

Transplantation neural vordifferenzierter embryonaler Stammzellen  
in Ratten nach experimentellem Schlaganfall

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Claudia Bühnemann  
geb. am 04.04.1978 in Dessau

Gutachter: Prof. Dr. Klaus G. Reymann  
Prof. Dr. Alexander Storch

eingereicht am: 28.06.2006

verteidigt am: 29.09.2006

*Meiner Familie*



## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Arten von Stammzellen.....	1
1.1.1	Adulte endogene Stammzellen im Zentralen Nervensystem.....	6
1.1.2	Verwendung exogener Stammzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	10
1.2	Schlaganfall.....	15
1.2.1	Ursachen.....	15
1.2.2	Auswirkungen.....	15
1.2.3	Pathophysiologie.....	16
1.2.4	Therapie.....	19
1.2.5	Exogene Stammzellen beim Schlaganfall.....	21
1.3	Einsatz von ES-Zellen bei neurodegenerativen Erkrankungen.....	23
1.4	Ziele der Arbeit.....	25
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1	Methoden.....	26
2.1.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	26
2.1.2	Fokale zerebrale Ischämie.....	26
2.1.3	Differenzierung neuraler Vorläuferzellen aus ES-Zellen der Maus.....	27
2.1.3.1	Herstellung einer EGFP-exprimierenden ES-Zelllinie.....	27
2.1.3.2	Kultivierung der Feeder-Zellen.....	27
2.1.3.3	Kultivierung der ES-Zellen.....	28
2.1.3.4	Neurale Differenzierung der ES-Zellen.....	29
2.1.4	Transplantation von Nestin+ ES-Zellen aus der Maus.....	30
2.1.5	Entnahme und Fixierung der Gehirne.....	32
2.1.6	Nachbehandlung der Gehirne.....	33
2.1.7	Färbung der Kryoschnitte mit Toluidinblau.....	33
2.1.8	Immunhistochemie.....	34
2.1.9	Transplantatgröße und Quantifizierung doppelmarkierter Zellen.....	36
2.1.10	Elektrophysiologische Ableitung.....	38
2.2	Materialien.....	43
2.2.1	Laborinstrumente und Geräte.....	43
2.2.2	Chemikalien.....	44

2.2.3	Antikörper .....	45
2.2.4	Lösungen .....	47
2.2.5	Zellkulturmedien .....	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
3.1	Überleben und Volumen der Transplantate 1, 4 und 12 Wochen nach Transplantation .....	51
3.1.1	Überleben der Transplantate .....	51
3.1.2	Volumina der Transplantate .....	53
3.2	Entwicklung der neuralen Vorläuferzellen 1 Woche nach kontralateraler Transplantation .....	54
3.2.1	Migration .....	54
3.2.2	Differenzierung .....	54
3.2.3	Proliferation .....	58
3.2.4	Expression von Nestin und GFAP in endogenen Zellen .....	58
3.3	Entwicklung der neuralen Vorläuferzellen 4 Wochen nach ipsilateraler Transplantation .....	59
3.3.1	Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten .....	59
3.3.2	Differenzierung in neuronale Subtypen .....	62
3.3.3	Expression des Wachstumsfaktors FGF-2 .....	66
3.4	Entwicklung der neuralen Vorläuferzellen 12 Wochen nach ipsilateraler Transplantation .....	67
3.4.1	Differenzierung in Neurone und Astrozyten .....	67
3.4.2	Differenzierung in Neurone und Astrozyten nach intraventrikulärer Transplantation .....	68
3.4.3	Interaktion der transplantierten Zellen mit dem Empfängergewebe .....	69
3.5	Elektrophysiologische Eigenschaften der Neurone und Astrozyten des Transplantats 3 bis 7 Wochen nach ipsilateraler Transplantation .....	71
3.5.1	Ausbildung spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumströme .....	71
3.5.2	Ausbildung von Aktionspotentialen und Entwicklung des Ruhepotentials .....	74
3.5.3	Entwicklung Kalzium-abhängiger Kaliumströme .....	75
3.5.4	Entwicklung von EPSPs und EPSCs .....	76
3.5.5	Elektrophysiologische Eigenschaften der Gliazellen .....	78

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>79</b>
4.1	Volumen und Überleben der Transplantate 1, 4 und 12 Wochen nach Transplantation.....	80
4.2	Differenzierung und Migration der kontralateral applizierten neuronalen Vorläuferzellen 1 Woche nach Transplantation .....	85
4.3	Differenzierung der ipsilateral applizierten Vorläuferzellen 4 und 12 Wochen nach Transplantation.....	87
4.4	Elektrophysiologische Eigenschaften der Neurone und Astrozyten des Transplantats .....	91
4.5	Entwicklung der intraventrikulär applizierten Zellen nach Transplantation .....	98
4.6	Tumore.....	99
4.7	Bedeutung der ES-Zellen für die zukünftige Stammzellforschung.....	100
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>105</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>106</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>109</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>131</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>132</b>

## 1. Einleitung

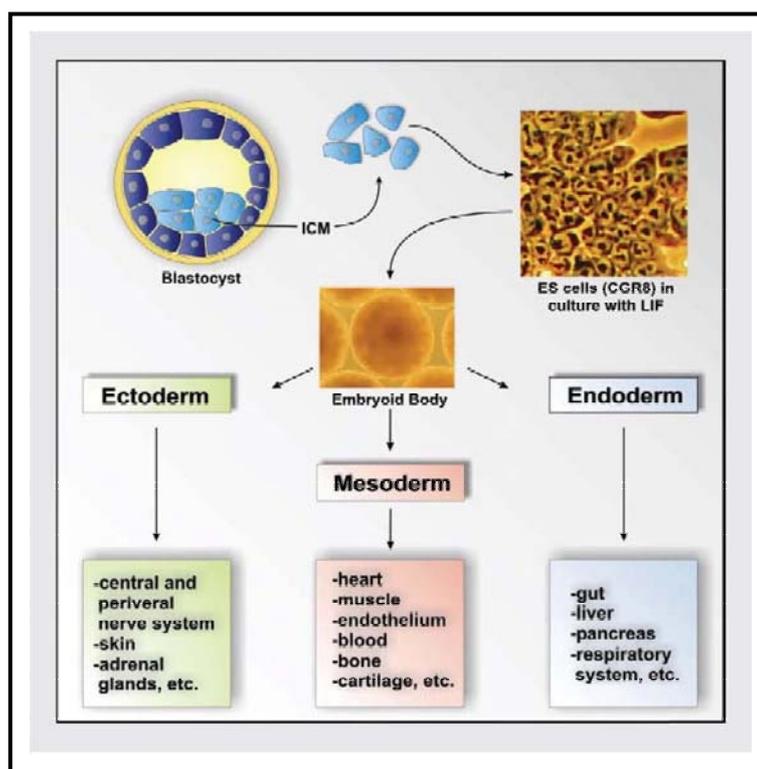
### 1.1 Arten von Stammzellen

Der menschliche Organismus ist wie bei allen höheren Lebewesen durch das komplexe Zusammenspiel von einzelnen Zellen gekennzeichnet. Dabei bilden Zellen mit ähnlicher Morphologie und struktureller Ausstattung Zellverbände, die als Gewebe zeitlich und räumlich abgestimmt agieren. Verschiedene Gewebsverbände wiederum bilden einzelne Organe wie Leber, Niere, Herz, Blut oder Gehirn. Letztlich stammt aber jede noch so spezialisierte Zelle von einer einzigen befruchteten Eizelle ab und die vollständige Ausbildung eines mehrzelligen Organismus ist die genetisch gesteuerte und von der Umwelt modifizierte Generierung immer neuer und weiter spezialisierter Tochterzellen. Nach Abschluss der ontogenetischen Wachstumsphase wird Zellteilung nicht mehr zum Ausbau und zur Verfeinerung von Geweben, sondern hauptsächlich zum Ersatz von alten und abgestorbenen Zellen verwendet. Dabei ist die Häufigkeit, mit der Zellen regeneriert werden, zwischen den einzelnen Organen stark unterschiedlich. Während im Knochenmark täglich ca.  $4 \times 10^{11}$  neue Blutzellen gebildet werden, sind es im Gehirn gerade mal einige Tausend Neurone, die pro Tag neu entstehen. Die Neubildung von Zellen erfolgt über die Zellteilung von Stammzellen, deren Tochterzellen zu spezialisierten Gewebszellen ausreifen. Mit zunehmendem Alter lässt die Regenerationsfähigkeit der Gewebe nach bzw. die neugebildeten Zellen weisen fehlerhafte Funktionen auf. Entstehende Krankheiten sind somit fast immer auf Fehlfunktionen bestimmter Zellen zurückzuführen. Diese Fehlfunktionen hat man bisher fast ausschließlich medikamentös behandelt. Stammzellen bieten nun die Möglichkeit, diese medikamentöse Behandlung durch eine Zellersatztherapie zu ergänzen und Reparaturmechanismen gezielter zu steuern. Aus diesem Grund sind Stammzellen in den letzten Jahren in wachsendem Maße einer der größten Hoffnungsträger in der Medizin geworden. In der Hämatologie und Onkologie

werden Stammzellen bereits seit 25 Jahren bei autologen und allogenen Transplantationen eingesetzt. Ferner ist es mit ihrer Hilfe möglich, Herzmuskelgewebe nach einem Infarkt wieder aufzubauen (Kocher et al., 2001; Orlic et al., 2001) oder geschädigte Leberzellen bei Leberversagen (Oertel et al., 2006), Hautzellen bei Brandverletzungen (Bianco und Robey 2001; Kinner und Daly 1992) und Knorpelzellen bei Arthrosen zu ersetzen (Cedar, 2006; Adachi et al., 2005). Per Definition sind Stammzellen unreife Vorläuferzellen eines Gewebes, die durch zwei besondere Eigenschaften charakterisiert sind: die Fähigkeit, in reife Stadien und gegebenenfalls in Zellen verschiedener Gewebe differenzieren zu können, und dem Vermögen, sich praktisch unbegrenzt selbst zu erneuern ohne dabei an Differenzierungspotential einzubüßen. Unter dem Einfluss verschiedener Faktoren des Umgebungsmilieus (z.B. Wachstumsfaktoren, genetische Faktoren, Nährstoffe) können Stammzellen in Zellen verschiedenster Gewebe differenzieren.

Je nach Entwicklungsperspektive werden totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen unterschieden. Als totipotente Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die in der Lage sind, zu einem vollständigen Lebewesen heranzureifen. Für Zellen eines menschlichen Embryos gilt dies bis zum 8-Zellstadium. Im Gegensatz dazu können sich pluripotente Stammzellen in jedes der etwa 200 Gewebe des Körpers entwickeln, inklusive Trophoblast bzw. Plazenta. Sie sind jedoch nicht mehr fähig ein vollständiges Individuum zu bilden. Ein typisches Beispiel für pluripotente Stammzellen sind embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die erstmalig 1981 an der Universität Cambridge erfolgreich aus Blastozysten der Maus isoliert wurden (Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). ES-Zellen stammen aus der frühen Entwicklungsphase eines Embryos, dem sogenannten Embryoblasten der Blastozyste. Sie sind unreif, nahezu beliebig vermehrbar und in der Lage, unter dem Einfluss geeigneter extrinsischer und intrinsischer Faktoren, in alle Zelltypen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) zu differenzieren. Im Jahr 1998 gelang es Thomson et al. (1998) erstmals humane ES-Zelllinien zu

etablieren, die aus befruchteten Eizellen gewonnen wurden. Ebenso wie murine ES-Zellen waren sie langfristig vermehrbar und differenzierten in viele verschiedene Zelltypen aus. Nach Injektion in immundefiziente Mäuse bildeten die humanen ES-Zellen gutartige Tumore (Teratome), in denen Gewebe aller drei Keimblätter enthalten waren (Thomson et al., 1998). Die uneingeschränkte Teilungsfähigkeit humaner ES-Zellen *in vitro* wird durch ihre Kultivierung auf einer Schicht mitotisch inaktiver embryonaler Mausfibroblasten (MEF, Abb. 1) aufrechterhalten. Im Gegensatz zu humanen ES-Zellen werden bei der Kultivierung muriner ES-Zellen zusätzlich noch hohe Konzentrationen des Leukämischen Inhibitorischen Faktors (LIF) benötigt.



**Abb. 1:** Schema zur Gewinnung von ES-Zellen und ihrer Differenzierbarkeit in spezifische Zelltypen aller drei Keimblätter - Ektoderm, Mesoderm und Endoderm (aus Doss et al., 2004). ES-Zellen werden experimentell aus der inneren Zellmasse (ICM) gewonnen.

Zu den multipotenten Stammzellen werden adulte Stammzellen gezählt, die postnatalen Ursprungs sind. Nach heutigen Erkenntnissen entstehen sie aus Zellen, die auf einem bestimmten Stück des Entwicklungsweges von der Blastozyste zum ausgereiften Organismus auf Vor- oder Zwischenstufen stehen bleiben (Fleischmann und Hescheler, 2004). Adulte Stammzellen wurden in einer Vielzahl von Organen (z.B. im Muskel, Fett oder Knochenmark) nachgewiesen und stehen als eine Art „Reparatur-Pool“ für die Regeneration des jeweiligen Organs zur Verfügung. Die hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks sind die am besten charakterisierten adulten Stammzellen. Sie sorgen für eine ständige Erneuerung der verschiedenen Blutbestandteile und des Immunsystems. Es werden drei Stammzellpopulationen unterschieden:

1. LT-HSZ (long term haematopoietic stem cells)
2. ST-HSZ (short term haematopoietic stem cells)
3. multipotente Progenitorzellen ohne die Fähigkeit zur Selbsterneuerung

Die drei Stammzellpopulationen stammen geradlinig voneinander ab, das bedeutet LT-HSZ entwickeln sich zu ST-HSZ und diese wiederum entwickeln sich zu multipotenten Progenitorzellen. Während LT-HSZ lebenslang in der Lage sind, ausgereifte Blutzellen zu generieren, sind ST-HSZ nur etwa acht Wochen dazu fähig. Aus den multipotenten Progenitorzellen gehen lymphoide und myeloide Vorläuferzellen hervor, die sich über mehrere Differenzierungsstufen zu ausgereiften Blutzellen wie Erythrozyten, Monozyten, Granulozyten oder Lymphozyten entwickeln. Pro Tag werden ca.  $4 \times 10^{11}$  neue Blutzellen gebildet, eine ungeheure Anzahl, die einen Großteil unseres Energie- und Stoffwechsels beansprucht. Die Erhaltung, Proliferation und Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen wird durch ihre Interaktion mit Knochenmarkstromazellen reguliert, die das Gerüst des Knochenmarks bilden. Knochenmarkstromazellen (bone marrow stromal cells, BMSC) enthalten außerdem Stammzellen, die *in vitro* (Pittenger et al., 1999) und *in vivo* (Jiang et al., 2003; Mankani et al., 2001; Cui et al., 2000; Kon et al., 2000) in

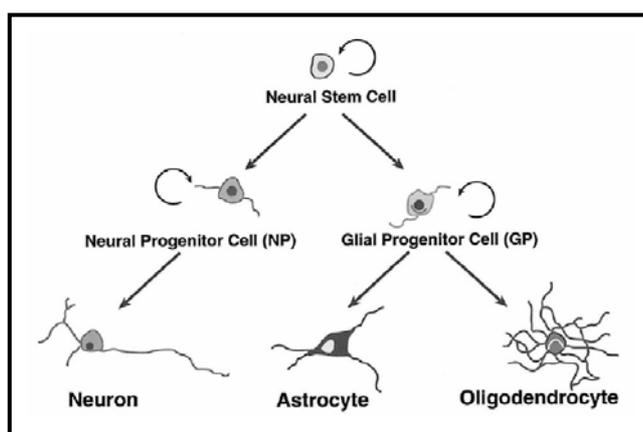
mesenchymale Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren, weshalb für sie in der heutigen Zeit auch der Begriff mesenchymale Stammzellen verwendet wird.

Neuerdings hat man sogar pluripotente Stammzellen im Fettgewebe identifiziert. Sie werden in einer Primärkultur, bestehend aus Fettzellen, über mehrere Passagen angereichert und besitzen dann, ebenso wie die mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks, ein breites Differenzierungsspektrum. Aufgrund ihres mesodermalen Ursprungs können sie ebenfalls in mesenchymales Gewebe, wie z.B. Chondrozyten, Adipozyten, Osteoblasten und Myozyten differenzieren (Zuk et al., 2001).

Nabelschnurblut enthält definitionsgemäß die jüngsten adulten Stammzellen. Diese autologen Stammzellen sind frei von bakterieller und viraler Kontamination und lassen sich ohne Risiko für Mutter und Kind durch Punktion der Nabelschnurvene gewinnen. Als Alternative zu den adulten Stammzellen des Knochenmarks können Nabelschnurblutzellen auch bei allogenen Transplantationen in der näheren Verwandtschaft eingesetzt werden. Sie besitzen den Vorteil immunologisch „unreif“ zu sein, wodurch die Gefahr der Abstoßung vermindert wird (Laughlin et al., 2001). In Anbetracht der positiven Erfahrungen bei der allogenen Transplantation von Nabelschnurblutzellen gewinnt der Aspekt der autologen Transplantation und der damit verbundenen Möglichkeit einer Stammzelltherapie bei bislang unheilbaren Erkrankungen mehr und mehr an Bedeutung (Sanchez-Ramos et al., 2002). So werden seit einigen Jahren zunehmend Nabelschnurblutbanken (z.B. VITA 34) aufgebaut, in denen die Zellen für mehrere Jahre kryokonserviert aufbewahrt werden können.

### 1.1.1 Adulte endogene Stammzellen im Zentralen Nervensystem

Über lange Zeit wurde angenommen, dass alle Zellen im Hirn adulter Säuger postmitotisch wären und keine neuen Nervenzellen gebildet werden. Erste autoradiographische Studien von J. Altman um 1960 zeigten jedoch, dass teilungsfähige Zellen auch im adulten zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugern vorkommen (Altman und Das, 1967; Altman, 1966; Altman und Das, 1965). Diese Zellen erwiesen sich als Stammzellen und werden deshalb als neurale Stammzellen des ZNS bezeichnet. Sie sind zeitlebens teilungsfähig, selbst erneuerbar und entwickeln sich oftmals über die Zwischenstufe der neuralen bzw. glialen Progenitorzelle in alle drei Zelltypen des ZNS: Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Abb. 2).



**Abb. 2: Neurale Stammzellen und ihre Differenzierung.** Neurale Stammzellen entwickeln sich oftmals, aber nicht immer über die Stufe der neuralen (NP) bzw. glialen Progenitorzelle (GP) in Neurone, Astrozyten oder Oligodendrozyten (aus Okano et al., 2002).

Eine charakteristische Eigenschaft neuraler Stammzellen ist ihre Fähigkeit, *in vitro* freischwimmende Neurosphenen zu bilden (Reynolds und Weiss, 1992). Des Weiteren können sie auch durch die Expression typischer Markerproteine wie Nestin (Lendahl et al., 1990), musashi (Kaneko et al., 2000) und einigen Vertretern der Sox-Familie (Transkriptionsfaktoren; Pevny et al., 1998) *in vitro* und *in vivo* detektiert werden. Ontogenetisch können neurale Stammzellen erstmals mit Ausbildung der Neuralplatte

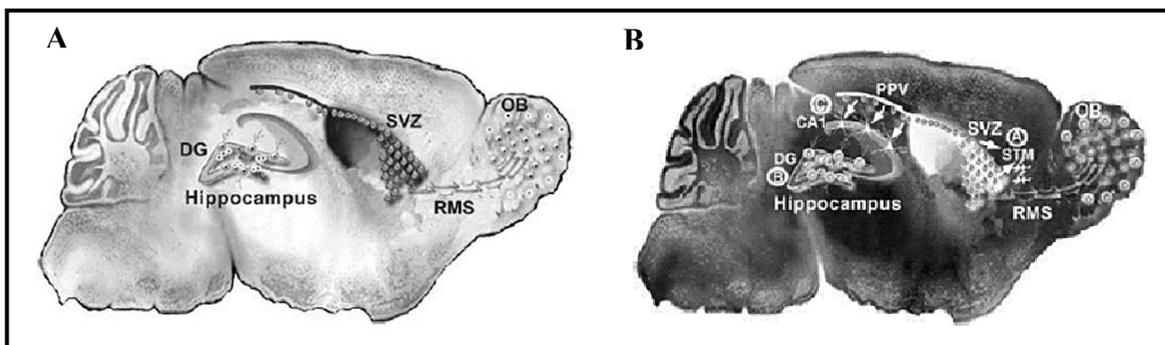
nachgewiesen werden. Im adulten Organismus findet man neurale Stammzellen sowohl in neurogenen als auch nicht-neurogenen Zonen (Gage, 2000). Zu den nicht-neurogenen Zonen zählt beispielsweise das Rückenmark, dessen neugebildete Zellen glialer Natur sind (Horner et al., 2000).

Die Studien der letzten Jahre belegen, dass das adulte Hirn in der Lage ist, neue Neurone zu generieren. Bisher wurden 2 Regionen identifiziert, in denen Neurogenese stattfindet. Dazu gehören die Subventrikularzone (SVZ) der lateralen Ventrikel (Pencea et al., 2001; Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Corotto et al., 1993; Altman und Das, 1969) und der Gyrus dentatus (DG) im Hippokampus (Abb. 3A, Kornack und Rakic, 1999; Eriksson et al., 1998; Gould et al., 1998; Kuhn et al., 1996; Cameron et al., 1993; Kaplan und Hinds, 1977; Altman und Das, 1965). Die sich in der SVZ teilenden Progenitorzellen entwickeln sich zu Neuroblasten, die tangential mit dem rostralen migratorischen Strom (RMS) in den Bulbus olfactorius wandern und dort zu Neuronen differenzieren (Doetsch et al., 1999; Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Corotto et al., 1993; Altman, 1969).

In der Subgranularzellschicht des DG kommt es wie auch in der SVZ während des gesamten Lebens zur Bildung neuer Progenitorzellen. Sie migrieren über eine kurze Distanz in die Granularzellschicht, in der sie zu Körnerzellen differenzieren und sich in das bestehende Netzwerk integrieren (Kuhn et al., 1996; Cameron et al., 1993). Die neugebildeten Körnerzellen erhalten einen synaptischen Eingang, senden axonale Projektionen in die CA3-Region des Hippokampus und entwickeln typische elektrophysiologische Eigenschaften reifer Neurone. In jungen Ratten können sich täglich bis zu 9.000 neue Körnerzellen bilden (Cameron und McKay, 2001), mit zunehmendem Alter nimmt ihre Zahl jedoch ab (Kuhn et al., 1996).

Über die Funktion der neugebildeten Nervenzellen ist bislang noch wenig bekannt. Von den neugebildeten Neuronen im Bulbus olfactorius (OB) nimmt man an, dass sie eine

wichtige Rolle bei der Erinnerung und Geruchsdiskriminierung spielen (Rocheffort et al., 2002). Die neugebildeten Körnerzellen im Hippokampus fungieren vermutlich bei der Bildung und Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses (Shors et al., 2001).



**Abb. 3: Sagittalschnitte zur Darstellung der neurogenen Zonen im ungeschädigten (A) und geschädigten adulten Nagerhirn (B).** In der Subventrikularzone (SVZ) und im Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus kommt es zeitlebens zur Bildung neuer adulter Stammzellen. Aus den sich teilenden Progenitorzellen in der SVZ entwickeln sich Neuroblasten, die mit dem rostralen migratorischen Strom (RMS) in den Bulbus olfactorius (OB) wandern und dort zu reifen Neuronen differenzieren. In der Granularzellschicht des DG entstehen ebenfalls ständig neue Progenitorzellen (A). In Abb. B sind die Regionen aufgezeigt, in denen es nach Verletzung verstärkt zur Zellproliferation und Neurogenese kommt. Nach fokaler Ischämie werden Progenitorzellen der SVZ zur Bildung neuer Neurone ins geschädigte Striatum (STM) rekrutiert. Durch diese Ereignisse wird ebenfalls die Proliferation im DG angeregt. Nach einer globalen Ischämie kommt es zur Bildung neuer CA1-Pyramidenneurone, wobei ein Teil dieser Zellen vermutlich aus dem benachbarten Posterioren Periventrikel (PPV) stammt (aus Lichtenwalner und Parent, 2006).

