OEC-Fractionen im Vergleich zu reinem Zellkulturmedium sind in Abbildung 27 dargestellt. Es fällt auf, dass bFGF nur in der Kontrolle nachweisbar war. In Überständen der immunomagnetisch aufgereinigten OEC-Fractionen ist eine verstärkte Sekretion von IGFBP-2 und IGFBP-6 im Vergleich zu reinem Zellkulturmedium zu erkennen.

4.2.12 Einfluss löslicher Faktoren der OEC-Fractionen auf neuronale Stammzellen

Vorangegangene Studien mit OEC zeigten, dass diese neurotrophe Faktoren wie NGF, BDNF und NT-4/5 sekretieren, welche die Proliferation und Migration von neuronalen Stammzellen beeinflussen können. Der mögliche Einfluss dieser sekretierten Faktoren wurde im Folgenden auf H9-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Überstände der immunomagnetisch aufgereinigten und kultivierten OEC-Fractionen gesammelt, zentrifugiert um Zelldebris zu entfernen und bei -70°C bis zum Versuch gelagert. Die Überstände wurden dann auf H9-Zellen gegeben und es erfolgte eine Kultivierung der Zellen in den konditionierten Überständen für fünf Tage. In Abbildung 28 sind die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der vitalen H9-Zellen nach Inkubation mit Überständen der OEC-Fractionen nach fünf Tagen dargestellt. Wie erkennbar, sind die H9-Zellen in Anwesenheit der OEC Überstände vital. Die inkubierten H9-Zellen (Abb. 28B) zeigen im Vergleich zu Zellen in reinem H9-Zellkulturmedium (Abb. 28A) eine langgestreckte Morphologie und ausgebildete und verzweigte Zellfortsätze (weiße Pfeile, Abb. 28B). Zudem konnte eine geringere Proliferationsrate der Zellen im Vergleich zu reinem H9-Zellkulturmedium beobachtet werden.

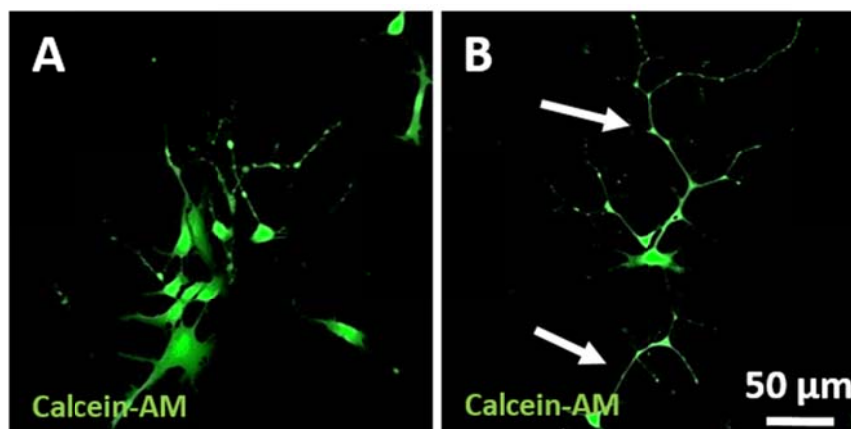


Abbildung 28: Calcein-AM Färbung von H9-Zellen nach Inkubation mit löslichen Faktoren einer OEC-Fraktion im Vergleich zureinem H9-Zellkulturmedium. Es wurden 3×10^4 Zellen pro Well einer 24-Well-Kulturschale ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel. Die Zellen wurden in H9-Zellkulturmedium (A) und in Überständen von immunomagnetisch aufgereinigten OEC-Fractionen (B) inkubiert. Nach 5 div erfolgte eine Calcein-AM Färbung. Die Pfeile zeigen lang-gestreckte Zellfortsätze.