Beinahe alle Formen von Hirnverletzungen steigern die Neurogenese im DG und der SVZ. So zeigen Jin et al. (2001) nach transienter und Zhang et al. (2001) nach permanenter fokaler Ischämie (embolisch) eine gesteigerte Neurogenese in der SVZ, die nach sieben Tagen ihr Maximum erreicht. In der ipsilateral zum Infarkt gelegenen SVZ scheint die Bildung neuer Zellen sogar noch erhöht (Arvidsson et al., 2002; Parent et al. 2002). Es wurde außerdem eine starke Assoziation zwischen erhöhter Neurogenese und dem Zellersatz im verletzten Striatum beobachtet. Die neugebildeten DCX+ Neuroblasten

wandern dabei kettenartig, d.h. in Gruppen aus mehreren Zellen ins Schädigungsgebiet ein und reifen dort zu striatalen Neuronen aus (DARPP32+; Arvidsson et al., 2002; Parent et al. 2002). Obwohl einige der neugebildeten striatalen Neurone bis zu 6 Wochen nach tMCAO überleben, sterben 80 % von ihnen im Zeitraum von 2 bis 6 Wochen nach Ischämie wieder ab. Der Anteil an toten striatalen Neuronen, die durch neugebildete Neurone ersetzt werden, ist somit verschwindend gering und beträgt nur etwa 0,2 % (Arvidsson et al., 2002).

Auch bei der globalen Ischämie konnten Nakatomi et al. (2002) und Schmidt und Reymann (2002) zeigen, dass endogene Stammzellen in der Lage sind, die geschädigte Pyramidenzellschicht in der CA1-Region des Hippokampus teilweise zu regenerieren. Die intraventrikuläre Verabreichung von FGF-2 und EGF innerhalb der ersten Tage nach globaler Ischämie führte zu einer 40 %igen Regeneration der CA1-Pyramidenzellen nach 4 Wochen. Nakatomi et al. (2002) beschreiben weiterhin den Posterioren Periventrikel als Herkunftsort der neugebildeten Pyramidenzellen, die nach Schädigung in die CA1-Region migrieren und sich dort zu elektrophysiologisch reifen Neuronen entwickeln.

Die bisherigen Untersuchungen zeigen in jedem Fall, dass endogene Vorläuferzellen fähig sind, einige geschädigte Neurone im adulten Organismus zu ersetzen. Jedoch ist die Zahl neugebildeter Zellen äußerst gering, und eine gezielte Anreicherung der Zellen mittels Wachstumsfaktoren erscheint bislang nicht ausreichend für eine vollständige Reparatur des läsierten Gebiets (Scharfman et al., 2000; Parent et al., 1997).

### **1.1.2 Verwendung exogener Stammzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen**

Kaum ein anderes Organsystem zeigt ein so geringes Regenerationspotential wie das ZNS. Von den wenigen Regionen mit nachgewiesener adulter Neurogenese (SVZ und DG) abgesehen, scheinen Gehirn und Rückenmark im Lauf der Evolution die Fähigkeit zur Neurogenese und Geweberegeneration weitgehend verloren zu haben. Die Neuroplastizität als Fähigkeit des ZNS, Funktionen geschädigter Hirnbereiche durch andere Regionen zu übernehmen, ist unter bestimmten Bedingungen nachgewiesen worden. Sie reicht allerdings nicht aus, um die bei einem Schlaganfall geschädigten Zentren funktionell zu ersetzen.

Die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen erfolgt bisher nur symptomatisch. Dies könnte sich jedoch in Zukunft durch den Einsatz von Stammzellen ändern. Im folgenden Abschnitt soll nun ein kurzer Abriss über den Einsatz von Stammzellen an drei ausgewählten Beispielen für neurodegenerative Erkrankungen des ZNS gegeben werden.

Seit einigen Jahren wird die Transplantation von Stammzellen zur Behandlung von Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder Amyotropher Lateralsklerose (ALS) durchgeführt. Morbus Parkinson ist eine progressive Erkrankung, die zur Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra führt. Die derzeit angewandten Medikamente bewirken nur eine Linderung der typischen Symptome der Krankheit (Tremor, Rigor), bekämpfen aber nicht ihre eigentliche Ursache. Der Zellersatz mittels Stammzellen wird schon seit vielen Jahren am Tiermodell untersucht und wurde auch schon am Patienten getestet. Bereits gegen Ende der 70er Jahre berichteten Björklund und Stenevi (1979) sowie Perlow et al. (1979) erstmals von einer funktionellen Erholung im Tiermodell der Ratte, nachdem sie solide Gewebstückchen aus dem fötalen ventralen Mesencephalon (VM) von Rattenembryonen ins geschädigte Striatum applizierten. Die dopaminergen Zellen überlebten, reinnervierten das Striatum und verbesserten die motorischen Fähigkeiten der Tiere. Einige Zeit später beschrieben Björklund et al. (1983)

eine modifizierte Transplantationstechnik bei der Implantate von Zellsuspensionen des VM stereotaktisch in tiefer gelegene, intraparenchymale Zellgebiete (z.B. Corpus striatum) injiziert wurden. Auf diese Weise wurde das Risiko eines durch die Transplantationsprozedur entstehenden Traumas wesentlich reduziert.

In den folgenden Jahren wurden solche Transplantationen auch an Parkinson-Patienten durchgeführt. Insgesamt wurden weltweit bislang mehr als 350 Parkinson-Patienten mit fötalen dopaminergen Stammzellen transplantiert (Barker und Widner, 2004). Mit Hilfe bildgebender Verfahren wie der Positronenemissionstomografie (PET) zeigte sich innerhalb eines Jahres nach Transplantation eine gesteigerte Aufnahme des Dopamin-Vorläufers Fluorodopa im Striatum sowie eine vom Transplantat induzierte Dopaminausschüttung (Piccini et al., 1999; Freeman et al., 1995; Kordower et al., 1995; Sawle et al., 1992). Trotz fortschreitender Erkrankung waren die transplantierten Neurone in der Lage, das degenerierte Striatum für mehr als zehn Jahre zu reinnervieren (Piccini et al., 1999; Kordower et al., 1995) und Beeinträchtigungen wie z.B. auftretende Akinesien zu lindern (Piccini et al., 2000). Für die Transplantation eines Parkinson-Patienten benötigt man allerdings Gewebe von sechs und mehr menschlichen Föten (Kordower et al., 1996). Nachteilig ist des Weiteren die Heterogenität der transplantierten fötalen Gehirnabschnitte, die neben der gewünschten Zellpopulation eine Vielzahl anderer neuronaler Subtypen enthalten. Im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen zeigte eine im Jahr 2003 veröffentlichte Studie keinerlei Verbesserungen nach Transplantation fötaler VM-Zellen. Außerdem traten die typischen Symptome der Krankheit nach Absetzen der Immunsuppressiva erneut auf, ein Effekt, der vermutlich auf Abstoßungsreaktionen des Empfängergewebes zurückzuführen war (Olanow et al., 2003). Weitere Erkenntnisse belegen, dass nur etwa 5 % der fötalen dopaminergen Neurone nach Transplantation überlebensfähig sind (Lindvall, 1994). Patienten, die älter als 60 Jahre waren, trugen

keinen Nutzen von dieser Art der Therapie. Einige entwickelten sogar schwere Dyskinesien und Dystonien (Freed et al., 2001).

Chorea Huntington, auch „Veitstanz“ genannt, ist eine seltene erbliche Erkrankung, die zu motorischen, kognitiven und psychischen Schädigungen bei den Betroffenen führt. Ursache der Krankheit ist ein fortschreitender Zellverlust bzw. eine Atrophie GABAerger Projektionsneurone im Striatum und Neocortex (Leegwater-Kim und Cha, 2004; Bates et al., 2002). Auch hier kann die momentane Behandlung die Symptome nur vermindern. Deshalb wird seit einigen Jahren der Zellersatz durch Transplantation verschiedener Stammzelltypen erprobt. Fötale Stammzellen wurden bereits im Tiermodell ins geschädigte Striatum von Mäusen, Ratten und Primaten transplantiert. Sie überlebten, differenzierten sich regionsspezifisch und verbesserten motorische oder kognitive Verhaltensdefizite (Dunnett et al., 2000; Kaemmerer und Low, 1999; Kendall et al., 1998; Palfi et al., 1998). Die striatalen Transplantate bildeten außerdem afferente und efferente Verbindungen mit dem Empfängergewebe, die sowohl elektrophysiologisch (Nakao et al., 1999; Xu et al., 1991) als auch neurochemisch (Campbell et al., 1993; Sirinathsinghji et al., 1988) aktiv waren.

Die Erfolge im Tiermodell bildeten fortan die Basis für klinische Transplantationen am Patienten. In einer umfangreichen Untersuchung demonstrierten Kopyov und Mitarbeiter motorische und psychologische Verbesserungen bei drei Patienten, die mit humanen fötalen Zellen aus dem Striatum transplantiert wurden (Kopyov et al., 1998; Philpott et al., 1997). In der Magnetresonanztomographie zeigten sich die Zellen überlebensfähig und differenzierten zu reifen Nervenzellen (Ross et al., 1999). In einer weiteren Studie zeigte sich ein Jahr nach Behandlung mit fötalen Zellen eine erhöhte metabolische Aktivität im Striatum, die ebenfalls mit motorischen und kognitiven Verhaltensverbesserungen einherging (Bachoud-Levi et al., 2000). Trotz der klinischen Erfolge sind die kürzlich veröffentlichten Ergebnisse eher ernüchternd. Ergänzend zur Studie von 2000 berichteten

Bachoud-Levi et al. (2006) von einer klinischen Verbesserung, die nur für zwei Jahre nach Transplantation anhält und im Zeitraum von vier bis sechs Jahren nach Transplantation wieder verschwindet. Die Behandlung mit Xenotransplantaten aus striatalem Schweinegewebe brachte nicht den gewünschten Erfolg, da die Zellen bei allen zwölf getesteten Patienten nicht überlebten und auch keine funktionellen Verbesserungen hervorriefen (Fink et al., 2000). Bis heute gibt es noch keine effektive Therapie für Reparatur, Ersatz und Protektion geschädigter Nervenzellen bei Chorea Huntington.

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine chronische Erkrankung, die anfangs Muskellähmungen und Muskelschwund hervorruft und schließlich zum Tode durch Ateminsuffizienz führt. Bei der ALS degenerieren zunehmend das obere (erste) und untere (zweite) Motoneuron im Gehirn und Rückenmark bzw. in peripheren Nerven. Die Behandlung mit Medikamenten kann das Leben der Patienten nur verlängern, die Krankheit aber nicht aufhalten. Die Stammzelltherapie stellt daher eine attraktive Strategie für den Zellersatz bei ALS dar und wird bereits präklinisch und klinisch untersucht. Erste präklinische Daten belegen einen positiven Einfluss intraspinal verabreichter humaner NT2-Zellen auf die Lebenserwartung und gestörte Motorik bei der transgenen SOD1G93 Maus, einem Tiermodell der ALS (Garbuzova-Davis et al., 2002). Garbuzova-Davis et al. (2003) berichten weiterhin von der Migration intravenös verabreichter humaner Nabelschnurblutzellen ins degenerierte Gehirn und Rückenmark und ihrer dortigen Differenzierung in neurale Vorläuferzellen, Neurone und Astrozyten. Zudem wurde der progressive Verlauf der Krankheit in Abhängigkeit von der Anzahl der transplantierten Zellen verzögert und dadurch die Lebensdauer der Tiere erhöht (Chen und Ende, 2000).

Die ersten und bis jetzt einzigen klinischen Transplantationen an Patienten mit ALS wurden von Janson et al. (2001) und Mazzini et al. (2003) durchgeführt. Während Janson et al. nach intrazerebroventrikulärer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen in drei ALS-Patienten keinerlei funktionelle Verbesserungen beobachten konnten, berichten

Mazzini et al. von einer verlangsamten Abnahme der Muskelkraft in den unteren Extremitäten bei vier von sieben Patienten nach Transplantation von mesenchymalen Stammzellen. Bei zwei Patienten ließ sich sogar eine geringfügige Zunahme der Muskelkraft beobachten.

Der kurze zusammenfassende Überblick demonstriert deutlich, dass die Transplantation exogener Stammzellen als Zellersatzstrategie, in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht hat. Die Forschung an Stammzellen gibt neue Hoffnungen für bislang unheilbare neurodegenerative Erkrankungen. So ist die Besserung der Krankheitssymptomatik des Morbus Parkinson durch Transplantation dopaminergischer Zellen experimentell wie klinisch belegt. Auf den derzeitigen Stand bei der Transplantation nach Schlaganfall wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

## **1.2 Schlaganfall**

### **1.2.1 Ursachen**

In den westlichen Industrieländern ist der Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache und häufigster Grund für schwere Behinderungen. In Deutschland erleiden ihn jährlich 250.000 Menschen; davon versterben 75.000 innerhalb des ersten Monats, etwa ein Drittel der Patienten bleibt auf lange Sicht pflegebedürftig und schwerbehindert.

Der Schlaganfall auch Apoplexie, Gehirnschlag, apoplektischer Insult oder Hirninfarkt genannt, ist eine akute Durchblutungsstörung des Gehirns, die zu einem akuten Sauerstoffmangel führt und „schlagartig“ unterschiedlichste Funktionsstörungen und vielfach auch Funktionsverluste zur Folge hat. Auslöser ist bei etwa 80 % der Patienten ein Gefäßverschluss (thrombotischer Insult) aufgrund einer Arteriosklerose oder ein vom Herzen bzw. der Halsschlagader eingeschwemmtes Blutgerinnsel (Embolie). Etwa 20 % der Schlaganfälle entstehen durch spontane intrazerebrale Blutungen, die durch Ruptur eines Gefäßes ausgelöst werden und zur Einblutung und Kompression des Hirngewebes führen (hämorrhagischer Insult). Die Auswirkungen eines hämorrhagischen Insults unterscheiden sich letztendlich nicht von einem thrombotischen Insult, da sie ebenfalls zum Ausfall der Blutversorgung in einem definierten Hirnareal führen. Gelingt es nicht, den Sauerstoffmangel rasch zu beheben, stirbt das von der Blutversorgung abgeschnittene Gewebe nach einem Thrombus, Embolus oder einer geplatzten Hirnarterie innerhalb von wenigen Minuten ab.

### **1.2.2 Auswirkungen**

Ein Schlaganfall führt zu ausgeprägten und anhaltenden neurologischen Ausfallserscheinungen wie z.B. einer Halbseitenlähmung in Form einer Hemiplegie oder Hemiparese. Unter Hemiplegie versteht man die vollständige Lähmung einer Körperseite,

unter Hemiparese eine unvollständige Lähmung mit Erhalt von Teilfunktionen. Meist sind Rumpf, Arm, Bein und Gesicht betroffen. Motorische Defizite sind die mit Abstand häufigsten Symptome und kommen bei etwa 90 % der Schlaganfallpatienten vor.

Sensomotorische Störungen zeigen sich darin, dass die gestörte Körperseite Berührungen, Temperaturunterschiede oder Schmerz nicht empfinden kann; sie ist taub. Gleichgewichts-, Sprach- (Aphasie) und Bewusstseinsstörungen bis hin zu Bewusstlosigkeit (Koma) sind ebenfalls typische Folgen eines Schlaganfalls.

### 1.2.3 Pathophysiologie

Der neuronale Zelltod nach zerebraler Ischämie wird durch vier zeitlich aufeinanderfolgende, teilweise überlappende zerstörerische Ereignisse induziert, die zusammenfassend als ischämische Kaskade bezeichnet werden. Zu diesen Ereignissen zählen Exzitotoxizität, Peri-Infarkt Depolarisation, Inflammation und Apoptose (Übersicht in Dirnagl et al., 1999). Durch die Abnahme der zerebralen Durchblutung nach einem ischämischen Schlaganfall kommt es zur Unterversorgung der Zellen mit Glucose und Sauerstoff. Der Sauerstoffmangel führt zum Zusammenbruch der Atmungskette, woraus ein Energiemangel in Form von ATP resultiert. Als Folge des ATP-Mangels sind die energieabhängigen Ionentransporter, wie die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe und die  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{H}^+$ -Pumpe nicht mehr in der Lage, die Ionengradienten der Zelle aufrechtzuerhalten. Das Membranpotential bricht zusammen und Nerven- und Gliazellen werden depolarisiert (Katsura et al., 1994). Im ersten Schritt der ischämischen Kaskade, der Exzitotoxizität, werden durch die Depolarisierung, somatodendritische und präsynaptische spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert, die eine Sekretion exzitatorischer Aminosäuren, wie z.B. Glutamat, in den Extrazellulärraum induzieren. Die infolge Energiemangels gestörte Wiederaufnahme exzitatorischer Aminosäuren an den Präsynapsen und Gliazellen führt zusätzlich zur Anreicherung von Glutamat im synaptischen Spalt. Durch die hohen

Glutamatkonzentrationen werden NMDA-Rezeptoren und metabotrope Glutamatrezeptoren aktiviert, die eine verstärkte intrazelluläre Anreicherung von Kalzium bewirken (Nehls et al., 1989). Aufgrund der hohen Glutamatspiegel sind die Neurone überaktiviert und Natrium- und Chloridionen strömen unaufhaltsam ins Zellinnere. Da der Einstrom von Natrium und Chloridionen stärker als der Ausstrom von Kalium ist, folgt Wasser passiv nach und es kommt zur Ödembildung. Kalzium, das zusätzlich aus den intrazellulären Speichern ins Cytosol freigesetzt wird, kann aufgrund des Energiemangels nicht aus den Zellen heraustransportiert werden (Siesjö et al., 1992). Es reichert sich verstärkt in den Neuronen an und aktiviert eine Reihe von Enzymen, wie z.B. Kinasen, Phospholipasen, Endonucleasen und Calpain. Die Aktivierung von Calpain, einer intrazellulären Protease, führt zur Zerstörung des Strukturproteins Spektrin und des Zytoskeletts. Zusätzlich erzeugt Calpain neben Phospholipase A<sub>2</sub> und Cyclooxygenase freie Radikale, die Membranschäden induzieren und spätere Prozesse wie Inflammation und Apoptose triggern. So wird u.a. die innere Mitochondrienmembran durch freie Radikale geschädigt und Proteine, die den Elektronentransport, den H<sup>+</sup>-Ausstrom sowie die ATP-Produktion steuern, werden oxidiert (Dugan und Choi, 1994). Die Mitochondrien schwellen an und sezernieren Cytochrom C, woraufhin eine apoptotische Kaskade der Zelle eingeleitet wird (Fujimura et al., 1998).

Die Peri-Infarkt Depolarisierung beschreibt den Prozess der sich ständig wiederholenden Depolarisation ischämisch geschädigter Zellen in der Penumbra. Aufgrund des Energiemangels depolarisieren Nerven- und Gliazellen und Kalium und Glutamat werden in den Extrazellulärraum abgegeben. Im Gegensatz zum nicht mehr durchbluteten Infarktkern, in dem die Zellen nur einmal anoxisch depolarisieren und dann absterben, können die Nervenzellen in der minderdurchbluteten Penumbra unter zusätzlichem Energieaufwand repolarisieren. Durch steigende Kalium- und Glutamatkonzentrationen im Extrazellulärraum depolarisieren sie erneut, ein Prozess der sich mehrmals stündlich

wiederholt und bis zu acht Stunden nach Ischämie zu beobachten ist. Die Frequenz, mit der die Depolarisation auftritt, korreliert dabei mit der Infarktgröße (Mies et al., 1993).

Im weiteren Verlauf der ischämischen Kaskade reagiert das Gehirn auf die Ischämie mit einer Entzündungsreaktion (Inflammation). Diese hält über Tage bis Wochen an und ist gekennzeichnet durch das Einwandern von Leukozyten aus dem Blut ins geschädigte Hirngewebe, durch die Aktivierung von Mikroglia, Makrophagen und Astrozyten sowie durch die Sekretion zytotoxischer Substanzen durch diese Entzündungszellen (Arvin et al., 1996). Zu Beginn der Entzündungsreaktion akkumulieren Leukozyten verstärkt in den Kapillargefäßen (Hallenbeck et al., 1986) und treten mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen ins Hirngewebe über (Granger und Kvietys, 1993). Die verstärkte Ansammlung von Leukozyten in kleineren Blutgefäßen wird als mögliche Ursache für einen verminderten Blutfluss bei einer Reperfusion angesehen (Grogaard et al., 1989). Des Weiteren wandern Makrophagen aus dem zirkulierenden Blut in das geschädigte Hirnareal ein und beseitigen zusammen mit aktivierter Mikroglia geschädigte Neurone. Infiltrierende Leukozyten wie auch aktivierte Mikrogliazellen und Astrozyten können Zytokine synthetisieren und freisetzen. Vor allem proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , werden wenige Stunden nach Ischämiebeginn in hoher Konzentration sezerniert (Saito et al., 1996) und tragen zur weiteren Aktivierung von Entzündungszellen, zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und zur verstärkten Produktion freier Radikale bei (Quagliarello et al., 1991; Sullivan et al., 1989; Lachmann et al., 1987). Alle diese inflammatorischen Prozesse sowie die Expression der iNO-Synthase (iNOS) und die damit verbundene Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) verstärken den ischämischen Zellschaden (Nathan und Xie, 1994).

Die Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelltods im ZNS dar, die sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen von Bedeutung ist. In verschiedenen Tiermodellen der globalen und fokalen Ischämie konnte gezeigt werden,

dass Apoptose für den Zelluntergang nach zerebraler Ischämie verantwortlich ist. Besonders in der Penumbra, in der die Zellen noch einen Restmetabolismus aufweisen, scheint Apoptose verstärkt aufzutreten. Das durch ATP-Mangel veränderte Membranpotential der Mitochondrien induziert die Freisetzung von Cytochrom C ins Cytosol. Cytochrom C aktiviert proteinspaltende Enzyme, sogenannte Caspasen, die in der Lage sind, zelluläre Reparaturproteine wie z.B. Poly-ADP-Ribose Polymerase durch Spaltung zu inaktivieren und damit den Zelltod einzuleiten. Unter den 12 bislang identifizierten Caspasen haben Caspase 1 und 3 eine entscheidende Rolle bei der ischämisch bedingten Apoptose (Dirnagl et al., 1999).

#### **1.2.4 Therapie**

Die Behandlung des Schlaganfalls ist abhängig davon, ob ein Gefäßverschluss oder eine Hirnblutung vorliegt. Bei der Therapierung des thrombotischen Schlaganfalls, der durch einen Gefäßverschluss ausgelöst wird, werden zur Zeit hauptsächlich zwei Ziele verfolgt: 1. die Auflösung des Blutgerinnsels (Thrombolyse) und 2. der Schutz des Randbereiches, der zwar geschädigt, aber noch nicht abgestorben ist (Neuroprotektion). Nach einem Gefäßverschluss lassen sich in der Akutphase zwei Hirnregionen aufgrund ihres Perfusionsgrades unterscheiden: der Infarktkern, der nicht mehr durchblutet ist (totale Ischämie) und einen diesen Kern umgebenden Randbereich mit Restdurchblutung (Penumbra). Während die fehlende Durchblutung im Infarktkern zur irreversiblen Schädigung der Nervenzellen und damit zu deren Absterben führt, werden die in der Penumbra befindlichen Nervenzellen durch Kollateralgefäße versorgt und bleiben damit zwar nicht funktionell, aber strukturell erhalten. Die Nervenzellen in der Penumbra können ihre Funktion wiedererlangen, wenn die Perfusion dieses Randbereiches innerhalb eines bestimmten Zeitraumes wiederhergestellt wird.