4.2.12 Verhalten von olfaktorischen Zellen in einer autologen Plasma-Clot-Matrix

Ein autologer Plasma-Clot könnte eine geeignete Transfermatrix von OEC und OSC bei möglichen Transplantationen sein, weil von Seiten der Trägersubstanz ausschließlich autologes Material eingesetzt wird und allogene oder xenogene Zusätze wie bei kommerziellen Fibrinmatrices oder biodegradierbaren Trägersubstanzen nicht nötig sind. Zusätzlich enthält der Plasma-Clot Wachstumsfaktoren, welche sich positiv auf die

Zellviabilität und -proliferation auswirken. Das Verhalten von olfaktorischen Zellen in einer Plasma-Clot-Matrix wurde untersucht.

4.2.12.1 Zellviabilität und -orientierung in der Plasma-Clot-Matrix

Für den Nachweis der Zellviabilität und zur Beurteilung der Zellverteilung und der räumlichen Anordnung innerhalb der Zellträgermatrix wurden die immunomagnetisch aufgereinigten OEC-Fraktionen in einer Plasma-Clot-Matrix mittels Syto-9 angefärbt. Die Fibrinfasern wurden mit Fibrinogen AF595 angefärbt. Dazu wurden zunächst 5×10^3 Zellen ausgesät und nach 72 h die Zellen gefärbt, wobei die Fibrinfasern ebenfalls mit Fibrinogen AF595 angefärbt wurden. Die Ergebnisse der Zellviabilität und der räumlichen Verteilung von OEC-Fraktionen sind in Abbildung 29 dargestellt.

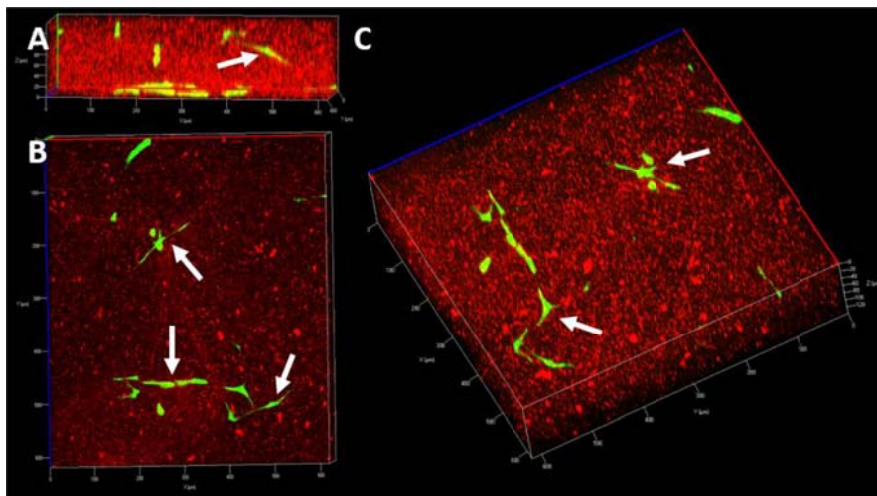


Abbildung 29: Repräsentative Z-Stack Aufnahmen einer Plasma-Clot-Matrix mit OEC-Fraktionen nach einer Inkubation von 72 h. Es wurden 50 % der gewonnenen Zellen nach der Aufreinigung mittels MACS eingesetzt in $250 \mu\text{l}$ DMEM/F-12 + $250 \mu\text{l}$ Citratplasma + $12,5 \mu\text{l}$ CaCl_2 + $5 \mu\text{l}$ Fibrinogen AF595. Die Zellen wurden mit Syto-9 gefärbt. Es wurden Z-Stack-Aufnahme wurde mittels des Programms ZEN angefertigt, bearbeitet und in verschiedene Orientierungen gebracht um die räumliche Anordnung darzustellen. (A) zeigt eine Frontalansicht auf einen ausgewählten Bereich des Clots. In (B) ist eine Aufsicht und in (C) eine Seitenansicht desselben Bereichs dargestellt.

Abbildung 29 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen vitaler Zellen in der Fibrinmatrix. Es ist eine Frontalansicht (Abb. 29A), eine Aufsicht (Abb. 29B) und eine Seitenansicht (Abb. 29C) dargestellt. Es zeigt sich eine Verteilung der Zellen innerhalb der Plasma-Clot-Matrix, wobei die OEC-Fraktion, ähnlich wie die OSC, Zellfortsätze bilden (weiße Pfeile Abb. 29).

4.2.12.2 Proliferationsverhalten in einer Plasma-Clot-Matrix

Um den Plasma-Clot als geeignete Trägermatrix weiter zu untersuchen, wurde die Proliferation der Zellen innerhalb der Matrix untersucht. Dazu wurden jeweils 5×10^3 Zellen in einem Gesamt-Clotvolumen von $500 \mu\text{l}$ ausgesät. Es wurde die Zellproliferation von hBMSC als Kontrollzellen sowie die Proliferation von isolierten OSC und Zellen der LP der OM untersucht. Die Zellen wurden zur Analyse in Wells einer 4-Well-Glaskammer ausgesät und nach 24 h, nach 72 h und nach fünf Tagen mit SytoTM-9 angefärbt und die Clots am CLSM

untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Proliferationsverhaltens sind in Abbildung 30 dargestellt.

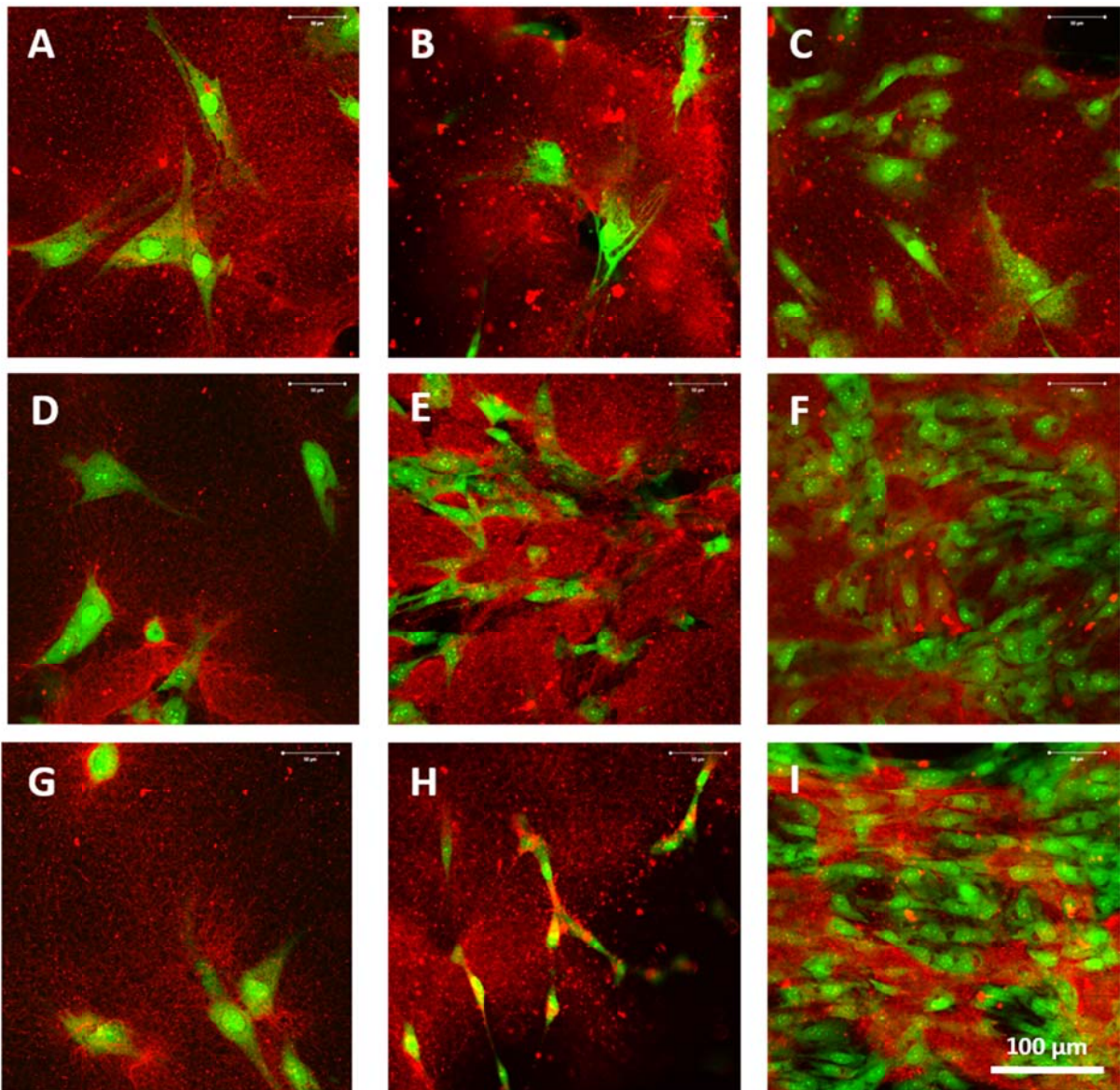


Abbildung 30: Analyse des Proliferationsverhaltens von BhMSC (A-C) als Kontrolle, aufgereinigten OSC (D-F) und isolierten OEC (G-I) innerhalb der Plasma-Clot-Matrix. Es sind Aufnahmen nach 24 h (A, D, G), nach 72 h (B, E, H) und nach fünf Tagen ((C, F, I) dargestellt. Für OSC und OEC-Fractionen der OM LP wurden 5×10^3 Zellen in $250 \mu\text{l}$ DMEM/F-12 + $250 \mu\text{l}$ Citratplasma + $12,5 \mu\text{l}$ CaCl_2 + $5 \mu\text{l}$ Fibrinogen AF595 eingesetzt. Für die BhMSC wurde der Anteil DMEM/F-12 durch RPMI1640 ersetzt. Die Zellen wurden mit SytoTM-9 und die Fibrinfasern mit Fibrinogen AF595 gefärbt.

Wie in Abbildung 30 zu erkennen, sind alle eingesäten Zellen vital (Abb. 30A+D+G) und zeigen eine Proliferation innerhalb der Plasma-Clot-Matrix (Abb. 30B+E+H), wobei OSC und isolierte Zellen der LP der OM (Abb. 30F+I) eine verstärkte Proliferation im Vergleich zu hBhMSC (Abb. 30C) aufweisen.

4.2.12.3 Degradierungsverhalten der Plasma-Clot Matrix

Die Auflösung der Plasma-Clot-Matrix ist nach einer Transplantation physiologisch relevant und wurde experimentell nachgestellt, um Aussagen über das Verhalten der Zellen im

Rahmen der Matrixauflösung zu erhalten. Dafür wurden aufgereinigte OSC und eine aufgereinigte OEC-Fraktion sowie hBMSC als Kontrolle in einer Plasma-Clot-Matrix ausgesät und die zeitabhängige Degradation *in-vitro* untersucht. Abbildung 31 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen innerhalb der Plasma-Clot-Matrix nach sieben Tagen in Kultur.