Die Behandlung des Schlaganfalls mittels Thrombolyse kommt vor allem für Patienten in Frage, die innerhalb der ersten drei Stunden nach Auftreten der Symptome in die Klinik aufgenommen werden können. Sie ist die einzige bisher klinisch anwendbare Therapie und kann Hirnschäden nur in begrenztem Umfang verhindern. Bei der Thrombolyse versucht man das Blutgerinnsel (Thrombus) durch Verabreichung eines durchblutungsfördernden Medikaments (Thrombolytikum) aufzulösen, so dass das mangelhaft durchblutete Hirngewebe wieder mit Sauerstoff versorgt wird. Als Thrombolytikum wird derzeit der Plasminogenaktivator rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator) eingesetzt. Die Lyse-Therapie ermöglicht es, den Randbereich der Schädigung zu stabilisieren, eine Rückbildung im Infarktkern kann jedoch nicht erwirkt werden. Da rt-PA die Blutgerinnung für Stunden hemmt, ist diese Behandlung nicht ganz ungefährlich. Es können sekundäre Blutungen auftreten, die den neurologischen Zustand des Patienten weiterhin verschlechtern. Aufgrund des engen Zeitfensters von drei Stunden und vieler Ausschlusskriterien wie z.B. hohes Alter, schwerwiegende Vorerkrankungen, hoher Blutdruck oder Diabetes lässt sich die Thrombolysetherapie nur bei 1-6 % aller Schlaganfallpatienten anwenden (Chiu et al., 1998).

Neuroprotektion ist dagegen der Versuch mangelndurchblutete Hirnareale, wie die Penumbra vor dem Zelltod zu bewahren. Hierbei wird versucht, die nach einem Schlaganfall einsetzende ischämische Kaskade durch geeignete Pharmaka zu inhibieren. Es sind bereits zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen zur Neuroprotektion durchgeführt worden, die zum großen Teil eine Verminderung des ischämischen Zellschadens nachweisen konnten. Des Weiteren wurde von der neuroprotektiven Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren, wie z.B. des *Nerve Growth Factor* (NGF), des *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), und des Neurotrophin 3 (NT-3) berichtet.

Im Gegensatz zu den im Tierversuch erzielten Ergebnissen haben bislang sämtliche neuroprotektive Therapieansätze in klinischen Studien versagt. In über 80 klinischen

Studien mit über 30 Substanzen konnte bislang kein überzeugender neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden (Block und Schwarz, 1999). Ursachen für die konträren Ergebnisse zwischen experimentellen und klinischen Studien gibt es viele. So ist die Übertragung tierexperimenteller Daten auf den Menschen schwierig, da die verwendeten Tiermodelle nur eine grobe Annäherung an die Verhältnisse im menschlichen Organismus darstellen. Ferner lassen sich in den klinischen Studien im Gegensatz zu tierexperimentellen Untersuchungen weder die Dosis noch das enge Zeitfenster einhalten. So sind häufig die hohen Dosierungen aufgrund der auftretenden Nebenwirkungen klinisch nicht umsetzbar. Die Abweichungen zwischen Mensch und Tier könnten aber auch daher rühren, dass für experimentelle Studien häufig junge und gesunde Tiere gleichen Geschlechts verwendet wurden, während es der Kliniker mit multimorbiden, meist älteren Patienten zu tun hat. Die langanhaltende Wirkung von Pharmaka wird vermutlich zusätzlich durch spezielle Transportproteine erschwert, die auch Pharmakaresistenzen bei Tumorzellen induzieren. So konnten kürzlich Spudich et al. (2006) einen Rücktransport verabreichter Pharmaka aus der Penumbra in die Blutbahn durch das Mdr-1 Protein nachweisen. Gegenwärtig konzentrieren sich die Hoffnungen der Neuroprotektionsforschung auf die Ergebnisse einer klinischen Phase III-Studie mit dem Radikalfänger Cerovive (NXY-059) der Firma AstraZeneca.

### **1.2.5 Exogene Stammzellen beim Schlaganfall**

Aufgrund der zahlreichen fehlgeschlagenen Therapieversuche mit neuroprotektiven Substanzen am Menschen und der begrenzten Regenerationsfähigkeit endogener Stammzellen, werden derzeit große Hoffnungen auf exogene Stammzellen gesetzt. Von den ersten Erfolgen bei der Transplantation exogener Stammzellen im Tiermodell von Morbus Parkinson, Chorea Huntington und ALS wurde bereits berichtet. Im Gegensatz zu Morbus Parkinson und Chorea Huntington, bei denen eine relativ homogene Population an

Neuronen geschädigt wird, führt ein Schlaganfall zum Absterben einer Vielzahl verschiedener neuronaler Phänotypen, Oligodendrozyten, Astrozyten und Endothelzellen in unterschiedlichen Hirnregionen. Auf der Suche nach einer geeigneten Zellart, die in der Lage ist ein geschädigtes Netzwerk zu rekonstruieren und läsionsbedingte Verhaltensdefizite zu mindern, wurden bis dato eine Reihe verschiedenster Stammzelltypen getestet, so u.a. fötale Rattenzellen (Kelly et al., 2004; Mattsson et al., 1997; Grabowski et al., 1992), Precursorzellen aus der SVZ der Ratte (Zhang et al., 2003), neurale Stammzellen der Maus (MHP36; Modo et al., 2002; Veizovic et al., 2001), NT2-Zellen (Saporta et al., 1999; Borlongan et al., 1998), immortalisierte Zellen des Kleinhirns (Snyder et al., 1997), Knochenmarkszellen der Ratte (Chen et al., 2001a; Li et al., 2001) sowie humane Nabelschnurblutzellen (Boltze et al., 2005; Vendrame et al., 2004; Chen et al., 2001b). NT2-Zellen wurden bereits in klinischen Versuchen am Menschen getestet und induzierten motorische Verhaltensverbesserungen (Kondziolka et al., 2000). Eine 1998 durchgeführte Pilotstudie, bei der fötale Schweinezellen aus der Lateralen Ganglionischen Eminenz (LGE) ins Striatum transplantiert worden, wurde frühzeitig abgebrochen (Savitz et al., 2004). In der über zwei Jahre laufenden Untersuchung zeigten sich weder klare neurologische Verbesserungen, noch schwere Nebenwirkungen bei den Patienten.

Die Behandlung des Schlaganfalls erfordert die Rekonstruktion eines komplexen, neuronalen-glialen-endothelialen Netzwerks. Eine regenerative Zelltherapie sollte daher auf Zellen zurückgreifen, die ein Mindestmaß an Differenzierungsplastizität aufweisen und sowohl in Neurone und Gliazellen als auch Endothelzellen differenzieren – eine Voraussetzung, die von ES-Zellen erfüllt wird.

### 1.3 Einsatz von ES-Zellen bei neurodegenerativen Erkrankungen

Die Attraktivität von ES-Zellen ergibt sich aus ihrer unbegrenzten Kultivierbarkeit und ihrer Potenz, in Zellen jeden Gewebetyps auszdifferenzieren. Die Ausdifferenzierbarkeit in neuronale Subtypen konnte *in vitro* und *in vivo* mehrfach belegt werden (Perrier et al., 2004; Björklund et al., 2002). McKay et al. berichten sogar von einer vollständigen funktionellen Wiederherstellung im Parkinsonmodell der Ratte, nach Applikation Dopamin-produzierender Neurone, die sie aus ES-Zellen vordifferenzierten (Kim et al., 2002). Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen gibt es Hinweise auf eine funktionelle Reparatur nach Behandlung mit ES-Zellen. So berichteten Brüstle et al. (1999) von der erfolgreichen Applikation vordifferenzierter ES-Zellen der Maus in das Ratten-Tiermodell der Pelizäus-Merzbacher-Krankheit, eine Erkrankung, die auf einer defekten Myelinbildung beruht. Nach Transplantation in das Rückenmark betroffener Empfängertiere entwickelten sich die Zellen zu reifen Oligodendrozyten, wanderten ins erkrankte Gewebe ein und remyelinisierten die Axone des Empfängergewebes. MRI-Untersuchungen an Schlaganfall geschädigten Ratten, denen undifferenzierte ES-Zellen der Maus in die ungeschädigte Hemisphäre transplantiert wurden, wanderten über einen Zeitraum von zwei Wochen gezielt in Richtung Läsion, wo sie in der Randzone akkumulierten und sich vorwiegend zu Neuronen entwickelten (Hoehn et al., 2002). Kürzlich konnten nach Transplantation von bcl-2 überexprimierenden murinen ES-Zellen in die ischämisch geschädigte Zone von Rattenhirnen sogar Verbesserungen im Verhalten beobachtet werden. (Wei et al., 2005).

Bereits erwähnt wurde die Fähigkeit von ES-Zellen, *in vitro* und *in vivo* in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Diese Eigenschaft, die charakteristisch für ES-Zellen ist, führt bei immundefizienten Mäusen zur Bildung von gutartigen Tumoren (Teratomen; Thomson et al., 1998). Damit stellt die enorme Differenzierungsplastizität von ES-Zellen

gleichzeitig auch die größte Herausforderung bei der künftigen Anwendung für Zellersatztherapien dar (Erdö et al., 2003; Reubinoff et al., 2000). Trotz dieser Probleme lassen sich an ES-Zellen sämtliche grundlegende Fragestellungen einer transplantationsbasierten Zelltherapie wie Überleben, Proliferation, Migration, Differenzierung und Abstoßung besser als mit jedem anderen Typ von Stammzellen untersuchen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse sollten sich auch auf andere Stammzellen übertragen lassen.

## 1.4 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Transplantation muriner ES-Zellen in Ratten nach einem künstlich induzierten Schlaganfall. Die verwendeten EGFP<sup>+</sup> ES-Zellen wurden *in vitro* in Nestin<sup>+</sup> neurale Vorläuferzellen vordifferenziert und anschließend intrazerebral implantiert. Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen wurde die Überlebensfähigkeit und Differenzierbarkeit der transplantierten Zellen untersucht. Dabei wurde der Anteil von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten im Transplantat nach unterschiedlichen Überlebenszeiten quantitativ bestimmt. Durch die Wahl verschiedener intrazerebraler Applikationsorte sollte der Einfluss des Empfängergewebes auf das Überleben und Differenzieren der transplantierten ES-Zellen aufgezeigt werden. Das Migrationspotential der Zellen wurde durch Transplantation in die ungeschädigte, kontralaterale Hemisphäre überprüft. Letztlich wurde mit Hilfe von *Patch-Clamp*-Ableitungen untersucht, ob die transplantierten ES-Zellen in funktionsfähige Neurone und Astrozyten ausdifferenzieren.

## 2. Material und Methoden

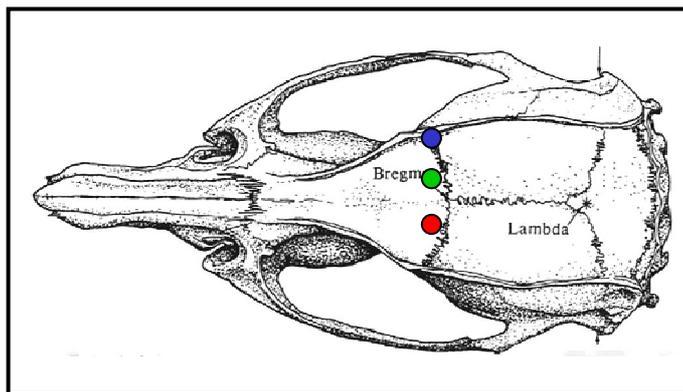
### 2.1 Methoden

#### 2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Versuchstiere wurden in einem klimatisierten Tierlabor bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden und einer Raumtemperatur (RT) von 17-21°C gehalten. Die relative Luftfeuchte betrug zwischen 45 und 65 %. Futter, in Form von Pellets („Altromin Zuchtdiät – Ratten und Mäuse“, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die fokale Ischämie sowie die Transplantationsversuche wurden an männlichen Fischer-Ratten (F344) mit einer Körpermasse von 250 – 270 g durchgeführt.

#### 2.1.2 Fokale zerebrale Ischämie

Zur Durchführung einer transienten fokalen Ischämie (eMCAO) wurden die Tiere durch eine Inhalationsnarkose bestehend aus Halothan, Distickstoffmonoxid und Sauerstoff betäubt und in einer Stereotaxie eingespannt. Nach dem Freipräparieren und Säubern der Schädeldecke wurde nach Einstellung folgender Koordinaten zu Bregma AP + 0,09; L (rechts) + 0,48 mit dem Zahnbohrer ein Loch gebohrt, ohne die Dura mater zu verletzen (Abb. 4 und 6). In eine Hamiltonspritze wurden 375 pmol des Vasokonstriktors Endothelin-1 aufgenommen und über einen Zeitraum von 5 Minuten oberhalb der mittleren Zerebralarterie (MCA; V - 0,75) injiziert (Pringle et al., 2003; Sharkey und Butcher, 1995). Nach einer Wartezeit von 5 Minuten, in der sich die Substanz weiter verteilen sollte, wurde die Wunde gesäubert und die Haut oberhalb des Schädeldaches vernäht. Während der gesamten Prozedur wurde die Körpertemperatur des Tieres rektal überwacht.



**Abb. 4: Darstellung der Schädelnähte.** Anhand vom Bregma wurden die Koordinaten zur Applikation von Endothelin (blauer Punkt) sowie zur Transplantation der neuralen Vorläuferzellen bestimmt. Bei der ipsilateralen Transplantation wurden die Zellen direkt ins nekrotische Schadensgebiet (blauer Punkt) und in die Nähe des lateralen Ventrikels appliziert (grüner Punkt). Die rote Markierung kennzeichnet den Ort der kontralateralen Transplantation (Abb. aus G. Paxinos und C. Watson, 1998)

### 2.1.3 Differenzierung neuraler Vorläuferzellen aus ES-Zellen der Maus

#### 2.1.3.1 Herstellung einer EGFP-exprimierenden ES-Zelllinie

Für die Transplantationsversuche wurden ES-Zellen der Maus verwendet, die aus C57BL/6J Mäusen isoliert wurden und das grün fluoreszierende Protein (EGFP) unter Kontrolle des  $\beta$ -Actin Promotors exprimieren (Dihné et al., 2006; Okabe et al., 1997). Die Kultivierung und Vordifferenzierung der Zellen erfolgte im Labor von Frau Prof. Schachner in Hamburg. Die Zellen wurden adhären wachsend in Kulturschalen nach Magdeburg transportiert und dann transplantiert.

#### 2.1.3.2 Kultivierung der Feeder-Zellen

Die murinen ES-Zellen wurden auf einer Schicht mitotisch inaktiver, Neomycin resistenter, embryonaler Fibroblasten gezüchtet. Die Fibroblasten wurden aus E13.5-E14.5 alten Embryonen von transgenen Mäusen gewonnen, welche die Neomycin-Phosphotransferase exprimieren (die Fibroblasten wurden freundlicherweise von Dr.

Michael Boesl, ZMNH, Hamburg, zur Verfügung gestellt). Nach Behandlung mit 10 g/l Mitomycin C (2,5-3 h) zur mitotischen Inaktivierung und dreimaligem Waschen mit PBS wurden die konfluenten Kulturen der Neomycin-resistenten Fibroblasten trypsinisiert (0,05 % Trypsin – EDTA; 0,05 % (w/v) Trypsin, 1 mM EDTA, Invitrogen) und als Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Im Zeitraum von 16 – 24 h vor Kultivierung der ES-Zellen wurden 50.000 Fibroblasten/ cm<sup>2</sup> auf gelatinierten Zellkulturschalen (0,1 % w/v) ausgesät und in MEF-Medium bei 37 °C und 7,5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **2.1.3.3 Kultivierung der ES-Zellen**

EGFP+ ES-Zellen wurden in ES-Zellmedium bei 37 °C und 7,5 % CO<sub>2</sub> auf einer Feeder-Schicht mitotisch inaktivierter embryonaler Maus-Fibroblasten kultiviert. Die EGFP+ ES-Zellen wuchsen in scharf voneinander abgegrenzten Sphären und wurden subkultiviert, bevor sich einzelne Sphären berührten. Das Medium wurde täglich gewechselt. Für die Subkultivierung wurden die Zellen in PBS gewaschen und für 3 Minuten bei 37 °C trypsinisiert (Trypsin-EDTA; 0,25 % (w/v) Trypsin, 1 mM EDTA). Anschließend wurden die ES-Zellen dissoziiert und 1:2 bis 1:5 ausgesät. Zur Kryokonservierung wurden die ES-Zellen in 20 % DMSO-haltigen ES-Zellmedium aufgenommen, langsam auf –80 °C herabgekühlt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

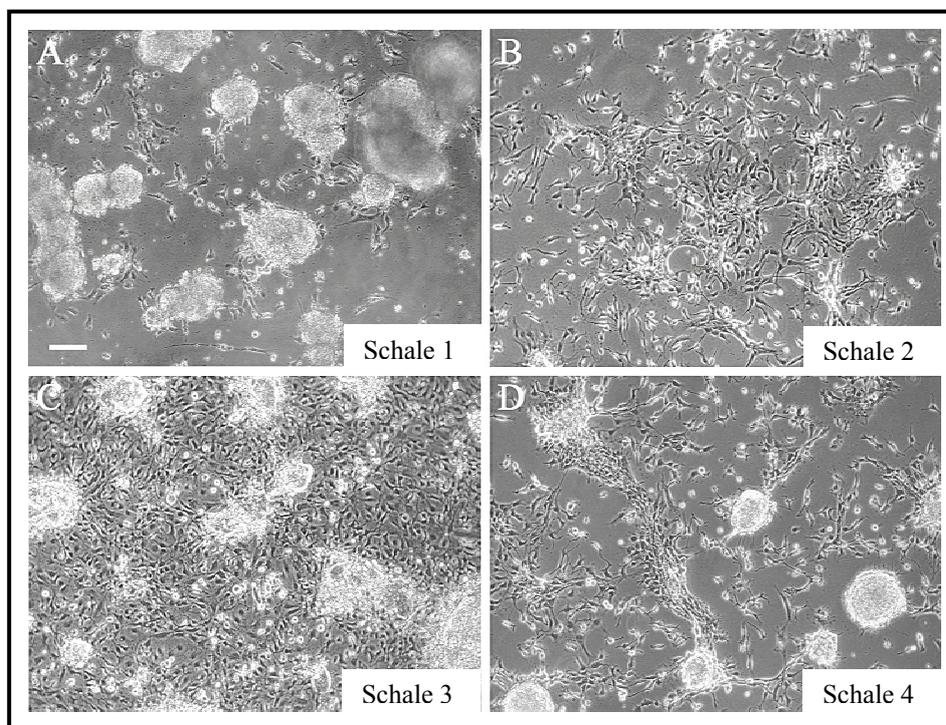
### 2.1.3.4 Neurale Differenzierung der ES-Zellen

Als ES-Zelllinie wurde die EGFP+ ES-Zelllinie aus dem Labor von Prof. Schachner (ZMNH, Hamburg) verwendet. Die Differenzierung der ES-Zellen in neurale Vorläuferzellen erfolgte über ein 5 Stadien umfassendes, leicht modifiziertes Differenzierungsprotokoll nach Okabe et al. (1996) bzw. Lee et al. (2000).

- Stadium 1:* Expansion der undifferenzierten ES-Zellen in ES-Zellmedium auf Gelatine-beschichteten Kulturplatten ohne Feeder-Zellen
- Stadium 2:* Erzeugung frei-schwimmender *Embryoid bodies* in einer Suspensionskultur in ES-Zellmedium  $\emptyset$  LIF (4 d)
- Stadium 3:* Selektion der neuralen Vorläuferzellen in ITSFn-Medium
- Stadium 4:* Expansion der neuralen Vorläuferzellen in mN3-FGF-2-Medium
- Stadium 5:* Induktion der Differenzierung durch Wachstumsfaktorentzug

Zu Beginn wurden die undifferenzierten ES-Zellen (Stadium 1) auf einer Schicht Mitomycin-behandelter Fibroblasten in Gelatine-beschichteten Kulturschalen kultiviert. Als Kultivierungsmedium diente ES-Zellmedium, das 1.000 U/ ml des *leukemia inhibitory factors* (LIF) enthielt. Zum Passagieren wurden die ES-Zellen abgelöst und mit Trypsin-Lösung (0,25 % Trypsin/ 0,04 % EDTA in HBSS<sup>-</sup>) vereinzelt. In Suspensionskultur in einer Konzentration von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/  $\text{cm}^2$  auf nicht-adhärenenten Bakterienschalen und in Abwesenheit von LIF (ES  $\emptyset$  LIF) bildeten die ES-Zellen spontan *Embryoid bodies* (Stadium 2). Nach 4 d wurden neurale Vorläuferzellen (Nestin+) in ITSFn-Medium über einen Zeitraum von 8 d selektiert (Stadium 3). Die selektierten neuralen Vorläuferzellen wurden in Kulturschalen für 4 – 7 d unter folgenden Bedingungen expandiert (Stadium 4): die Zellen wurden auf mit 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Poly-L-ornithin (PLO) und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Laminin vorbeschichteten Platten in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/  $\text{cm}^2$  in DMEM/ F12-Medium

mit 2 % B-27, 2 mM L-Glutamin, Penicillin 50 U/ ml, Streptomycin 50 µg/ ml und 20 ng/ ml FGF-2 (mN3-FGF-2) ausgesät. Dieses Medium unterscheidet sich vom Stadium 4-Medium (mN3FL), welches von Lee et al. (2000) beschrieben wurde, durch das Fehlen von PDGF und Laminin und durch den Ersatz von Insulin, Transferrin, Selenium, Progesteron und Putrescin durch B-27. Zur Induktion der Differenzierung (Stadium 5) wurde FGF-2 nach 4 – 7 d aus der Kultur entfernt und die Zellen über einen Zeitraum von 3 – 14 d weiterkultiviert.

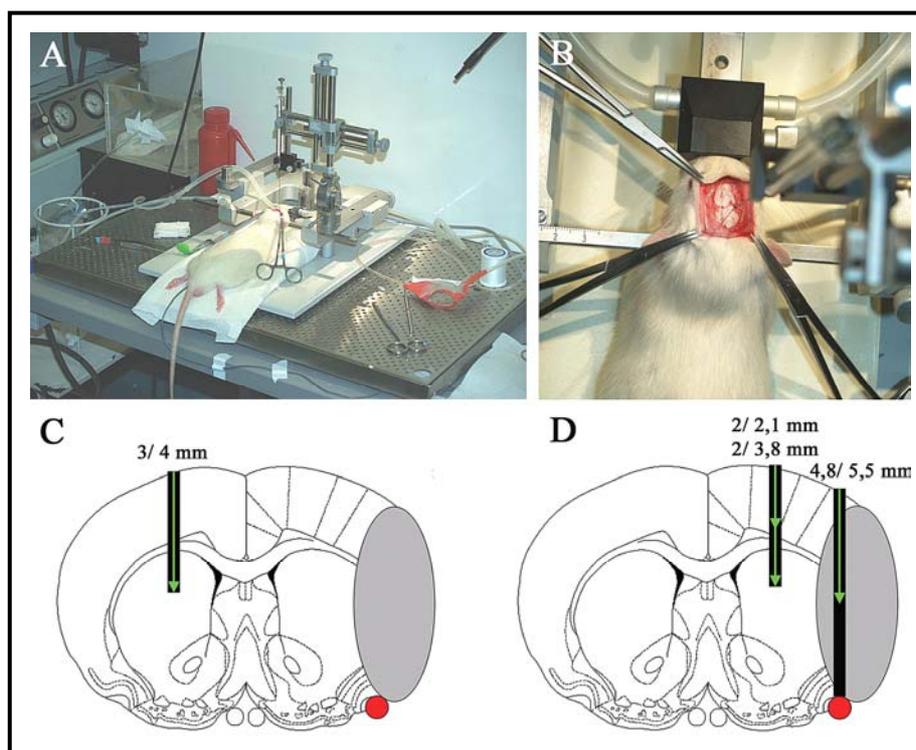


**Abb. 5: Phasenkontrastaufnahmen der vordifferenzierten ES-Zellen.** Die Abb. A-D zeigen die neuronalen Vorläuferzellen kurz vor dem Ablösen durch Trypsinisierung und anschließender Transplantation. Die Bilder stammen von 4 unterschiedlichen Kulturschalen (Maßstab 100 µm).

#### 2.1.4 Transplantation von Nestin+ ES-Zellen aus der Maus

Am Tag der Transplantation wurden die Nestin+/ EGFP+ ES-Zellen (Abb. 5) dissoziiert und in einer Dichte von 50.000 Zellen/ µl in HBSS<sup>-</sup> Medium resuspendiert. Sieben Tage nach der fokalen Ischämie wurden je 100.000 Zellen an unterschiedlichen Orten des Rattenhirns stereotaktisch appliziert (Abb. 4 und 6A, B). Bei der ipsilateralen

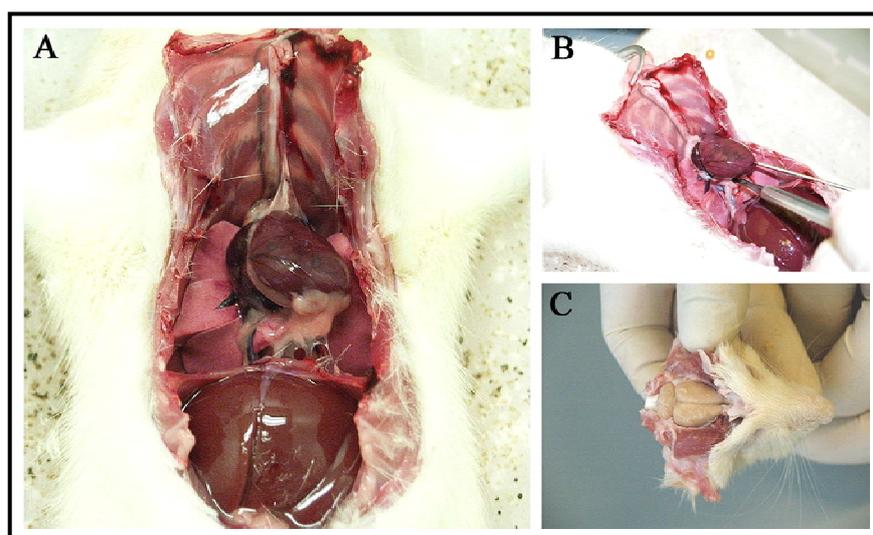
Transplantation wurden die ES-Zellen einerseits direkt ins nekrotische Schadensgebiet (AP + 0,09; L + 0,48; V - 0,55) transplantiert und andererseits in die Nähe des Schadens oberhalb (AP + 0,09; L + 0,20; V - 0,21) und unterhalb (AP + 0,09; L + 0,20; V - 0,38) des Corpus Callosums (Abb. 6D). Bei der kontralateralen Transplantation wurden die ES-Zellen stereotaktisch ins Striatum der ungeschädigten Hemisphäre (AP + 0,09; L - 0,3; V - 0,4) appliziert (Abb. 6C). Um eine Abstoßung der transplantierten Zellen zu verhindern, wurden die Tiere mit Cyclosporin A (CsA, Novartis, 10 mg/ ml, i.p.) immunsupprimiert, wobei CsA erstmalig einen Tag vor Transplantation verabreicht wurde. Vier Wochen nach der Transplantation zu einem Zeitpunkt, bei dem die wesentlichen Immunreaktionen größtenteils abgeklungen sind, erhielten die Tiere CsA nur noch jeden 2. Tag.



**Abb. 6: Darstellung der stereotaktischen Applikation des Vasokonstriktors Endothelin und der neural vordifferenzierten ES-Zellen.** Zur Auslösung einer transienten Okklusion der mittleren Zerebralarterie (MCA) wurden die Ratten in eine Stereotaxie eingespannt (A) und der Vasokonstriktor Endothelin in die Nähe der MCA (B) appliziert. Auf die gleiche Weise wurden auch die ES-Zellen transplantiert, die entweder kontralateral (C) in die ungeschädigte Hemisphäre oder direkt in das Schadensgebiet bzw. ins anliegende Striatum (D) appliziert wurden.

### 2.1.5 Entnahme und Fixierung der Gehirne

Die Versuchstiere wurden 1, 4 und 12 Wochen nach der Transplantation mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M PBS perfundiert. Dazu wurden die Tiere vorher mit Chloralhydrat tief narkotisiert. Der Brustraum wurde unterhalb des Sternums geöffnet und das Herz freigelegt (Abb. 7A). Nach einem Schnitt in die linke Herzkammer wurde eine Kanüle bis in die Aorta vorgeschoben und festgeklemmt (Abb. 7B). Anschließend wurde ein kleiner Schnitt durch die Wand des rechten Vorhofes gesetzt, so dass das Blut während der Systole deutlich sichtbar herausspritzte. Mit Hilfe einer Pumpe wurde eine 0,1 M PBS-Lösung durch das Gefäßsystem der Ratte gepumpt. Nachdem das Blut vollständig aus den Gefäßen gespült war, wurde mit 200 ml PFA fixiert. Die Versuchstiere wurden dekapitiert und die Haut vorsichtig bis zu den Augen vom Schädeldach abgelöst. Mit einer kleinen Schere wurden die Schädelknochen vorsichtig vom Hinterhaupt ausgehend geöffnet und mit einer Pinzette vorsichtig entfernt. Anschließend wurde die Dura mater durchtrennt, das freiliegende Gehirn aus dem Schädel herauspräpariert (Abb. 7C) und für 24 Stunden in PFA nachfixiert.



**Abb. 7: Fixierung der Rattenhirne durch Perfusion mit Paraformaldehyd.** Nach Öffnung des Brustraumes wurde das Herz freigelegt (A) und eine Kanüle bis in die Aorta vorgeschoben (B). Nachdem die Gefäße des Tieres mit PBS durchspült und das Hirn anschließend mit 4 % PFA fixiert wurde, konnte es freigelegt und herauspräpariert werden (C).

### 2.1.6 Nachbehandlung der Gehirne

Nach der Fixierung wurden die Gehirne zum Gefrierschutz und zur besseren Strukturhaltung in 30 %ige Saccharose eingelegt. Nach dem Absinken wurden sie bei -80 °C über Methylbutan eingefroren. Am Kryotom (Fa. Leica) wurden 20 µm dicke Schnitte angefertigt und jeder 6. Schnitt zur Bestimmung der Größe des Transplantats ausgemessen. Die restlichen Hirnschnitte wurden bis zur immunhistochemischen Aufarbeitung in einer Kryoprotektionslösung (CPS-Lösung) bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.1.7 Färbung der Kryoschnitte mit Toluidinblau

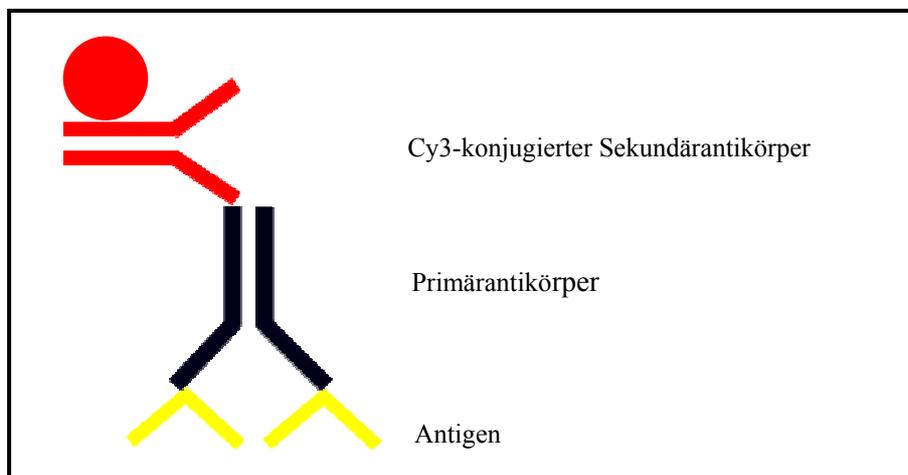
Hirnschnitte, die für die weitere Auswertung interessant erschienen, wurden für eine Übersichtsfärbung mit Toluidinblau gefärbt (Nissl-Färbung). Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 % - 100 %), Optal und Xylol entwässert und fixiert. Die Eindeckelung erfolgte mit Histomount. Sowohl geschädigte Neurone als auch transplantierte Zellen werden bei einer Nissl-Färbung intensiv blau gefärbt. Letztere unterscheiden sich jedoch deutlich durch ihre Zellgröße von geschädigten Neuronen. Ungeschädigte Neurone erscheinen dagegen in einem helleren Blauton mit abgesetztem Zellkern.

**Tab. 1: Toluidinblau Färbung**

Aqua dest.	1 min
Toluidinblau	10 min
Aqua dest.	kurz spülen
Ethanol 50 %	5 min
Ethanol 70 %	5 min
Ethanol 90 %	5 min
Ethanol 100 %	5 min
Optal (2-Propanol)	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min

### 2.1.8 Immunhistochemie

Um die Differenzierung der transplantierten Zellen zu verfolgen, wurden sie mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die immunhistochemische Färbung der Coronalschnitte erfolgte mit der indirekten Methode (Abb. 8). Dafür wurden die frei flottierenden Schnitte zu Beginn fünfmal für je 3 Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 10 % Eselserum in PBS/ Triton X 100 0,5 % geblockt. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C in PBS mit 3 % Eselserum. Zum Nachweis proliferierender Zellen mit einem Antikörper gegen Ki-67 war vor Inkubation des Primärantikörpers eine Vorbehandlung der Schnitte notwendig. Hierzu wurden die Antigene in 70 °C heißem Natriumcitratpuffer (pH 6.0) für 30 Minuten demaskiert („retrieval“). Zum Nachweis von Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten, neuronalen Vorläuferzellen, proliferierenden Zellen, FGF-2-exprimierenden Zellen (FGF-2+) und Makrophagen wurden die in der Tabelle 2 aufgeführten Antikörper eingesetzt.



**Abb.8: Detektion der zellspezifischen Antigene mit konjugierten Sekundärantikörpern**

**Tab. 2: Übersicht verwendeter Primärantikörper**

<b>Zelltyp</b>	<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>Neurone</b>	Maus anti-Neuronaler Nucleus (NeuN)	1:200
	Maus anti- $\beta$ III-Tubulin	1:1000
	Ziege anti-Doublecortin (DCX)	1:300
	Kaninchen anti-Neurofilament 200 (NF-200)	1:200
	Maus anti-Synaptisches Vesikelprotein (SV2)	1:200
	Ziege anti-Cholin-Azetyltransferase (ChAT)	1:100
	Kaninchen anti-Glutamat-Decarboxylase (GAD65/67)	1:500
	Kaninchen anti-Serotonin	1:160
	Kaninchen anti-Substanz P	1:200
	Kaninchen anti-Dopamin regulierendes Phosphoprotein (DARPP32)	1:50
	Maus anti-Parvalbumin	1:1000
	Kaninchen anti- $\text{Na}_v$ 1.1 und $\text{Na}_v$ 1.2 (2 Natriumkanal-Typen)	1:500
	<b>Astrozyten</b>	Maus anti-GFAP (saures Gliafaserprotein)
Ziege anti-S100 $\beta$		1:5000
<b>Oligodendrozyten</b>	Maus anti-Cyclische Nucleotid-Phosphodiesterase (CNPase)	1:1000
<b>neurale Vorläuferzellen</b>	Maus anti-Nestin	1:200
	Kaninchen anti-NG2	1:200
<b>proliferierende Zellen</b>	Kaninchen anti-Ki-67	1:40
<b>FGF-2+ Zellen</b>	Maus anti-FGF-2	1:200
<b>Makrophagen</b>	Maus anti-ED1	1:200

Im Anschluss daran wurden die Schnitte fünfmal für je 3 Minuten in PBS gewaschen und mit verschiedenen Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern für 2 h bei RT inkubiert (Tab. 3).

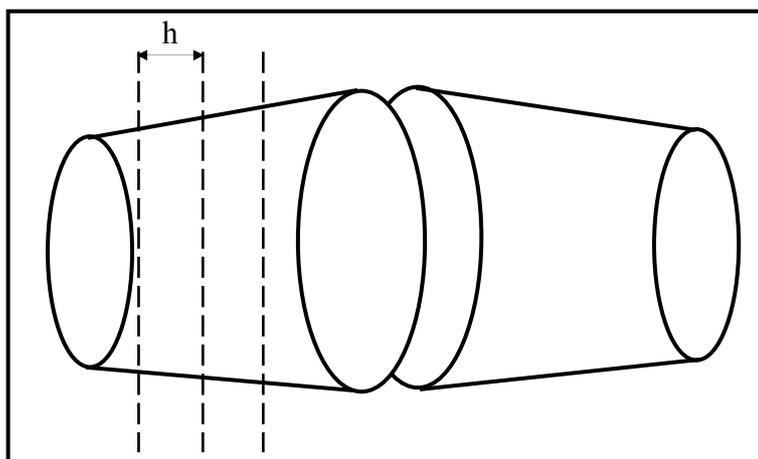
**Tab. 3: Übersicht verwendeter Sekundärantikörper**

Antikörper	Verdünnung
Esel anti-Maus Cy3	1:500
Esel anti-Ziege Cy3	1:500
Esel anti-Kaninchen Cy3	1:500

Um überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Schnitte abschließend nochmals dreimal für je 3 Minuten gewaschen und die Zellkerne mit DAPI (1:15.000) gegengefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden auf Objektträger (Super Frost) aufgezogen und über Nacht bei RT getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %) dehydriert und das Gewebe mit einem Deckgläschen und dem Eindeckmedium DPX versiegelt. Zur Überprüfung der Spezifität der Antikörperbindung wurden Negativkontrollen mitgeführt, bei denen der Primärantikörper nicht appliziert wurde. Durch die fehlende Inkubation des Primärantikörpers konnte der Sekundärantikörper nicht gebunden werden, wodurch keine Anfärbung stattfand.

### 2.1.9 Transplantatgröße und Quantifizierung doppelmarkierter Zellen

Zur Bestimmung der Transplantatgröße 1, 4 und 12 Wochen nach Transplantation wurde jeder 6. coronale Hirnschnitt pro Tier am Mikroskop bei 5facher Vergrößerung mittels Axiovision-Software (Fa. Zeiss) ausgemessen und dokumentiert. Das Volumen des Transplantats wurde anhand der Formel für 2 abgestumpfte Kegel bestimmt:  $V = A_1 + 2A_2 + 2A_3 + \dots + A_n) / 2 \times h$ , wobei  $A_1, A_2, A_3 \dots$  der Fläche des Transplantats pro Hirnschnitt entspricht und  $h$  der Abstand zwischen 2 ausgemessenen Schnitten, also 120  $\mu\text{m}$  ist.



**Abb. 9: Berechnung der Transplantatgröße anhand des Volumens für 2 abgestumpfte Kegel.** Jeder 6. Hirnschnitt mit einer Schnittdicke von  $20\ \mu\text{m}$  wurde mikroskopisch ausgemessen. Der Abstand  $h$  zwischen 2 Hirnschnitten betrug  $120\ \mu\text{m}$ .

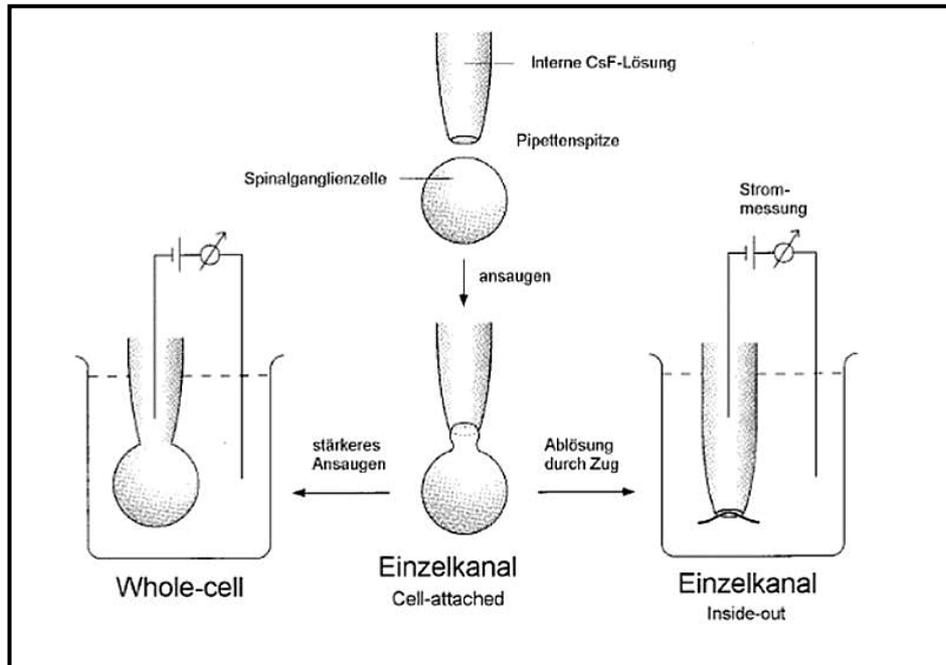
Die Anzahl der vom Transplantat gebildeten Neurone und Astrozyten wurde 1, 4 und 12 Wochen nach der Transplantation mit Hilfe des neuronalen Markers NeuN und des Astrozyten-Markers GFAP bestimmt. Auf einer Fläche von  $0,04\ \text{mm}^2$  ( $200\ \mu\text{m} \times 200\ \mu\text{m}$ ) wurden alle doppelmarkierten Zellen (NeuN+/ EGFP+ bzw. GFAP+/ EGFP+) quantifiziert. Dafür wurden pro Tier Coronalsschnitte mit je 3 unterschiedlichen Regionen sowohl im Zentrum des Transplantats als auch in der Peripherie ausgezählt. Am Schluss wurde der Prozentsatz doppelmarkierter Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl EGFP+ Zellen bestimmt. Zusätzlich wurde der Anteil an Neurotransmitter bildenden EGFP+ Zellen 4 Wochen nach Transplantation quantifiziert. Ausgezählt wurden EGFP+ Zellen, die Cholin-Azetyltransferase (ChAT), Serotonin, Substanz P und DARPP32 exprimierten. Da Transmitter bildende EGFP+ Zellen nicht im gesamten Transplantat vorhanden waren, wurde nur in Bereichen quantifiziert, in denen die doppelmarkierten Zellen in höherer Dichte auftraten. Die Quantifizierung GABAerger Neurone (GAD65/67+) war aufgrund der starken Signalverteilung in den transplantierten Zellen nicht möglich (Abb. 19A).

### 2.1.10 Elektrophysiologische Ableitung

Um die Zellen des Transplantats elektrophysiologisch zu charakterisieren, wurden die transplantierten Ratten in das Physiologische Institut der Justus Liebig Universität Gießen gebracht und im Labor von Dr. Andreas Scholz untersucht. Zum Nachweis der elektrophysiologischen Aktivität transplantiertener neuraler Vorläuferzellen wurde eine hochauflösende Form der *Patch-Clamp*-Technik (Scholz und Vogel, 2000; Hamill et al., 1981) angewandt. Mit der von Neher und Sakmann (1976) entwickelten *Patch-Clamp*-Technik wird an eine sehr kleine Membranfläche (patch) eine vorgegebene Spannung (*Voltage-Clamp*) angelegt. Der Strom, der dann durch diese Membranfläche fließt, wird gemessen. Durchgeführt wird diese Messung, indem man eine Glaspipette mit einer Spitze von weniger als einem tausendstel Millimeter (wenige  $\mu\text{m}^2$ ) auf die Zellmembran aufsetzt. Über einen Unterdruck wird ein dichter, mechanisch stabiler und elektrisch hochohmiger Kontakt zwischen der Glaspipette und der Zellmembran geschaffen. Das Ergebnis ist eine Abdichtung (Seal) mit einem sehr hohen Widerstand (Gigaseal) zwischen dem Pipetteninneren und dem Außenmedium. In dieser sogenannten *Cell-attached*-Konfiguration kann jeder Strom, der nun durch einen innerhalb des Membranstücks gelegenen Ionenkanal fließt, detektiert werden. Der hohe Abdichtwiderstand verringert zudem das elektrische Rauschen.

Die Experimente dieser Arbeit wurden in der *Whole-cell*-Konfiguration durchgeführt, die durch das Anlegen eines weiteren Unterdrucks am Pipettenende bzw. durch kurze Pulse elektrischer Spannung an der Pipetten-Elektrode zu einem Öffnen der Zellmembran und zu einem Zusammenfließen von Cytosol und Pipettenlösung führt (Abb. 10). Der Patch wird daraufhin zwar geöffnet, das Gigaseal bleibt jedoch intakt. In der *Whole-cell*-Konfiguration können Ströme der gesamten Zellmembran abgeleitet werden. Sowohl die *Cell-attached*- als auch die *Whole-cell*-Konfiguration sind zellgebundene Patchformen, die sich von den zellfreien Techniken *Inside-out* und *Outside-out* darin unterscheiden, dass bei letzteren das

Membranstück durch leichtes Zurückziehen der Pipette von der Zellmembran abgelöst wird.



**Abb. 10: Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik.** Durch Anlegen eines Unterdrucks wird ein Teil der Zellmembran in die Pipettenspitze eingesaugt (*Cell-attached*) und eine undurchlässige Verbindung zwischen Glaswand und Membran erzeugt. Der hohe Abdichtwiderstand zwischen Patch-Elektrode und Badlösung in der Größenordnung von mehreren Gigaohm wird als Gigaseal bezeichnet. Die Ionenkanäle erzeugen ständig einen Strom, der nun messbar wird. In der *Whole-cell*-Konfiguration wird der Membranbereich unter der Pipette durch stärkeres Ansaugen durchbrochen und eine direkte Verbindung zwischen der Elektrolytlösung der Pipette und dem Cytosol hergestellt. Bei dieser Methode wird der Strom über der ganzen Zellmembran erfasst. Bei der *Inside-out* Methode wird das Membranstück von der Zellmembran abgelöst. Auf diese Weise lassen sich Kanaleigenschaften gut untersuchen.

Im Zeitraum von 3 bis 7 Wochen nach Transplantation wurden die Tiere mit Halothan narkotisiert und daraufhin dekapitiert. Die Hirnentnahme erfolgte wie bereits unter Punkt 2.1.5 beschrieben. Mit Hilfe eines Vibroslicers (Leica VT 1000S) wurden 150 – 200  $\mu\text{m}$  dicke Hirnschnitte angefertigt, die während der Präparation in eiskalter extrazellulärer Lösung (2 – 6 °C; Scholz, et al., 1998; Takahashi, 1990) aufbewahrt und anschließend in 2 % (w/v) Agar (ca. 40 °C) eingebettet wurden. Auf diese Weise war es möglich, die Coronalschnitte für mehr als 12 h bei RT vital zu halten. Unter Zuhilfenahme eines inversen Mikroskops (Axopatch, Zeiss) wurden die Hirnschnitte auf transplantierte Zellen hin durchmustert und die Patch-Pipette vor der Zellmembran genaustens positioniert. Dabei diente das vom Transplantat exprimierte grün fluoreszierende Protein (EGFP) zur Identifizierung der transplantierten Zellen im Empfängergewebe.