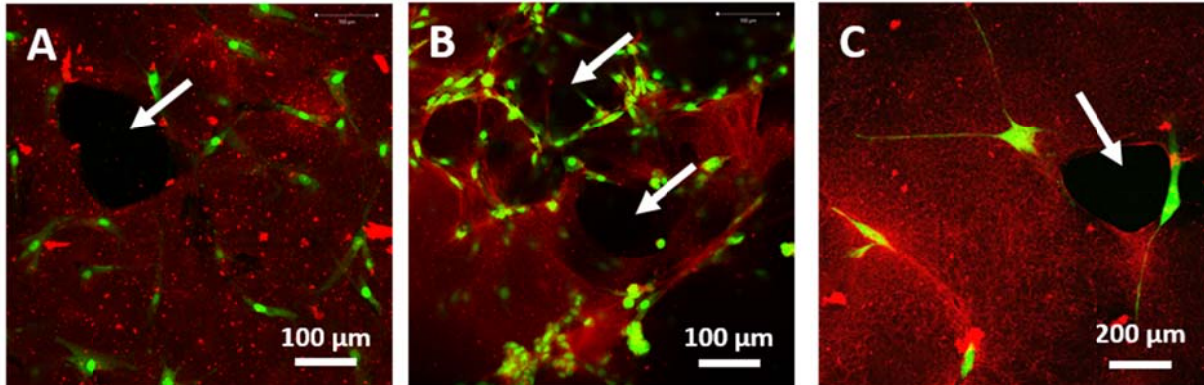


Abbildung 31: Degradierungsverhalten einer Plasma-Clot-Matrix beladen mit hBMSC (A) OSC (B) und einer OEC-Fraktion (C). Bei (A) und (B) wurden jeweils 5×10^3 Zellen in $250 \mu\text{l}$ DMEM/F-12 + $250 \mu\text{l}$ Citratplasma + $12,5 \mu\text{l}$ CaCl_2 + $5 \mu\text{l}$ Fibrinogen AF 595 eingesetzt. Bei (C) wurden 50 % (Zellzahl ca. 500) der gewonnenen Zellen nach der Aufreinigung mittels MACS eingesetzt in $250 \mu\text{l}$ DMEM/F-12 + $250 \mu\text{l}$ Citratplasma + $12,5 \mu\text{l}$ CaCl_2 + $5 \mu\text{l}$ Fibrinogen AF595. Die Zellen wurden nach sieben Tagen mit Syto-9 gefärbt. Die weißen Pfeile zeigen Löcher, die in der Matrix nach der Degradation entstanden sind.

Wie in Abbildung erkennbar, ist eine beginnende Degradation (Löcher in der Matrix gekennzeichnet mit weißen Pfeilen Abb. 31A+B+C) der Plasmaclot-Matrix nach sieben Tagen in allen getesteten Zellfraktionen zu beobachten. Dabei scheint die Proliferationsrate einen Einfluss auf die Degradierungsgeschwindigkeit zu haben, denn schnell proliferierende OSC (Abb. 31B) zeigen eine weit fortgeschrittene Degradation, im Vergleich zu hBMSCs (Abb. 31A) und der OEC-Fraktion (Abb. 31C) nach sieben Tagen.

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 waren wie folgt:

1. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2017. *Posterbeitrag*; Titel des Beitrages: *“Autologous multipotent stem cells and ensheathing cells from human olfactory mucosa for neuroregenerative approaches”*
2. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2018. *Abstract*; Titel des Beitrages: *„Zellen der humanen olfaktorischen und respiratorischen Nasenschleimhaut: Isolierung, Charakterisierung und Verhalten in einer autologen Trägermatrix für neuroregenerative Ansätze“*

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

Ziel dieses Projektes war es die humanen olfaktorischen „Ensheathing“-Zellen (OEC) aus der olfaktorischen Mukosa zu isolieren, charakterisieren und funktionell zu analysieren. Für den möglichen Einsatz zur neuronalen Regeneration nach Rückenmarktraumata ist die Etablierung von Methoden, die eine klinische Umsetzung ermöglichen besonders relevant. Die folgenden Forschungshypothesen im Projekt FR-256 konnten bestätigt werden:

- I. Olfaktorische Ensheathing-Zellen können aus Biopsien humaner olfaktorischer Mukosa (Lamina propria) isoliert und expandiert werden, allerdings ist die Ausbeute nicht sehr hoch und eine reine OEC-Fraktion konnte nicht erreicht werden.
- II. Epitop- und Funktionsanalysen erlauben die genaue Zellcharakterisierung, wobei OEC bis zu 20% angereicht werden können und danach noch funktionell sind
- III. Olfaktorische Stammzellen können aus Biopsien humaner olfaktorischer Mukosa (Epithelschicht) isoliert, aufgereinigt und expandiert werden. Diese sind CD90 und Nestin positiv und zeigen keine Verunreinigungen mit Mukus-produzierenden Zellen mehr. Des Weiteren können diese Zellen in neuron-ähnliche Zellen differenzieren, die β -Tubulin positiv sind.
- IV. Autologe Plasma-Clots können als Transfer-Matrix eingesetzt werden, wobei diese Matrix nach ca. 7 Tagen degradiert.