Die extrazelluläre Lösung (Badlösung), ein Bicarbonatpuffer-System, wurde in der in Tabelle 4 aufgelisteten Zusammensetzung verwendet. Durch die fortlaufende Begasung der extrazellulären Lösung mit 5 %  $\text{CO}_2$  / 95 %  $\text{O}_2$  wurde ein neutraler pH-Wert von 7,3 – 7,4 eingestellt, wobei die Endkonzentration von Natrium [ $\text{Na}^+$ ] 141 mM betrug. Die Zusammensetzung der Kalzium-armen Lösung entsprach bis auf  $\text{MgCl}_2$  mit 5 mM und dem Fehlen von 2,2 mM  $\text{CaCl}_2$  der extrazellulären Lösung.

**Tab. 4: Zusammensetzung der extrazellulären Lösung**

Substanz	Konz. in mM
NaCl	115
KCl	5,6
$\text{MgCl}_2$	1
Glucose	11
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1
$\text{NaHCO}_3$	25
$\text{CaCl}_2$	2,2

Als Pipettenlösung wurde eine dem intrazellulären Ionenniveau entsprechende Lösung verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 5 aufgezeigt ist.

**Tab. 5: Zusammensetzung der intrazellulären Lösung (pH 7.3)**

Substanz	Konz. in mM
KCl	18
K-Aspartat	100
CaCl <sub>2</sub>	1
MgCl <sub>2</sub>	3
Na <sub>2</sub> -adenosin 5'-triphosphat	2
Na <sub>3</sub> -guanosin 5'-triphosphat 0.1	0,1
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-aminoethyl äther) N,N,N',N',-tetra-Essigsäure)	10
HEPES	10
NaOH (zur pH-Wert Einstellung)	10
KOH (zur pH-Wert Einstellung)	27

Der pH-Wert der intrazellulären Lösung wurde durch Zugabe von NaOH (10 mM) und KOH (27 mM) auf 7.3 eingestellt. Zur pharmakologischen Charakterisierung der Natrium- bzw. Kaliumströme wurden elektrophysiologische Untersuchungen mit Tetrodotoxin (TTX, Latoxan, 0,1 μM), einem Natriumkanalblocker, und Tetraethylammonium (TEA, 10 mM), einem Kaliumkanalblocker, durchgeführt. Beide Kanalblocker wurden über die extrazelluläre Lösung appliziert.

Die *Patch-Clamp*-Pipetten, mit einem Widerstand von 2,5 – 5,5 MΩ wurden aus Borosilikatglas (GC 150, Clark Electromedical Instruments) mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm an einem Horizontal-Ziehgerät (P-97, Sutter Instrument Company, USA) gezogen. Die *Patch-Clamp*-Untersuchungen wurden mit dem Verstärker Axopatch 200A (Axon Instruments, Sunnyvale, CA, USA; Scholz und Vogel, 2000; Scholz et al., 1998; Hamill et al., 1981) bei 22-24 °C aufgezeichnet. Die Einzeldaten der Aktivierungs- und

Inaktivierungskurven wurden mit der Boltzmann Verteilung angepasst (Scholz et al., 1998). Die statistische Signifikanz der Daten (definiert als  $p < 0.05$ ) wurde mit dem Students-t Test überprüft. Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (S.E.M.).

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Laborinstrumente und Geräte

**C. Gerhardt GmbH & Co. KG:** Laborschüttler „Thermoshake“  
(Königswinter, Deutschland)

**Carl Zeiss:** Zeiss LSM 5 Pascal Konfokales Laserscanmikroskop  
(Jena, Deutschland) Zeiss Axiovert 200 Inverses Fluoreszenzmikroskop

**Heidolph Instruments GmbH & Co. KG:** Magnetrührer MR3000 mit Heizung  
(Schwabach, Deutschland)

**Heraeus Instruments GmbH:** Biofuge 13  
(Hanau, Deutschland) Biofuge Stratos  
Brutschrank Typ B6

**Knick GmbH & Co. KG:** Labor-pH-Meter 766  
(Berlin, Deutschland)

**Leica Instruments:** Leica CM3050-Kryostat  
(Nussloch, Deutschland)

**Sartorius AG:** Analysewaage PT 310  
(Göttingen, Deutschland) Analysewaage BR 211 D

### 2.2.2 Chemikalien

<b>Carl Roth GmbH &amp; Co. KG:</b>	D-(+)-Saccharose
(Karlsruhe, Deutschland)	2-Methylbutan
	Glycerin
	Ethylenglykol
	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
	di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
	Triton X 100
	Rotisol
	Optal (2-Propanol)
	Xylol
<b>Eurim-Pharma Arzneimittel GmbH:</b>	Halothan
(Piding, Deutschland)	
<b>Fluka Chemie GmbH:</b>	Natriumchlorid
(Buchs, Schweiz)	DPX Mountant for histology (Einbettmedium)
<b>Linde Gas Therapeutics GmbH &amp; Co. KG:</b>	Medizinisches Distickstoffmonoxid
(Unterschleissheim, Deutschland)	Medizinischer Sauerstoff
<b>Merck KG:</b>	Salzsäure (HCl)
(Darmstadt, Deutschland)	Paraformaldehyd (PFA)

**Novabiochem AG:** Endothelin-1

(San Diego, CA, USA)

**Novartis Pharma GmbH:** Sandimmun Optoral Lösung (Cyclosporin A)

(Nürnberg, Deutschland)

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH:** Natriumcitrat

(Steinheim, Deutschland)

**Shandon:** Histomount

(Pittsburgh, PA, USA)

### 2.2.3 Antikörper

**Abcam:** Polyklonaler Antikörper (IgG) Kaninchen anti-Ki-67

(Cambridge, UK) Monoklonaler Antikörper (IgG) Maus anti-CNPase

**Acris:** Polyklonaler Antikörper (IgG) Kaninchen anti-DARPP32

(Hiddenhausen, Deutschland)

**Alomone Laboratories:** Polyklonaler Antikörper (IgG) Kaninchen anti-Na<sub>v</sub>1.1

(Jerusalem, Israel) Polyklonaler Antikörper (IgG) Kaninchen anti-Na<sub>v</sub>1.2

**BD Transduction Laboratories:** Monoklonaler Antikörper (IgG) Maus anti-Nestin  
(San Jose, CA, USA)

**Biomol:** Monoklonaler Antikörper (IgG) Maus anti-FGF-2  
(Hamburg, Deutschland)

**Chemicon International:** Monoklonaler Antikörper (IgG) Maus anti-GFAP  
(Temecula, CA, USA) Monoklonaler Antikörper (IgG) Maus anti-NeuN  
Monoklonaler Antikörper (IgG) Maus anti-ED1  
Monoklonaler Antikörper (IgG) Maus anti-Parvalbumin  
Polyklonaler Antikörper (IgG) Ziege anti-ChAT  
Polyklonaler Antikörper (IgG) Kaninchen anti-NG2

**Developmental Hybridoma Bank:** Monoklonaler Antikörper (IgG) Maus anti-SV2  
(Iowa, USA)

**Dianova:** Cy3 konjugierter Antikörper (IgG) Esel anti-Maus  
(Hamburg, Deutschland) Cy3 konjugierter Antikörper (IgG) Esel anti-Ziege  
Cy3 konjugierter Antikörper (IgG) Esel anti-Kaninchen

**Mo Bi Tec:** DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol,dihydrochlorid)  
(Göttingen, Deutschland)

**Promega:** Monoklonaler Antikörper (IgG) Maus anti- $\beta$ III-Tubulin  
(Mannheim, Deutschland)

**Santa Cruz Biotechnology:** Polyklonaler Antikörper (IgG) Ziege anti-DCX  
(Santa Cruz, CA, USA)

**Sigma:** Polyklonaler Antikörper (IgG) Kaninchen anti-NF-200  
(Deisenhofen, Deutschland) Polyklonaler Antikörper (IgG) Ziege anti-GAD65/67

**Swant:** Polyklonaler Antikörper (IgG) Kaninchen anti-S100β  
(Bellinzona, Schweiz)

**Zymed:** Polyklonaler Antikörper (IgG) Kaninchen anti-Serotonin  
(Berlin, Deutschland) Polyklonaler Antikörper (IgG) Kaninchen anti-Substanz P

#### 2.2.4 Lösungen

**PBS** 137 mM NaCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4)

**30 % Saccharose** 30 %ige Lösung mit D-(+)-Saccharose in PBS

**4 % PFA** 4 %ige Lösung mit Paraformaldehyd in PBS

**CPS-Lösung** Glycerin, Ethylenglykol, PBS

### 2.2.5 Zellkulturmedien

Die aufgeführten Medien wurden für die Kultivierung der ES-Zellen benutzt. Die Medien wurden von Invitrogen bezogen und wie folgt angereichert:

<b>CHO-Zellmedium:</b>	Dulbecco's MEM (DMEM)
angereichert mit:	10 % (v/v) Fötalem Kälberserum (FKS)
	50 U/ ml Penicillin/ Streptomycin
	1 mM Natriumpyruvat
	2 mM L-Glutamin
<b>ES-Zellmedium:</b>	Dulbecco's MEM (DMEM, 4.5 g/ l D-Glucose, 25 mM HEPES, 0,58 g/ l L-Glutamin, kein Natriumpyruvat)
angereichert mit:	15 % (v/v) FKS (Perbio, Erembodegem, Belgien)
	2 mM L-Glutamin
	1 × MEM nicht essentielle Aminosäuren
	1 mM Natriumpyruvat
	1 × Nucleosidmix (bestehend aus je 3 mM Adenosin, Cytidin, Guanosin, Uridin und Thyminid in PBS)
	0,1 mM 2-Mercaptoethanol
	1.000 U/ ml LIF (ESGRO™ LIF) (Chemicon, Temecula, CA, USA)
	50 U/ ml Penicillin
	50 µg/ ml Streptomycin
<b>ES-Zellmedium Ø LIF:</b>	ES-Zellmedium ohne ESGRO™ LIF

<b>ES-Selektionsmedium:</b>	ES-Zellmedium
angereichert mit:	250 µg/ ml G418 (Geneticin; Invitrogen)
<b>ITSFn-Medium:</b>	DMEM/ Ham's F12 (DMEM/ F12; 1:1)
angereichert mit:	5 µg/ ml Insulin
	50 µg/ ml Transferrin
	30 nM Natriumselenit
	5 µg/ ml Fibronectin
	2 mM L-Glutamin
	50 U/ ml Penicillin
	50 µg/ ml Streptomycin
<b>MEF-Medium:</b>	DMEM (4,5 g/ l D-Glucose, mit Glutamax™ I, kein Pyruvat; Invitrogen)
angereichert mit:	9 % FKS
	1 × MEM nicht-essentielle Aminosäuren
	50 U/ ml Penicillin
	50 µg/ ml Streptomycin
<b>mN3:</b>	DMEM/ F12
angereichert mit:	1 × B27 (Invitrogen)
	2 mM L-Glutamin
	50 U/ ml Penicillin
	50 µg/ ml Streptomycin

**mN3-FGF-2:** mN3

angereichert mit: 20 ng/ ml FGF-2 (PreproTech, Rocky Hill, NY, USA)

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Überleben und Volumen der Transplantate 1, 4 und 12 Wochen nach Transplantation**

##### **3.1.1 Überleben der Transplantate**

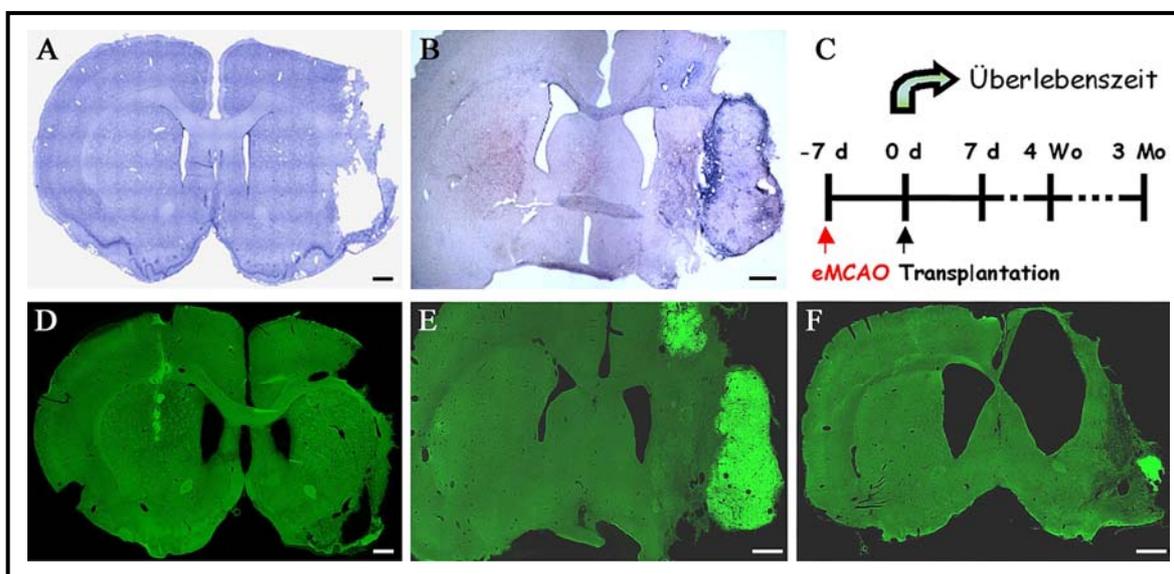
Die *in vitro* vordifferenzierten Nestin<sup>+</sup> neuronalen Vorläuferzellen exprimierten in ihrem Cytoplasma das grün fluoreszierende Protein (EGFP), wodurch sie nach der Transplantation im Empfängergewebe detektiert werden konnten. Bei der ipsilateralen Transplantation wurden die Nestin<sup>+</sup>/EGFP<sup>+</sup> neuronalen Vorläuferzellen 1 Woche nach eMCAO direkt ins Infarktgebiet (laterales Transplantat) und in die Nähe des lateralen Ventrikels oberhalb und unterhalb des Corpus Callosums transplantiert (Abb. 6D). Da sich letztere 4 Wochen nach Transplantation miteinander vermischt hatten, war eine Abgrenzung der oberhalb bzw. unterhalb des Corpus Callosums transplantierten EGFP<sup>+</sup> Zellen nicht mehr möglich, so dass im Folgenden nur vom medialen Transplantat gesprochen wird. Bei der kontralateralen Transplantation wurden die neuronalen Vorläuferzellen ebenfalls 1 Woche nach eMCAO in die ungeschädigte kontralaterale Hemisphäre unterhalb des Corpus Callosums transplantiert (Abb. 6C).

Pro Injektionsort wurden jeweils 100.000 Zellen verabreicht, so dass in die geschädigte ipsilaterale Hemisphäre insgesamt 300.000 Zellen (laterales Transplantat: 100.000 Zellen, mediales Transplantat: 200.000 Zellen) und in die ungeschädigte, kontralaterale Hemisphäre insgesamt 100.000 Zellen transplantiert wurden.

Vier Wochen nach der ipsilateralen Transplantation wurden die EGFP<sup>+</sup> Zellen in 10 von insgesamt 11 transplantierten Tieren nachgewiesen. Bei allen 10 Tieren waren die Zellen des medialen Transplantats angewachsen. Von den 10 Tieren mit medialem Transplantat konnte bei 8 Tieren noch ein laterales Transplantat detektiert werden (Abb. 11B, E).

Im Gegensatz zu 4 Wochen wurden 12 Wochen nach Transplantation nur in 4 von 10 Tieren Transplantate gefunden. Bei 2 der 10 transplantierten Tiere war das mediale Transplantat angewachsen, bei 2 anderen Tieren konnte ein laterales Transplantat nachgewiesen werden (Abb. 11F).

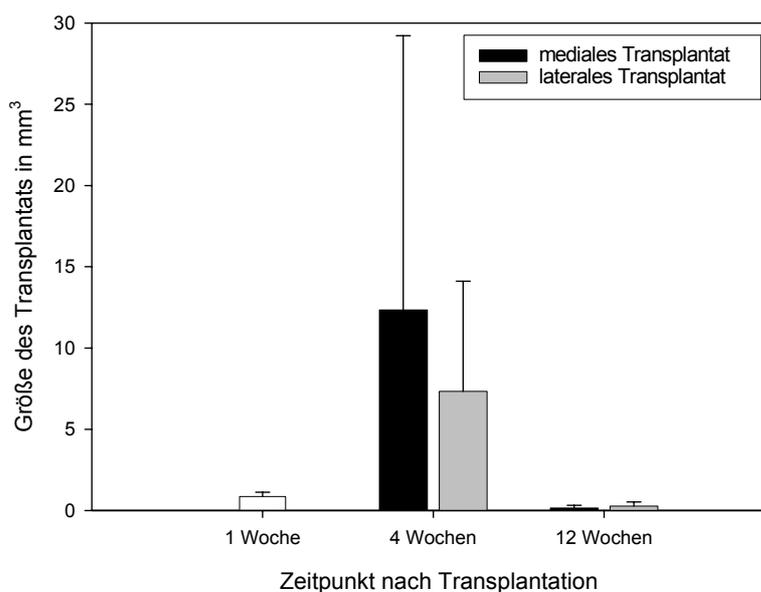
Nestin+/ EGFP+ neurale Vorläuferzellen, die kontralateral zum Schaden in die ungeschädigte Hemisphäre transplantiert wurden, wurden 1 Woche nach Transplantation in allen 6 transplantierten Tieren nachgewiesen (Abb. 11D).



**Abb. 11: Übersichtsaufnahmen der Transplantate 1, 4 und 12 Wochen nach Transplantation.** In den Abb. **A** und **B** sind mit Toluidinblau gefärbte Hirnschnitte (Nissl-Färbung) 4 Wochen nach eMCAO ohne Transplantation (**A**, Kontrolle) und 4 Wochen nach Transplantation (**B**) dargestellt. In Abb. **C** ist das experimentelle Design der Versuche in Kurzform dargestellt. Die Abb. **D-F** zeigen die EGFP+ Transplantate 1 (**D**), 4 (**E**) und 12 Wochen (**F**) nach Transplantation. Sowohl in der Nissl-Färbung (**B**) als auch in der Fluoreszenz (**E**, **F**) lassen sich die transplantierten Zellen, die im Schadensgebiet angewachsen sind, gut erkennen (Maßstab 100 µm).

### 3.1.2 Volumina der Transplantate

Das durchschnittliche Volumen der kontralateralen Transplantate betrug 1 Woche nach Transplantation  $0,86 \text{ mm}^3$  ( $n = 6$ , Abb. 12). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 4 Wochen eine drastische Zunahme des Volumens der ipsilateralen Transplantate. So betrug das durchschnittliche Volumen des lateralen Transplantats  $7 \text{ mm}^3$  ( $n = 8$ , Abb. 12) und das des medialen Transplantats  $12 \text{ mm}^3$  ( $n = 10$ , Abb. 12). Zwölf Wochen nach Transplantation waren die Volumina der Transplantate deutlich geschrumpft. Das Volumen des lateralen Transplantats betrug nur noch zwischen  $0,18$  und  $0,56 \text{ mm}^3$  ( $n = 2$ , Abb.12) und das des medialen Transplantats nur noch zwischen  $0,05$  und  $0,08 \text{ mm}^3$  ( $n = 2$ , Abb.12).



**Abb. 12: Transplantatvolumina 1, 4 und 12 Wochen nach Transplantation.** Eine Woche nach Transplantation betrug das durchschnittliche Volumen der kontralateralen Transplantate  $0,9 \text{ mm}^3$  (100.000 Zellen appliziert). Das Volumen der Transplantate vergrößerte sich 4 Wochen nach Transplantation um das 7-12 fache auf durchschnittlich  $7 \text{ mm}^3$  (laterales Transplantat, 100.000 Zellen appliziert) bzw.  $12 \text{ mm}^3$  (mediales Transplantat, 200.000 Zellen appliziert). Nach 12 Wochen wurden nur noch in 4 von 10 Empfängertieren Transplantate detektiert. Im Gegensatz zur Zunahme des Transplantatvolumens zwischen 1 und 4 Wochen, zeigte sich zwischen 4 und 12 Wochen eine deutliche Abnahme des Volumens auf durchschnittlich  $0,37 \text{ mm}^3$  (laterales Transplantat) bzw.  $0,065 \text{ mm}^3$  (mediales Transplantat).

## **3.2 Entwicklung der neuralen Vorläuferzellen 1 Woche nach kontralateraler Transplantation**

### **3.2.1 Migration**

Um zu prüfen, ob die vordifferenzierten Nestin+/ EGFP+ neuralen Vorläuferzellen in der Lage sind, in das durch den Schlaganfall geschädigte Gebiet einzuwandern, wurden sie 1 Woche nach eMCAO in die kontralaterale, ungeschädigte Hemisphäre transplantiert.

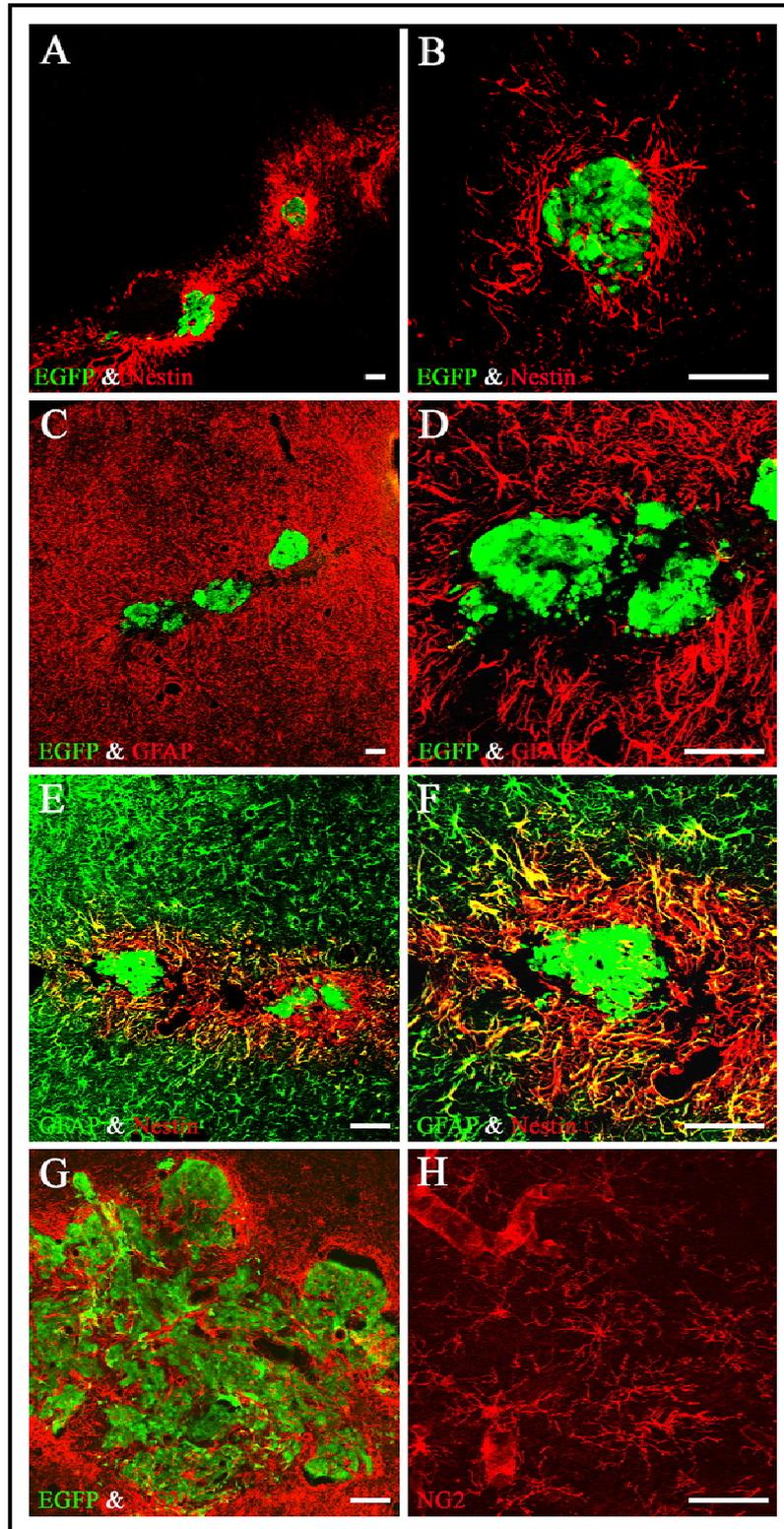
Eine Woche nach Transplantation zeigte sich keine Migration der kontralateral applizierten neuralen Vorläuferzellen in Richtung Läsion. Die transplantierten Zellen verblieben im Einstichbereich der Applikationsnadel, nur wenige Zellen migrierten bis zu 300 µm vom Rand des Transplantats ins umliegende Gewebe. Der Großteil dieser migrierenden Vorläuferzellen war positiv mit DCX markiert, einem Marker für junge, migrierende Neurone (Abb. 14A, B). Es zeigte sich keine bevorzugte Richtung der Migration, die Zellen migrierten vielmehr in alle Richtungen.

### **3.2.2 Differenzierung**

Zum Zeitpunkt der kontralateralen Transplantation exprimierten die Vorläuferzellen den neuralen epithelialen Stammzellmarker Nestin. Bereits 1 Woche nach Transplantation war keine Doppelmarkierung mehr zwischen den grün fluoreszierenden Zellen und einem Antikörper gegen Nestin nachweisbar (Abb. 13A, B). Die Nestin-Expression in den neuralen Vorläuferzellen war demnach nach 1 Woche deutlich herunterreguliert. Mit NG2, einem weiteren Marker für neurale Vorläuferzellen, war ebenfalls keine Kolorisierung festzustellen (Abb. 13G). Auch die immunhistochemischen Färbungen mit Astrozytenmarkern wie GFAP (Abb. 13C, D) und S100β (Abb. 14E, F) konnten keine doppelmarkierten EGFP+ Zellen detektieren. Einige am Transplantatrand lokalisierte Vorläuferzellen waren DCX+ und somit auf dem Weg der neuronalen Differenzierung

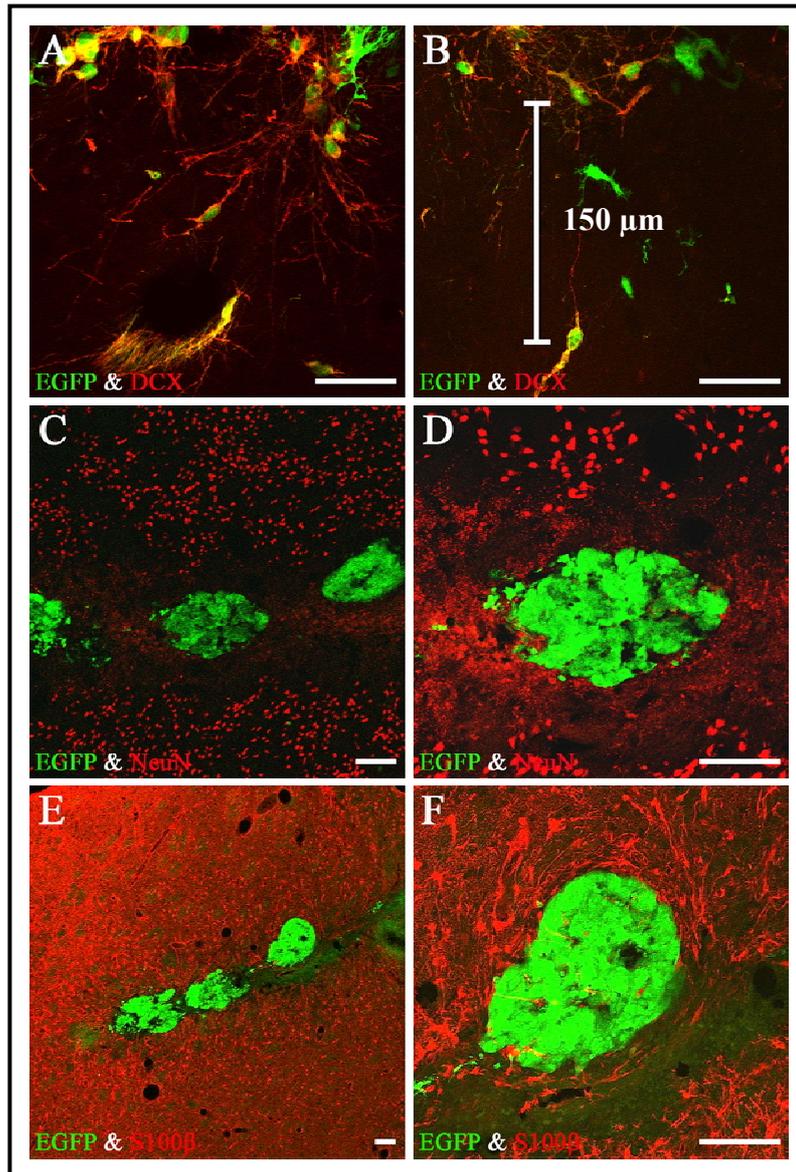
(Abb. 14A, B). Eine Woche nach Transplantation war keine Doppelmarkierung der EGFP+ Zellen mit NeuN zu beobachten (Abb. 14C, D). Das bedeutet, dass die transplantierten Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu reifen Neuronen ausdifferenziert waren.

Der Hälfte der Tiere zu jedem untersuchten Zeitpunkt (n = 3 nach 1 Woche, n = 5 nach 4 Wochen und n = 5 nach 12 Wochen) wurden vordifferenzierte ES-Zellen appliziert, die das Zelladhäsionsmolekül L1 überexprimierten. L1 erwies sich in der ontogenetischen Entwicklung als wichtig für die Migration und neuronale Differenzierung neuraler Vorläuferzellen (Dihné et al., 2003; Moos et al., 1988). In unseren Untersuchungen zeigten sich allerdings weder in der Migration noch in der Differenzierung der Zellen Unterschiede zu untransfizierten ES-Zellen. Aus diesem Grund wurden L1-transfizierte und untransfizierte vordifferenzierte ES-Zellen in der zukünftigen Auswertung nicht voneinander unterschieden.



**Abb. 13: Ausbildung einer Glianarbe 1 Woche nach kontralateraler Transplantation.**

Bereits nach 1 Woche war die Nestin-Expression der vordifferenzierten ES-Zellen herunterreguliert, weshalb keine Doppelmarkierung der EGFP+ Zellen mit Nestin nachweisbar war (A, B). Im Einstichbereich der Applikationsnadel zeigten jedoch endogene Astrozyten des Empfängergewebes eine sehr starke Nestin-Expression (A, B). Zusätzlich exprimierten diese Astrozyten sehr stark GFAP (C, D). Viele GFAP+ Astrozyten wiesen eine Re-Expression von Nestin auf (E, F). Im Transplantat selber konnten nach 1 Woche keine Astrozyten detektiert werden (C, D). Mit NG2, einem weiteren Marker für neurale Vorläuferzellen, war ebenfalls keine Doppelmarkierung feststellbar. Dennoch war eine starke Akkumulation endogener NG2+ Zellen um das Transplantat zu beobachten (G, H; Maßstab in A-F 100  $\mu$ m, in G und H 200  $\mu$ m).



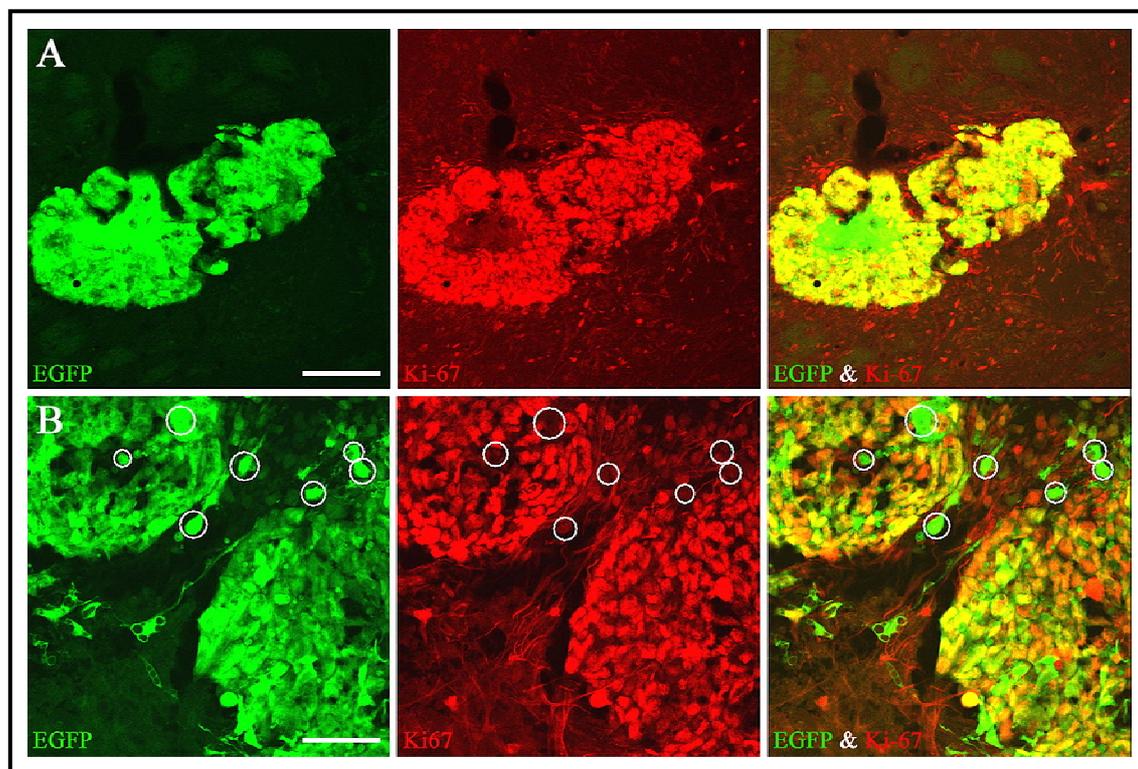
**Abb. 14: Differenzierung der kontralateral applizierten EGFP+ neuronalen Vorläuferzellen 1 Woche nach Transplantation.** Einige der vordifferenzierten EGFP+ ES-Zellen exprimierten DCX. DCX+/ EGFP+ Zellen befanden sich entweder am Transplantatrand (A) oder in einiger Entfernung vom Transplantat (B). Zum gleichen Zeitpunkt wurden jedoch keine reifen Neurone mit NeuN (C, D) und keine S100β+ Astrozyten detektiert (E, F; Maßstab in A, B 50 μm; in C-F 100 μm).

### 3.2.3 Proliferation

Die immunhistochemische Färbung mit Ki-67, einem Marker für proliferierende Zellen, zeigte, dass der Großteil der transplantierten EGFP<sup>+</sup> neuronalen Vorläuferzellen noch 1 Woche nach Transplantation teilungsaktiv ist (15A, B). Die in Abbildung 15B eingekreisten Gebiete markieren die wenigen Bereiche im Transplantat, in denen keine Proliferation stattfand. Infolgedessen waren die EGFP<sup>+</sup> neuronalen Vorläuferzellen Ki-67<sup>-</sup>.

### 3.2.4 Expression von Nestin und GFAP in endogenen Zellen

Im Gegensatz zu den transplantierten neuronalen Vorläuferzellen, die nach 1 Woche weder Nestin noch GFAP exprimierten, wiesen die endogenen Zellen des Empfängergewebes im Stichkanal der Applikationskanüle eine starke Expression beider Marker auf (13A-D). Viele der GFAP<sup>+</sup> Zellen waren sogar doppelmarkiert mit Nestin (13E-F).



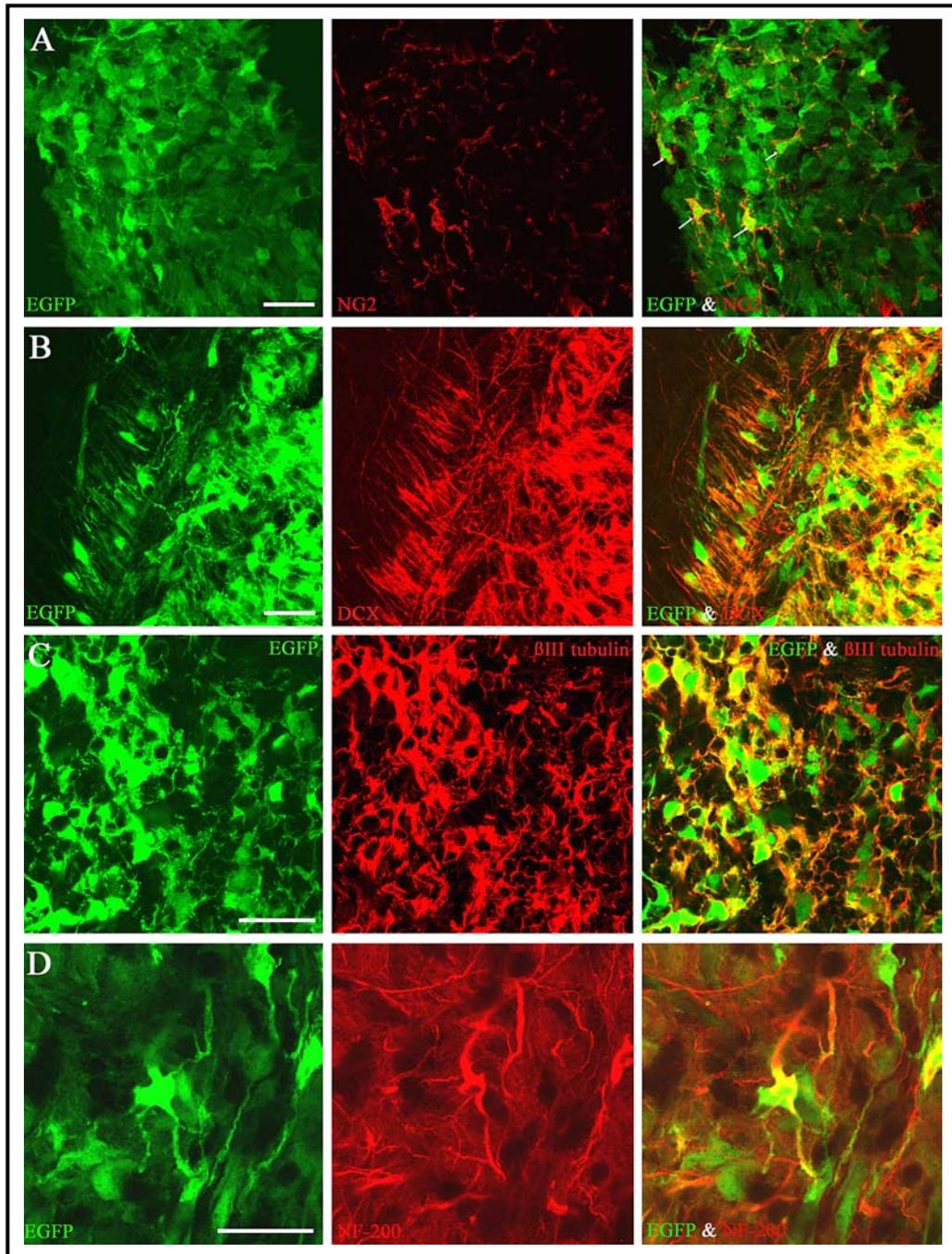
**Abb. 15: Proliferation der kontralateral applizierten Zellen 1 Woche nach Transplantation.** Immunhistochemische Färbungen mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (A, B) verdeutlichen die starke Teilungsaktivität der transplantierten EGFP<sup>+</sup> Zellen zu diesem Zeitpunkt. Die wenigen eingekreisten Gebiete (B) markieren EGFP<sup>+</sup> Zellen, die Ki-67<sup>-</sup> waren (Maßstab in A 100 µm; in B 50 µm).

### **3.3 Entwicklung der neuralen Vorläuferzellen 4 Wochen nach ipsilateraler Transplantation**

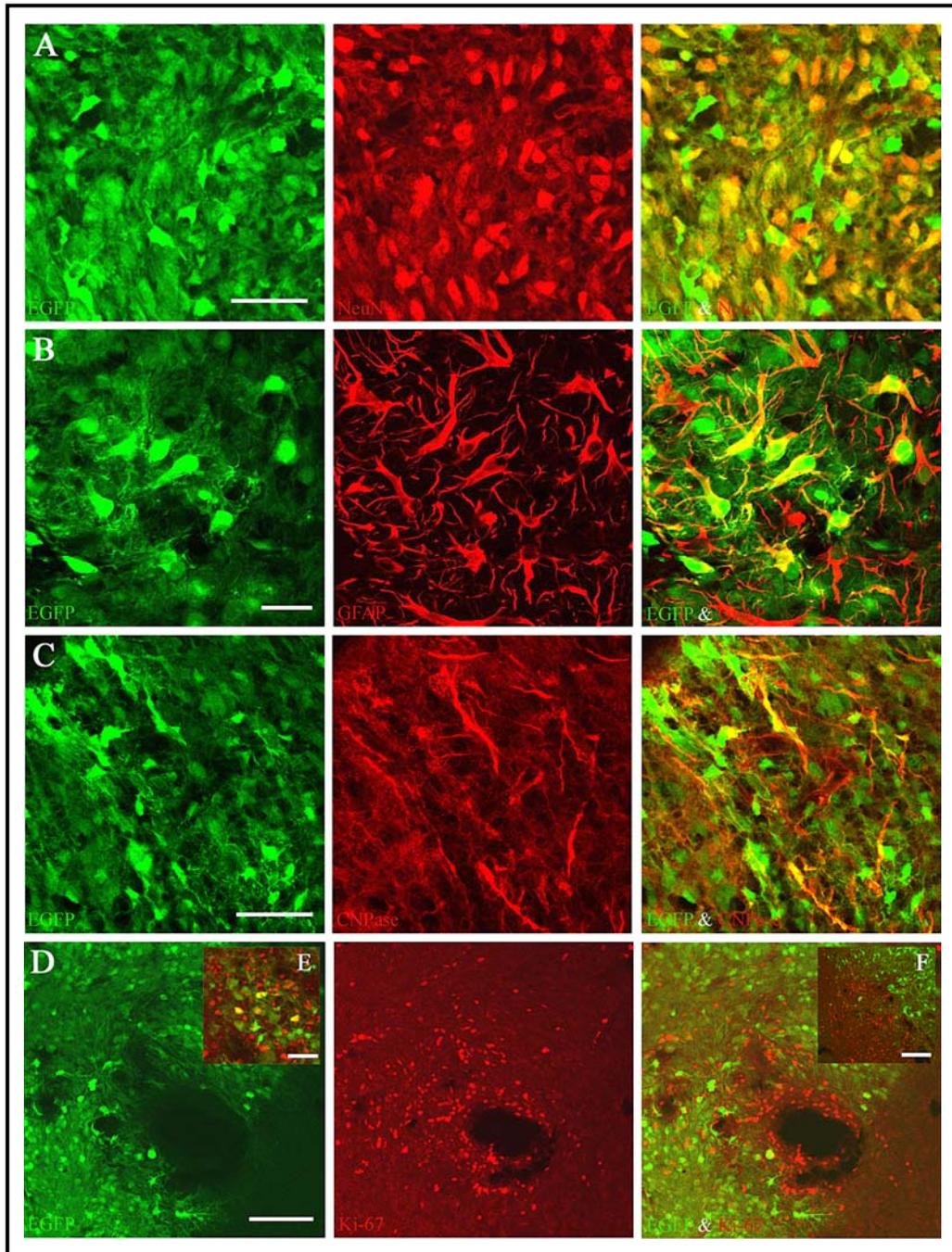
#### **3.3.1 Differenzierung in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten**

Vier Wochen nach Transplantation wurde die Differenzierung der neuralen Vorläuferzellen mit Hilfe zelltypspezifischer Antikörperfärbungen überprüft. Wie bereits nach 1 Woche war auch nach 4 Wochen keine Nestin-Expression in den transplantierten Zellen detektierbar. Etwa 32 % der Zellen des medialen Transplantats und 31 % der Zellen des lateralen Transplantats hatten sich zu reifen Neuronen entwickelt, die mit dem neuronalen Marker NeuN doppelmarkiert waren (Abb. 17A; 18A). Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit dem Astrozytenmarker GFAP zeigte, dass sich 6,7 % der Zellen des medialen Transplantats und 7,4 % der Zellen des lateralen Transplantats zu Astrozyten entwickelt hatten (Abb. 17B; 18B). Weniger als 1 % der Zellen in beiden Transplantaten differenzierten zu reifen Oligodendrozyten (Abb. 17C). Im Gegensatz zur starken Proliferationsaktivität der Zellen 1 Woche nach Transplantation war 4 Wochen nach Transplantation nur ein geringer Teil der Zellen (unter 5 %) Ki-67+ und damit teilungsaktiv (Abb. 17E). Der Großteil an Ki-67+ Zellen im Bereich des Transplantats war im Bereich von Blutgefäßen (Abb. 17D) und an der Grenze zwischen Empfängergewebe und Transplantat lokalisiert (Abb. 17F). Es handelte sich hierbei höchstwahrscheinlich um infiltrierende Lymphozyten und Makrophagen.

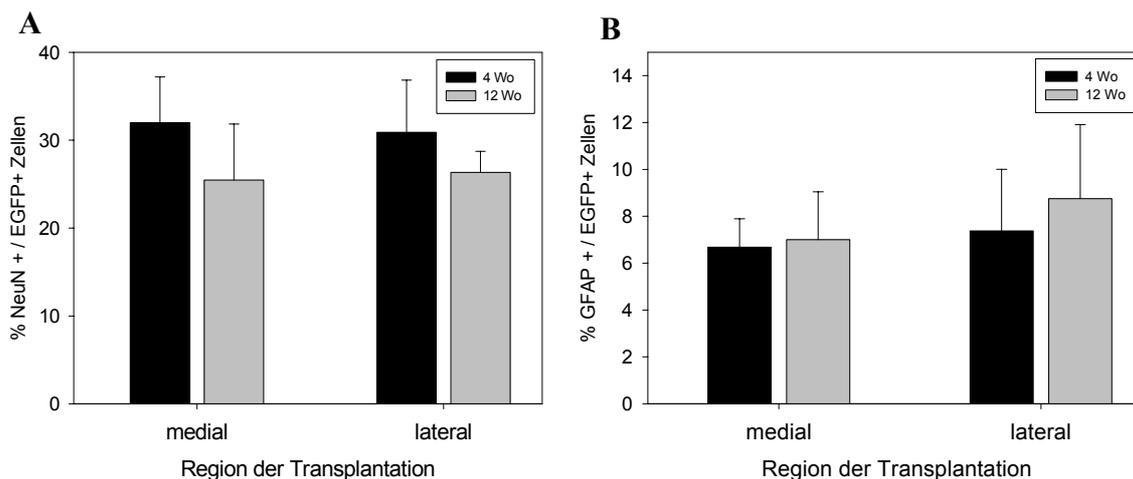
Die starke Expression von DCX und  $\beta$ III-Tubulin (Abb. 16B, C), beides Marker für junge, noch in der Entwicklung befindliche Neurone innerhalb des Transplantats verdeutlicht, dass sich der Großteil der transplantierten Zellen noch in der Differenzierung befand. Hingegen waren einige der Zellen bereits zu reifen NF-200+ Neuronen ausdifferenziert (Abb. 16D). Vereinzelt ließ sich bei einigen wenigen Zellen eine Doppelmarkierung mit NG2 feststellen (Abb. 16A).



**Abb. 16: Nachweis verschiedener neuronaler Stadien im Transplantat 4 Wochen nach Transplantation.** Immunhistochemische Färbungen mit typischen Markern für junge Neurone wie NG2 (A), DCX (B) und  $\beta$ III-Tubulin (C) sind ein Hinweis darauf, dass sich viele Neurone noch in der Differenzierung befanden. Einige der vordifferenzierten EGFP+ ES-Zellen hatten sich nach 4 Wochen zu reifen NF-200+ Neuronen entwickelt (D; Maßstab 25  $\mu$ m). Es ist unklar, ob sich die NG2+ Zellen (A) zu Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten entwickeln.