Schlussfolgerung

Experimentell konnten OEC isoliert und nach anschließender Aufreinigung charakterisiert werden, sowie deren Funktionalität bestimmt und das Verhalten in einer Plasma-Clot-Matrix untersucht werden.

Grundsätzlich ist die Isolierung und genaue Charakterisierung des Transplantates die Voraussetzung für einen klinischen Einsatz im ATMP-Verfahren, um eine größtmögliche Sicherheit für Patienten zu gewährleisten. Wie die Ergebnisse zeigen, konnten reine OEC

mit einer hohen Zellausbeute nicht isoliert werden, allerdings waren diese Zellen in der Lage, zu phagozytieren. Konditionierte Zellkulturüberstände der OEC führten bei neuronalen embryonalen Stammzellen (Zelllinie H9 Zellen) zu Neuronen-ähnlicher Morphologie mit langgestreckten Zellfortsätzen. Weitere Ergebnisse zeigen, dass eine reine OSC Fraktion mit Hilfe des Neurophären-Assays isoliert werden kann, wobei kontaminierende Mukos-produzierende Mukosa-Zellen eliminiert werden können. Die reinen CD90 positiven OSC zeigen ein neuronales Potential und sind in einer autologen Plasmaclot-Matrix vital. Zusammenfassend stellt die Kombination von olfaktorischen Zellen mit einer autologen Plasmaclot Matrix eine mögliche neue Methode zur Behandlung von Rückenmarkstrauma dar.

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: „Olfactory stem cells for the treatment of spinal cord injury: purification, characterization and behavior in an autologous plasma-clot matrix as cell carrier“). Zwar konnten keine reinen OEC-Fractionen mit einer hohen Zellzahl generiert werden, allerdings zeigten die Ergebnisse, dass die Überstände dieser Zellen ein neuronales Potential auf neuronale Stammzellen haben. Zusätzlich war es möglich reine OSC zu isolieren, welche auch ein hohes neuronales Potential für den Einsatz nach Rückenmarkstrauma haben.

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 Etablierung der Isolierungs- und Charakterisierungsarbeiten wird in einem anlaufenden Projekt (FR309) der Einfluss von Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) auf die isolierten Zellen untersucht, weil diese Zellen im Rahmen einer Zelltransplantation den Kontakt zur Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) erlangen werden. Somit können mit solchen Untersuchungen vorab neben therapeutisch gewünschten Wirkungen mögliche adverse Reaktionen (z.B. osteogene Differenzierung) frühzeitig identifiziert werden.

Konsequent wird aktuell als weiterer Schritt die Analyse von olfaktorischen Stamm- und Ensheathing-Zellen sowie mesenchymalen Stammzellen im Kontakt zu Cerebrospinalflüssigkeit als Grundvoraussetzung für humane zelltherapeutische Ansätze nach Rückenmarkstrauma untersucht [FR309].

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.

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 anlaufenden 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, Veglianesi 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*. Journal 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 models with traumatic thoracic spinal cord injury: A systemic review and meta-analysis*. Journal 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 enseathing cells with peripheral nerve bridging.* Cell Transplant 2014. 23;1631-1655.

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

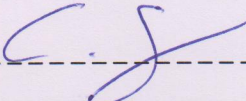
Projektnummer: FR256


Titel: Isolierung, neurotrophen Potential und Transfer-Eignung von olfaktorischen „Ensheathing“-Zellen als Voraussetzung für den Einsatz zur neuronalen Regeneration nach Rückenmarktraumata

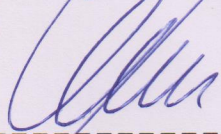
Erklärung für das Berichtswesen in Kooperationsprojekten

Hiermit erklären die Unterzeichnenden, dass der zum vorgelegte

Abschlussbericht mit allen Kooperationspartnern abgestimmt ist.


----- Datum: 7.11.19
Jun.-Prof. C. Sengstock, Chirurgische Forschung


----- Datum: 7.11.19
Prof. M. Köller, Chirurgische Forschung


----- Datum: 1.11.19
Dr. Aach, Abteilung Rückenmarkverletzte