**Abb. 17: Differenzierung der ipsilateral transplantierten EGFP+ neuronalen Vorläuferzellen 4 Wochen nach Transplantation.** Die medial bzw. lateral applizierten Zellen differenzierten in alle drei Zelltypen des zentralen Nervensystems. Neurone (A) wurden mit NeuN, Astrozyten (B) mit GFAP und Oligodendrozyten (C) mit dem Marker CNPase detektiert. Zeitgleich exprimierte nur noch ein geringer Teil der transplantierten Zellen den Proliferationsmarker Ki-67 (E). Endogene Ki-67+ Zellen waren vor allem um Blutgefäße (D) und am Transplantatrand lokalisiert (F; Maßstab in A und C 25 µm; in B 50 µm; in D - F 100 µm).

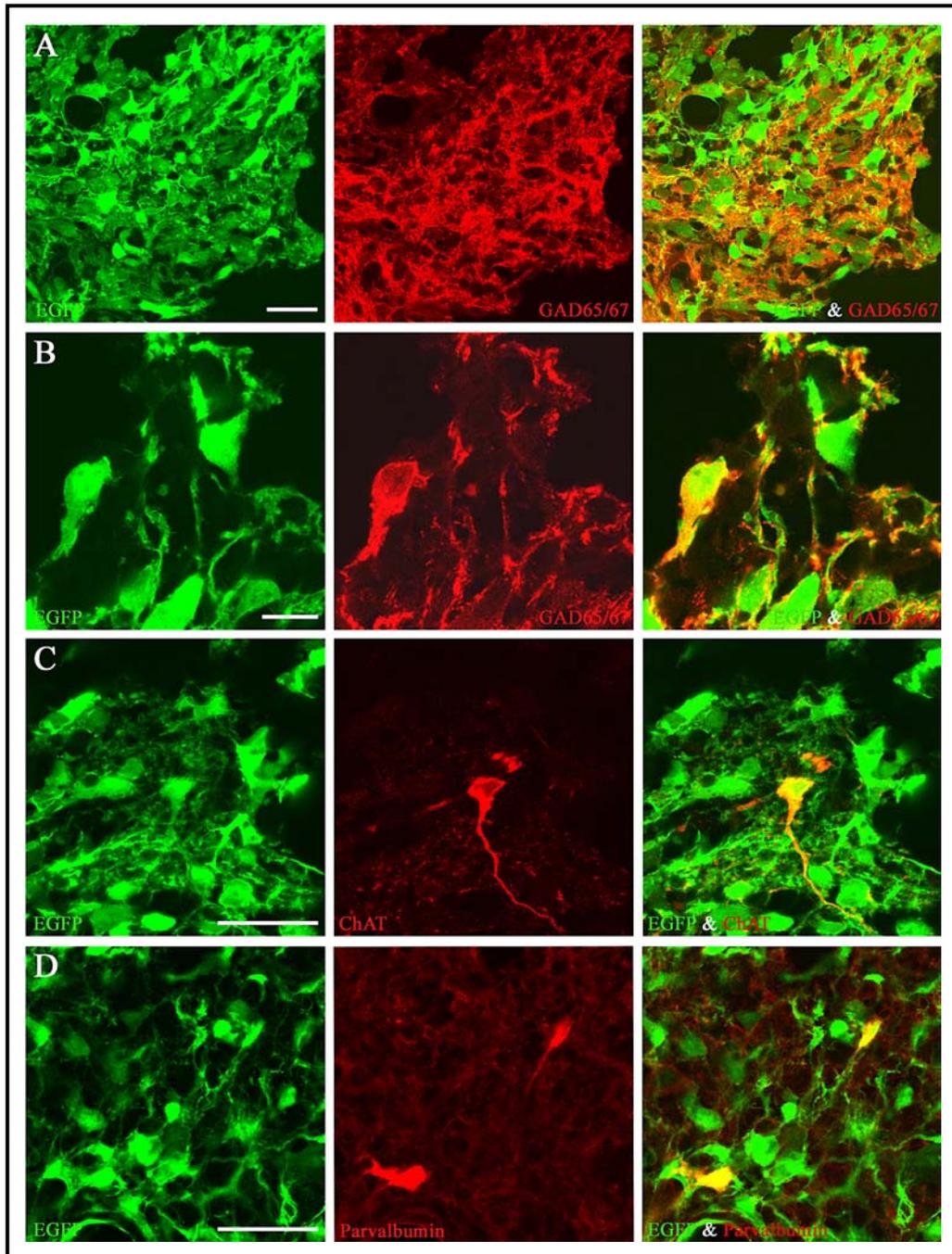


**Abb. 18: Prozentsatz, der in Neurone (NeuN+/ EGFP+; A) und Astrozyten (GFAP+/ EGFP+; B) differenzierten EGFP+ Zellen im medialen und lateralen Transplantat 4 und 12 Wochen nach Transplantation.** Das Diagramm A verdeutlicht, dass sich 4 Wochen nach Transplantation mehr als 30 % der EGFP+ Zellen (medial: 32 %, lateral: 31 %) zu Neuronen entwickelt hatten. Zwölf Wochen nach Transplantation blieb der Prozentsatz mit 25,5 % für das mediale Transplantat bzw. 26,3 % für das laterale Transplantat annähernd gleich. Der Prozentsatz an Astrozyten lag nach 4 Wochen zwischen 6,7 (mediales Transplantat) und 7,4 % (laterales Transplantat). Nach längerer Überlebenszeit der Zellen von 12 Wochen zeigte sich mit 7 % Astrozyten im medialen Transplantat und 8,8 % im lateralen Transplantat kein wesentlicher Unterschied zum 4 Wochen-Wert.

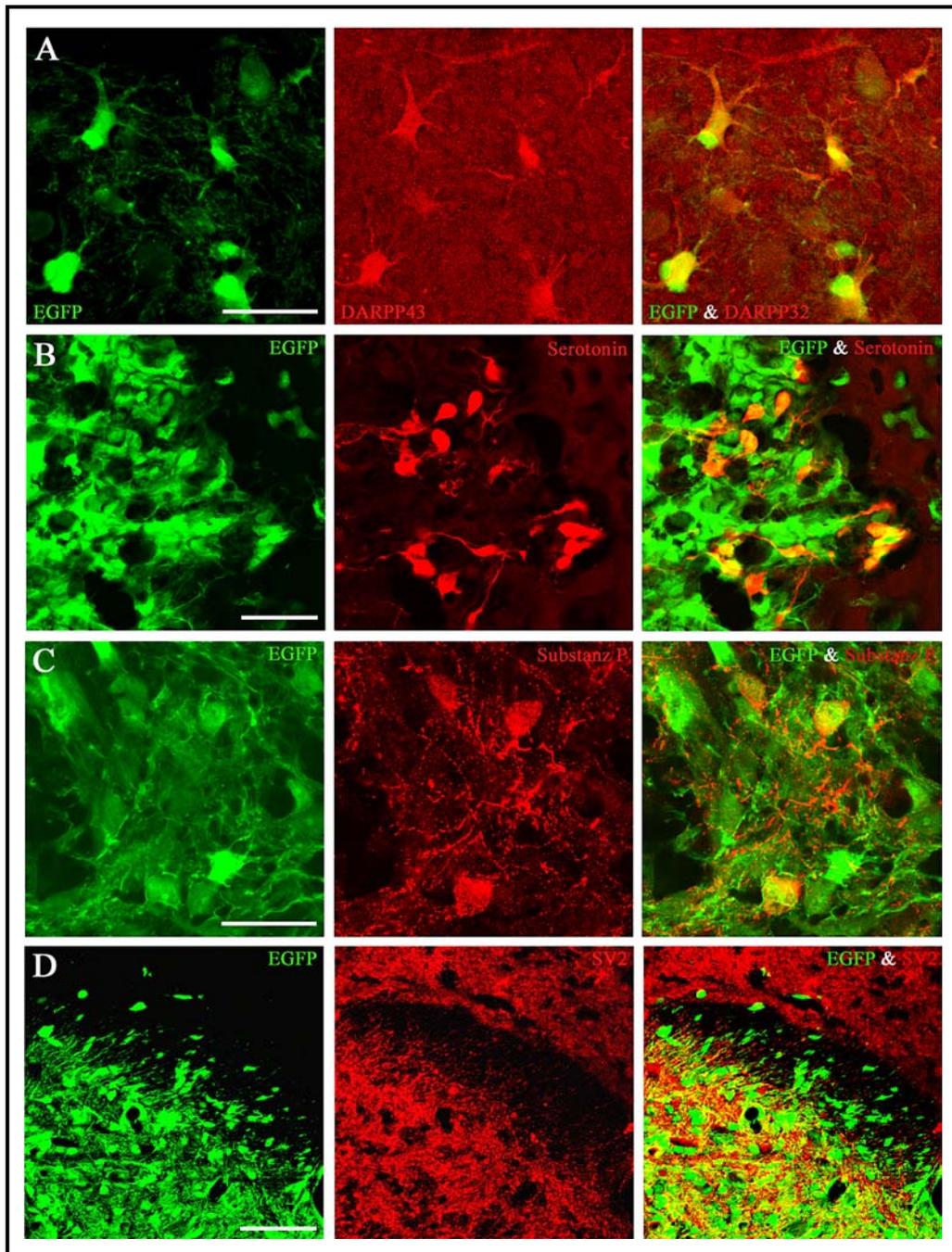
### 3.3.2 Differenzierung in neuronale Subtypen

Anhand weiterer immunhistochemischer Färbungen zur Detektion verschiedener Neurotransmitter sollte geklärt werden, welche neuronalen Subtypen sich im Transplantat herausgebildet hatten. Den größten Anteil nahmen GABAerge Neurone ein, die immunhistochemisch mit dem Antikörper Anti-GAD65/67 nachgewiesen wurden (Abb. 19A, B). Anti-GAD65/57 erkennt das Enzym Glutamat-Decarboxylase, welches die Umwandlung von Glutaminsäure in  $\gamma$ -Aminobuttersäure katalysiert. Zwei molekulare Formen von GAD sind bekannt. Während GAD65 in der Zellmembran gebildet wird, verteilt sich GAD67 im gesamten Zellplasma. Aufgrund dieser großflächigen Verteilung von GAD65/67 in den Zellkörpern und Membranen der Neurone, war eine exakte Zuordnung des Markers zu einzelnen Zellen nicht möglich und folglich die Zahl GABAerger Neurone nicht quantifizierbar (Übersichtsaufnahme der Expression von GAD65/67 in Abb. 19A). Etwa 6 % der Neurone exprimierten DARPP32+, ein Dopamin-

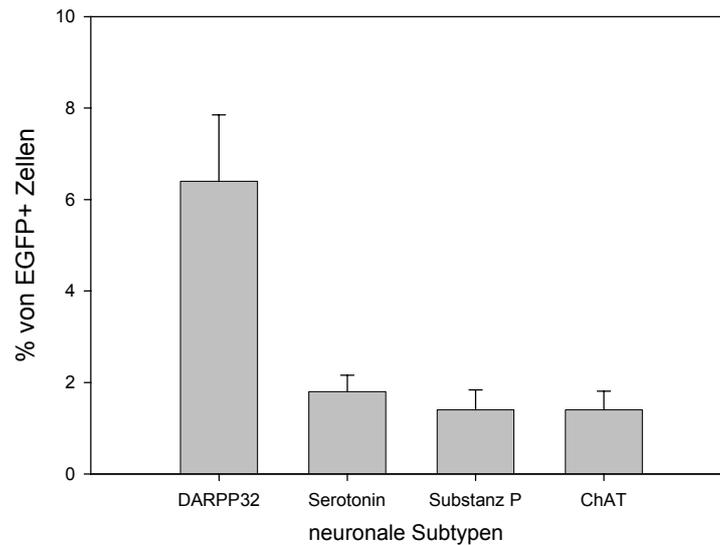
D1-Rezeptor assoziiertes Signalprotein, das von Projektionsneuronen des Striatums gebildet wird und somit charakteristisch für striatale Neurone ist (Abb. 20A, 21). Des Weiteren konnten Neurone nachgewiesen werden, die den Monoamintransmitter Serotonin exprimierten (Abb. 20B). Der Anteil serotonerger Neurone betrug 1,8 % (Abb. 21). Substanz P, ein aus elf Aminosäuren bestehendes Neuropeptid, wurde ebenfalls von einigen transplantierten Zellen gebildet (Abb. 20C). Der Anteil Substanz P exprimierender Zellen an der Gesamtpopulation der EGFP+ Zellen betrug 1,4 % (Abb. 21). Der immunhistochemische Nachweis cholinерger Neurone erfolgte mit einem, gegen das Enzym Cholin-Azetyltransferase gerichteten, Antikörper. Cholin-Azetyltransferase katalysiert die Synthese von Azetylcholin aus Cholin und dem Azetyl-Coenzym. Der Anteil cholinерger Neurone an der Gesamtzahl der transplantierten Zellen lag auch hier bei 1,4 % (Abb. 19C, 21). Das Kalzium-bindende Protein Parvalbumin, das von einer Subpopulation GABAerger Neurone gebildet wird, wurde nur in äußerst geringer Zahl in wenigen Transplantaten gefunden (Abb. 19D). Eine Quantifizierung Parvalbumin+/EGFP+ Zellen war deshalb nicht möglich. Aufgrund des wenigen zur Verfügung stehenden Materials, wurde bei der Quantifizierung der einzelnen Transmitter-Marker nicht zwischen medialem und lateralem Transplantat unterschieden.



**Abb. 19: Differenzierung der ipsilateral transplantierten EGFP+ neuronalen Vorläuferzellen in verschiedene neuronale Subtypen 4 Wochen nach Transplantation.** Während sich ein großer Teil der EGFP+ Zellen zu GABAergen Neuronen (GAD65/67; **A**, **B**) entwickelte, differenzierte nur ein geringer Prozentsatz zu cholinergen Neuronen (ChAT; **C**). Parvalbumin, ein Kalzium-bindendes Protein, das von einer Subpopulation GABAergen Neuronen gebildet wird, wurde ebenfalls in einer sehr geringen Zahl der transplantierten EGFP+ Zellen exprimiert (**D**; Maßstab in **B** 10  $\mu\text{m}$ ; in **A**, **C** und **D** 25  $\mu\text{m}$ ).



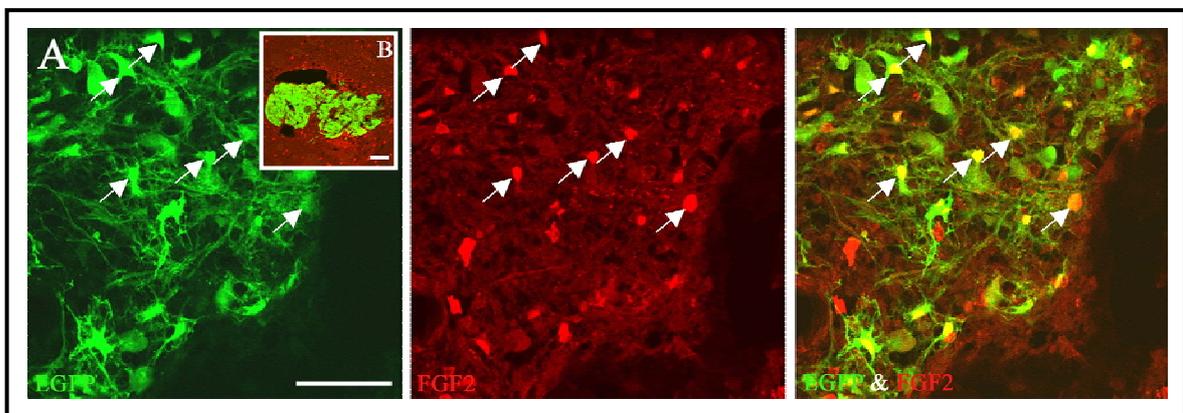
**Abb. 20: Differenzierung der ipsilateral transplantierten EGFP+ neuronalen Vorläuferzellen in verschiedene Neuronentypen 4 Wochen nach Transplantation.** Etwa 6 % der transplantierten Zellen exprimierten DARPP32, einen typischen Marker für striatale Neurone (A). Daneben differenzierten etwa 1-2 % der EGFP+ vordifferenzierten ES-Zellen in Serotonin (B) bzw. Substanz P (C) exprimierende Neurone. Der präsynaptische Vesikelmarker SV2 wurde sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen (D) im gesamten Transplantat nachgewiesen (Maßstab in A, B, C 25 µm, in D 50 µm).



**Abb. 21: Differenzierung der EGFP+ neuronalen Vorläuferzellen in verschiedene neuronale Subtypen 4 Wochen nach Transplantation.** Zirca 6,4 % der transplantierten Zellen hatte sich zu typischen striatalen Projektionsneuronen (DARPP32+) entwickelt. Substanz P, ebenfalls ein striataler Transmitter, wurde in 1,4 % der transplantierten Zellen detektiert. Des Weiteren exprimierten 1,8 % der Zellen Serotonin und 1,4 % Cholin-Azetyltransferase (ChAT).

### 3.3.3 Expression des Wachstumsfaktors FGF-2

Während 1 Woche nach Transplantation keine der transplantierten Zellen den Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2) exprimierten (Abb. 22B), wurden nach 4 Wochen wenige FGF-2+/ EGFP+ Zellen im Transplantat detektiert (Abb. 22A).



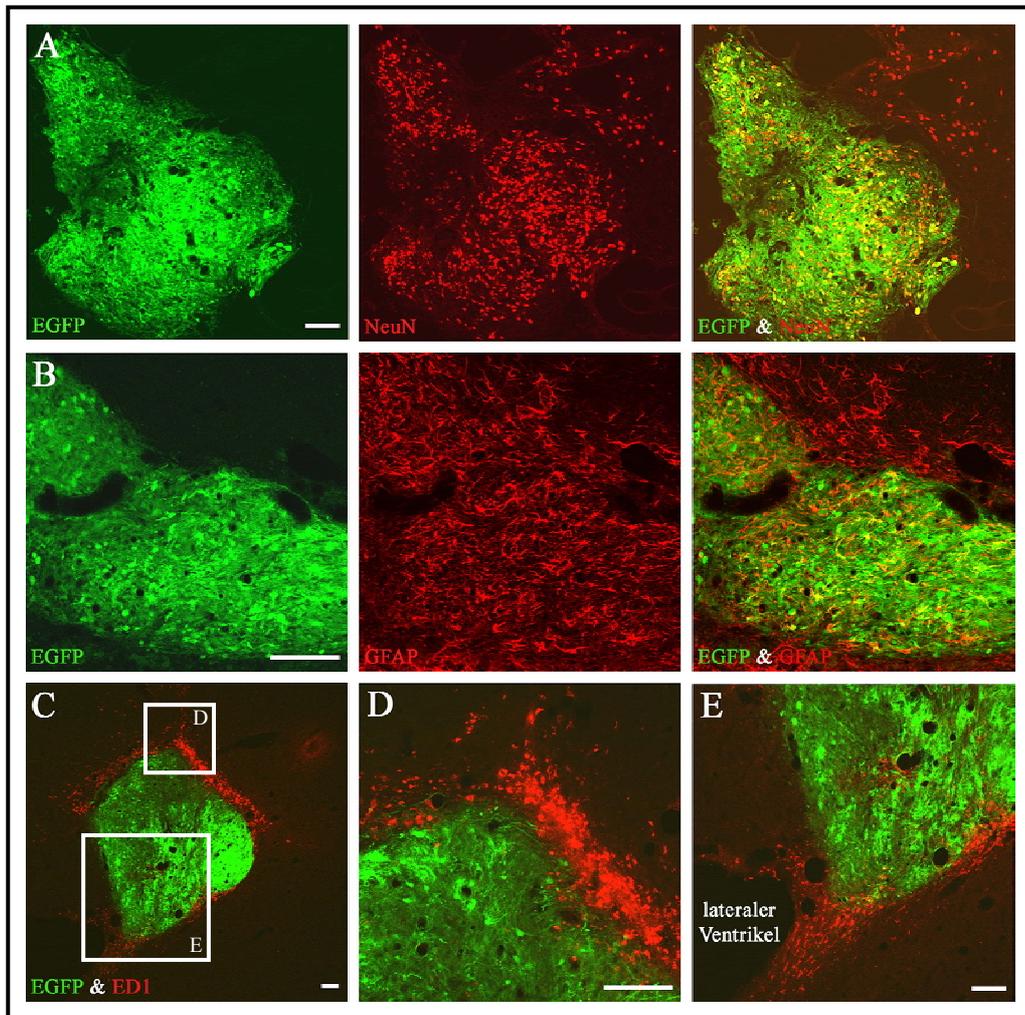
**Abb. 22: Expression des Wachstumsfaktors FGF-2 in den EGFP+ Zellen 4 Wochen nach Transplantation.** FGF-2 wurde 4 Wochen nach Transplantation in den transplantierten EGFP+ Zellen nachgewiesen (A). Im Vergleich dazu konnte nach 1 Woche noch keine FGF-2-Expression festgestellt werden (B; Maßstab 50  $\mu$ m).

### **3.4 Entwicklung der neuralen Vorläuferzellen 12 Wochen nach ipsilateraler Transplantation**

#### **3.4.1 Differenzierung in Neurone und Astrozyten**

Obwohl nach 12 Wochen die Anzahl EGFP+ Zellen stark reduziert war, erwies sich der Anteil an NeuN+/ EGFP+ Neuronen und GFAP+/ EGFP+ Astrozyten beinahe unverändert. Der Prozentsatz NeuN+ Neurone in den medialen Transplantaten von 2 Tieren zeigte mit 25,5 % einen leichten Rückgang um 6,5 % im Vergleich zum 4 Wochen-Wert. Der Gehalt an NeuN+ Neuronen in den lateralen Transplantaten von 2 Tieren lag mit 26,3 % nach 12 Wochen um 4,6 % niedriger als nach 4 Wochen (Abb. 23A; 18A).

Im Vergleich dazu zeigte die Quantifizierung der Astrozyten im medialen Transplantat von 2 Tieren mit 7 % keine Veränderung im Vergleich zum Wert nach 4 Wochen. Etwa 8,8 % der Zellen des lateralen Transplantats hatten sich zu GFAP+ Astrozyten entwickelt, das entsprach einer Zunahme um 1,8 % im Vergleich zum 4 Wochen-Wert (Abb. 23B; 18B). Zu allen Zeitpunkten nach Transplantation konnte eine starke Ansammlung ED1+ Makrophagen innerhalb und um das gesamte Transplantat beobachtet werden. Sogar nach 12 Wochen infiltrierten vom Empfängergewebe abstammende Makrophagen, die aus dem angrenzenden lateralen Ventrikel, aus Blutgefäßen oder aus der Peripherie einwanderten, das Transplantat (Abb. 23C-E).

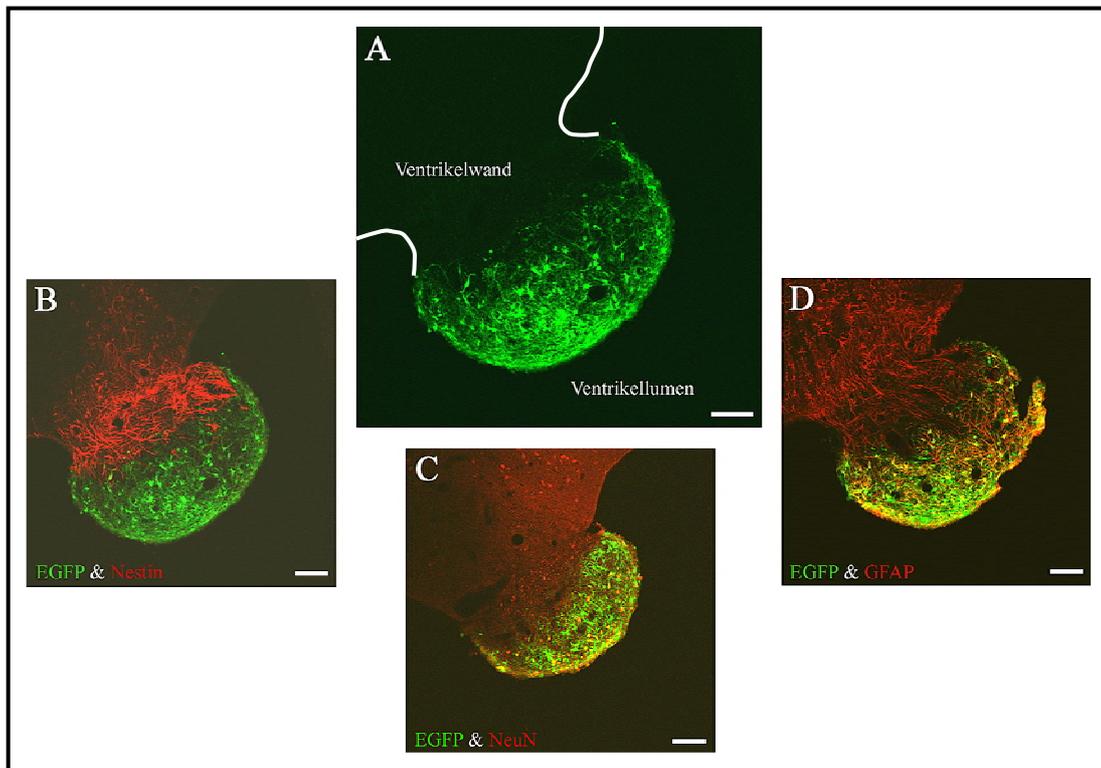


**Abb. 23: Differenzierung der ipsilateral transplantierten EGFP+ neuralen Vorläuferzellen 12 Wochen nach Transplantation.** Wie schon nach 4 Wochen waren auch nach 12 Wochen etwa 26 % der transplantierten ES-Zellen mit NeuN (A) und etwa 7 % mit GFAP (B) doppelmarkiert. Viele ED1+ Makrophagen (C-E) waren um das Transplantat herum lokalisiert (Abbildungen D und E sind Vergrößerungen der in C markierten Regionen). Sie traten entweder aus Blutgefäßen oder dem angrenzenden lateralen Ventrikel in das Gewebe über (E; Maßstab 100 µm).

### 3.4.2 Differenzierung in Neurone und Astrozyten nach intraventrikulärer Transplantation

Abweichende Schädelmaße bei einigen Tieren bzw. eine fehlerhafte stereotaktische Platzierung des medialen Transplantats führten dazu, dass einige Zellen in den lateralen Ventrikel appliziert wurden (Abb. 24A). Aus diesem Grund wurden 4 und 12 Wochen nach Transplantation bei 2 Tieren EGFP+ Zellen gefunden, die an der Wand des Ventrikels angewachsen waren. Die ventrikulär applizierten Zellen zeigten sich nicht nur überlebensfähig sondern differenzierten ebenso in Neurone (Abb. 24C) und Astrozyten

(Abb. 24D), wie die ins Schadensgebiet bzw. angrenzende Striatum transplantierten Zellen. Eine starke Nestin-Expression durch endogene Zellen war 12 Wochen nach Transplantation an der Ventrikelwand sichtbar (Abb. 24B).

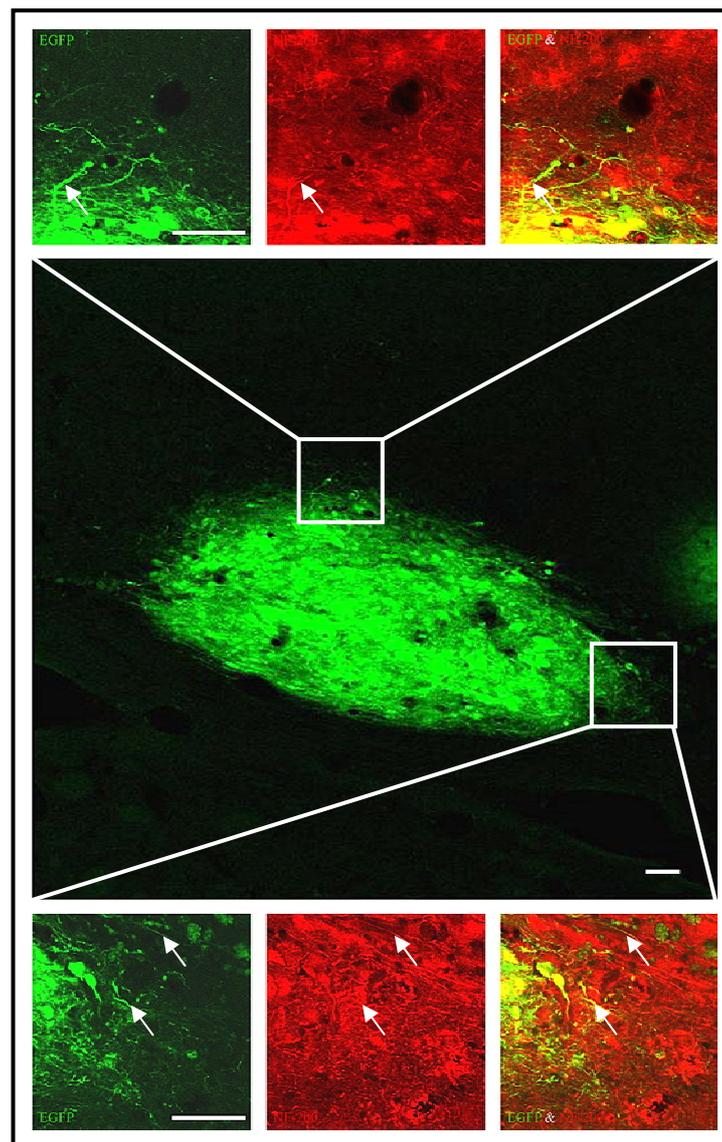


**Abb. 24: Differenzierung der intraventrikulär applizierten neuralen Vorläuferzellen 12 Wochen nach Transplantation.** Versehentlich in den Ventrikel transplantierte EGFP+ Zellen (A) wuchsen an der Ventrikelwand an und differenzierten ebenso wie im Gewebe in Neurone (C) und Astrozyten (D). Am Ventrikelrand zeigte sich noch nach 12 Wochen eine starke Ansammlung endogener Nestin+ Zellen (B; Maßstab 100  $\mu$ m).

### 3.4.3 Interaktion der transplantierten Zellen mit dem Empfängergewebe

Anhand der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen gab es Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen Transplantat und Empfängergewebe. So konnte z.B. die Expression von SV2, einem Protein, das in präsynaptischen Vesikeln gebildet wird, 4 und 12 Wochen (Abb. 20D) nach Implantation auf den transplantierten EGFP+ Zellen detektiert werden. Durch die geringe mikroskopische Auflösung konnte nicht geklärt werden, ob es sich um präsynaptische Vesikel des Transplantats selbst oder um präsynaptische Vesikel des Empfängergewebes handelt, die in das Transplantat

einwachsen. Ein weiterer Hinweis für eine mögliche Interaktion waren NF-200+/ EGFP+ Fasern, die aus dem Transplantat in Richtung Empfängergerewebe projizierten (Abb. 25). Eine funktionelle Ausreifung der aus dem Transplantat entstandenen Neurone konnte durch die alleinige immunhistologische Analyse nicht bewiesen werden. Hierzu bedurfte es elektrophysiologischer Untersuchungen.



**Abb. 25: Mögliche Interaktion der transplantierten EGFP+ Zellen mit dem Empfängergerewebe 12 Wochen nach Transplantation.** NF-200+/ EGFP+ Fasern des Transplantats (Pfeile), die in Richtung Empfängergerewebe wuchsen, könnten ein Indiz für eine mögliche Interaktion zwischen dem Empfängergerewebe und den transplantierten Zellen sein (Maßstab 50 µm).

### 3.5 Elektrophysiologische Eigenschaften der Neurone und Astrozyten des Transplantats 3 bis 7 Wochen nach ipsilateraler Transplantation

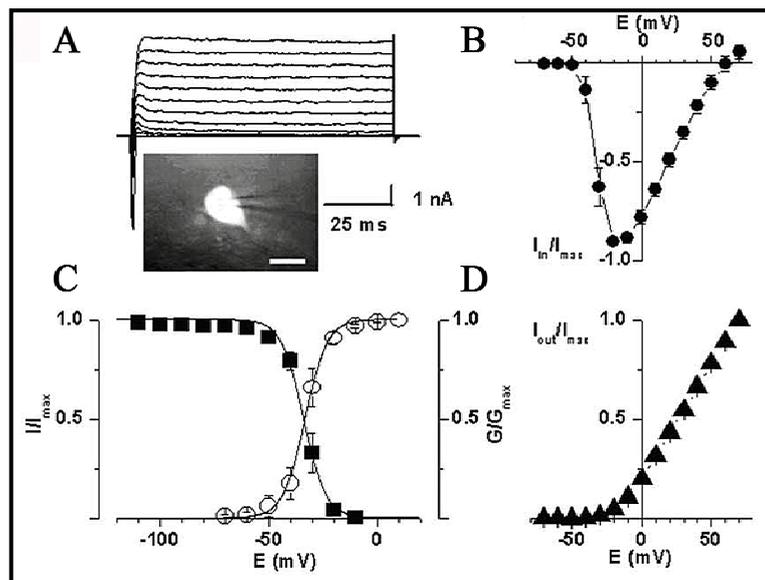
#### 3.5.1 Ausbildung spannungsabhängiger Natrium- und Kaliumströme

Zur Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften der transplantierten Zellen wurden im Zeitraum von 3 bis 7 Wochen nach ipsilateraler Transplantation *Patch-Clamp*-Untersuchungen durchgeführt. Die elektrophysiologischen Ableitungen wurden an EGFP+ Zellen durchgeführt, die sich sowohl im Zentrum als auch in der Peripherie des Transplantats befanden.

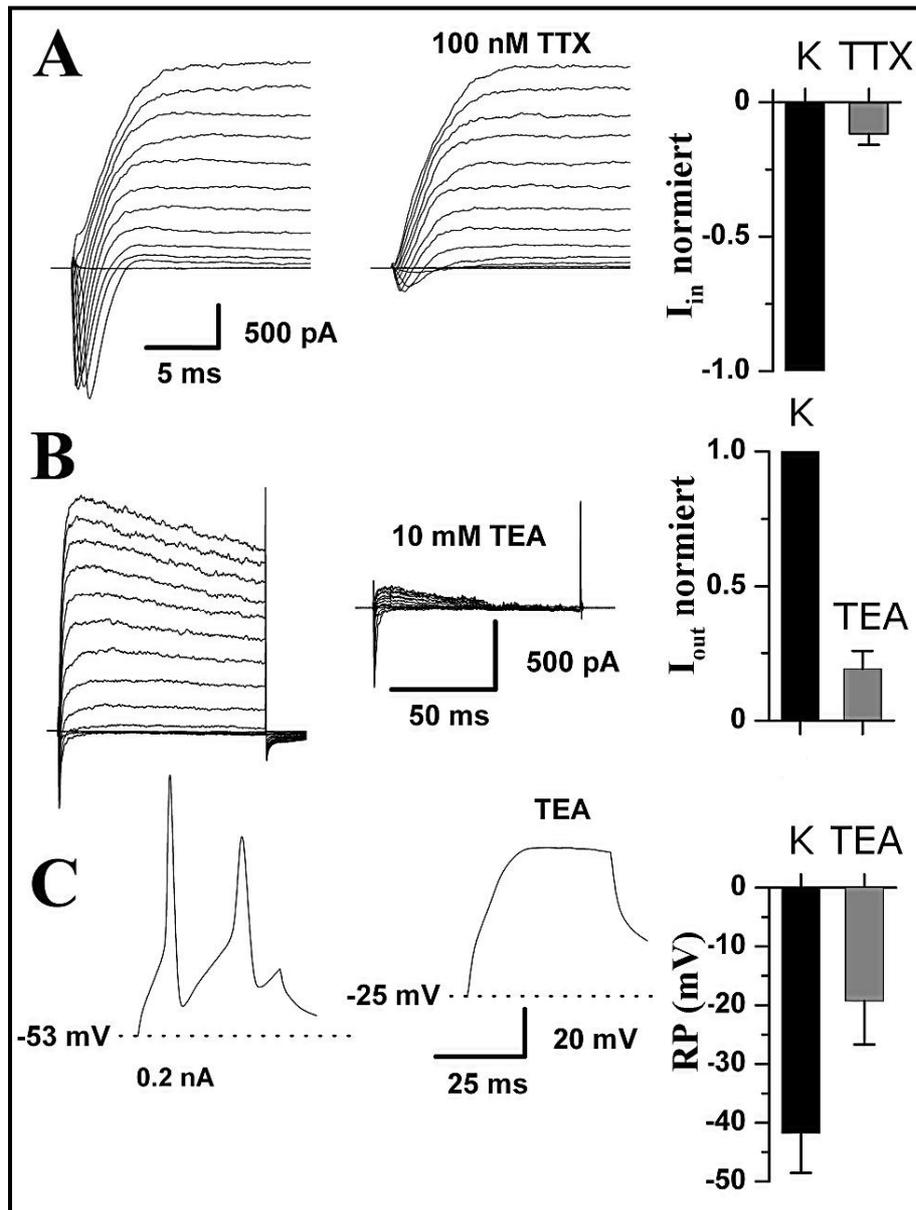
In 38 von 137 abgeleiteten Zellen (27,7 % aller gepatchten Zellen; Abb. 26A) konnten im *Voltage-Clamp*-Modus Natriumströme nachgewiesen werden. In 16 dieser 38 Zellen zeigte die abgeleitete Strom-Spannungskurve einen Schwellenwert von etwa -50 mV und ein Umkehrpotential von +61 mV, welches annähernd dem Nernst'schen Gleichgewichtspotential für Natrium von 58,7 mV entspricht (Abb. 26B). Die Aktivierungskurve wurde mit Hilfe der Boltzmann-Gleichung errechnet und ergab eine halbmaximale Aktivierung von  $-33,2 \pm 0,6$  mV ( $n = 16$ ) mit einer Steigung von  $5,1 \pm 0,6$  mV/ e (Abb. 26C). Für die Inaktivierungskurve wurden die Amplituden der Einwärtsströme bei einem Testpotential von 20 mV gemessen, denen je ein 50 ms langer Vorpuls mit Potentialen von -110 bis -10 mV vorausging. Die gemessenen Ströme wurden auf den Maximalstrom normiert. Die halbmaximale Inaktivierung lag bei  $-33,6 \pm 0,5$  mV ( $n = 7$ ) mit einer Steigung von  $5,1 \pm 0,5$  mV/ e (Abb. 26C). Des Weiteren führte die Applikation von Tetrodotoxin (TTX, 100 nM), einem hochtoxischen Nervengift, zur Blockierung der spannungsaktivierten Natriumkanäle, wodurch der Natriumstrom von  $1,2 \pm 0,2$  pA auf  $0,2 \pm 0,1$  nA ( $n = 8$ , Abb. 27A) sank. Das Vorhandensein von Natriumkanalproteinen, die den Einwärtsstrom von Natrium regulieren, wurde durch immunhistochemische Analysen bestätigt. Schon 4 Wochen nach Transplantation wurde

im Zellsoma der transplantierten Zellen der Natriumkanaltyp  $\text{Na}_v1.1$  nachgewiesen (Abb. 28A). Zwölf Wochen nach Transplantation konnte neben  $\text{Na}_v1.1$  (Abb. 28B) auch der Natriumkanaltyp  $\text{Na}_v1.2$  immunhistochemisch detektiert werden (Abb. 28C).

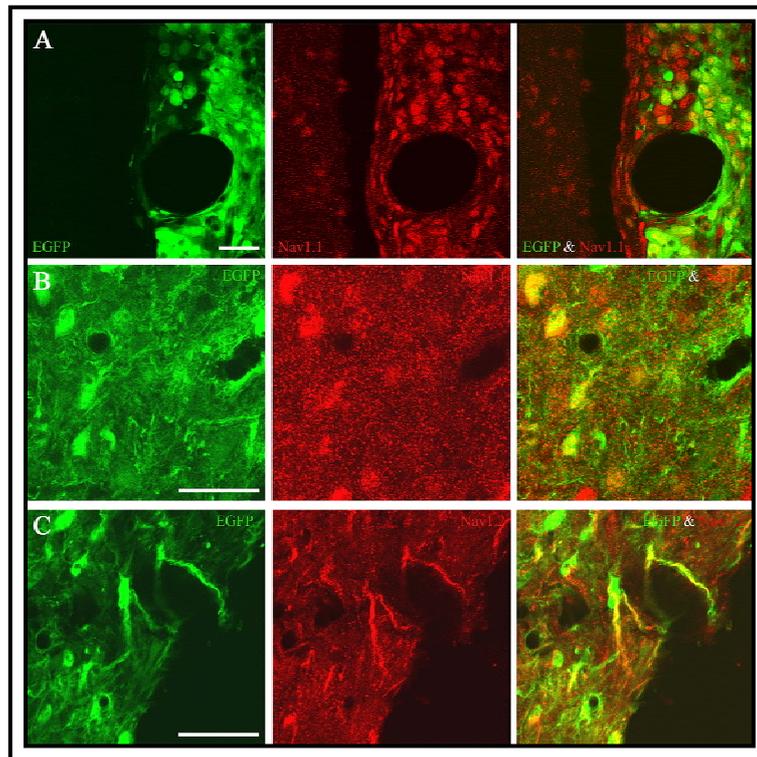
Die Auswärtsströme der EGFP+ Neurone zeigten Charakteristika einer langsamen Inaktivierung mit variierenden Zeitkonstanten von  $> 200$  ms (Abb. 26A). Ihr Schwellenwert lag bei  $-40$  mV (Abb. 26D). Nach Applikation von Tetraethylammonium (TEA, 10 mM) kam es zur Reduktion der Kalium-Auswärtsströme von  $2,3 \pm 0,8$  nA auf  $0,4 \pm 0,2$  nA ( $n = 5$ , Abb. 27B). Die Blockade der Kaliumkanäle führte zu einer starken Depolarisation des Ruhepotentials ( $E_r$ , Abb. 27C), mit der Folge, dass sich keine Aktionspotentiale mehr ausbilden konnten ( $n = 5$ , Abb. 27C).



**Abb. 26: Voltage-Clamp-Ableitungen der Neurone des Transplantats.** In A ist die Ableitung der abgebildeten EGFP+ Zelle bei Potentialen von  $-70$  bis  $+70$  mV (in  $10$  mV-Schritten,  $150$  ms,  $3$  s Intervall) zu sehen. Die Ströme wurden jeweils um die Leck- und Kapazitätsströme korrigiert. Der Pipetten-Widerstand betrug  $3,4$  M $\Omega$ . Abb. B zeigt die Strom-Spannungskurve der normierten maximalen Einwärtsströme von  $16$  Neuronen mit einem Umkehrpotential von  $+61$  mV. Die Aktivierungs- und Inaktivierungskurven der Einwärtsströme ergaben eine halbmaximale Aktivierung von  $-33,2 \pm 0,6$  mV ( $n = 16$ ) und eine halbmaximale Inaktivierung von  $-33,6$  mV  $\pm 0,5$  mV ( $n = 7$ ; C). In D ist die normierte Strom-Spannungskurve der Auswärtsströme (bei  $150$  ms,  $n = 38$ ) der transplantierten Zellen gezeigt.



**Abb. 27: Blockierung der neuronenspezifischen Natrium- und Kaliumkanäle von transplantierten Zellen durch TTX und TEA.** Abb. A zeigt einen Ausschnitt einer *Whole-cell*-Ableitung an einem Neuron des Transplantats, dessen Einwärtsströme durch Applikation von 100 nM TTX auf 11,7 % blockiert wurden ( $n = 8$ ). Durch Gabe von 10 mM TEA wurden die Auswärtsströme um 80,9 % reduziert ( $n = 5$ ; B). TEA bewirkte zudem eine Anhebung des Ruhepotentials auf 22,5 mV ( $n = 6$ ). Als Folge davon waren die Neurone des Transplantats nicht mehr in der Lage, Aktionspotentiale auszubilden (C).



**Abb. 28: Expression verschiedener Natriumkanalypen in den transplantierten Zellen 4 und 12 Wochen nach Transplantation.** Der Natriumkanalyp  $Na_v1.1$  wurde sowohl nach 4 Wochen (A) als auch nach 12 Wochen (B) im Transplantat detektiert und war vorrangig im Soma der EGFP+ Neurone lokalisiert. Der Natriumkanalyp  $Na_v1.2$ , der nach 4 Wochen nur sehr diffus im Transplantat exprimiert wurde, konnte nach 12 Wochen in den Ausläufern der EGFP+ Zellen nachgewiesen werden (C; Maßstab 25  $\mu$ m).

### 3.5.2 Ausbildung von Aktionspotentialen und Entwicklung des Ruhepotentials

Aktionspotentiale konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten in transplantierten Zellen mit neuronaler Charakteristik gemessen werden. Interessanterweise nahm die Dauer der Aktionspotentiale im Zeitraum von 3 bis 6 Wochen nach Transplantation ab, ein klares Indiz für die neuronale Reifung der transplantierten Zellen nach längerem Überleben (Abb. 29A). Dauerreize durch Strominjektionen von 1 s, die bei natürlichem Ruhepotential verabreicht wurden, animierten die transplantierten Zellen zum repetitiven Feuern (Abb. 29B). Während 4 Wochen nach Transplantation nur 2 von 13 untersuchten Zellen in der Lage waren, repetitiv zu feuern, waren es nach 7 Wochen schon 6 von 8 untersuchten Zellen. Die Fähigkeit zum repetitiven Feuern entwickelten die transplantierten Zellen sowohl beim natürlichen als auch beim fixierten Ruhepotential von -80 mV. Die Dauer der

Aktionspotentiale, die bei halbmaximaler Amplitude gemessen wurde, war mit  $6,5 \pm 0,8$  ms ( $n = 7$ ) nach 4 Wochen verhältnismäßig lang und verkürzte sich nach 7 Wochen auf  $2,2$  ms  $\pm 0,2$  ms ( $n = 6$ , Abb. 29C). Zudem war eine Zunahme der Amplitude der Aktionspotentiale von  $68,2 \pm 9,6$  mV ( $n = 7$ ) nach 4 Wochen auf  $95,9 \pm 13,7$  mV ( $n = 6$ ) nach 7 Wochen zu beobachten (Abb. 29C). Die Werte für Dauer und Amplitude der Aktionspotentiale wurden beim natürlichen Ruhepotential ( $E_r$ ) der Zellen gemessen. Wurde das Ruhepotential bei  $-80$  mV fixiert, so kam es bis zum Zeitpunkt von 5 Wochen nach Transplantation ebenfalls zu einer verkürzten Dauer der Aktionspotentiale. Nach längerer Überlebenszeit von 6 bzw. 7 Wochen zeigten sich dann jedoch keine Unterschiede mehr in der Dauer der Aktionspotentiale, egal, ob die Messungen beim natürlichen Ruhepotential oder bei einem fixierten Ruhepotential von  $-80$  mV durchgeführt wurden. Die Amplitude der Aktionspotentiale zeigte sich bei fixiertem Ruhepotential mit Werten von 118 bis 125 mV im Zeitraum von 3 bis 7 Wochen nach Transplantation unverändert (Abb. 29C). Die Entwicklung der Aktionspotentiale mit längerer Überlebenszeit der Tiere nach Transplantation, sind ein klares Indiz für die funktionelle Reifung der transplantierten Zellen.

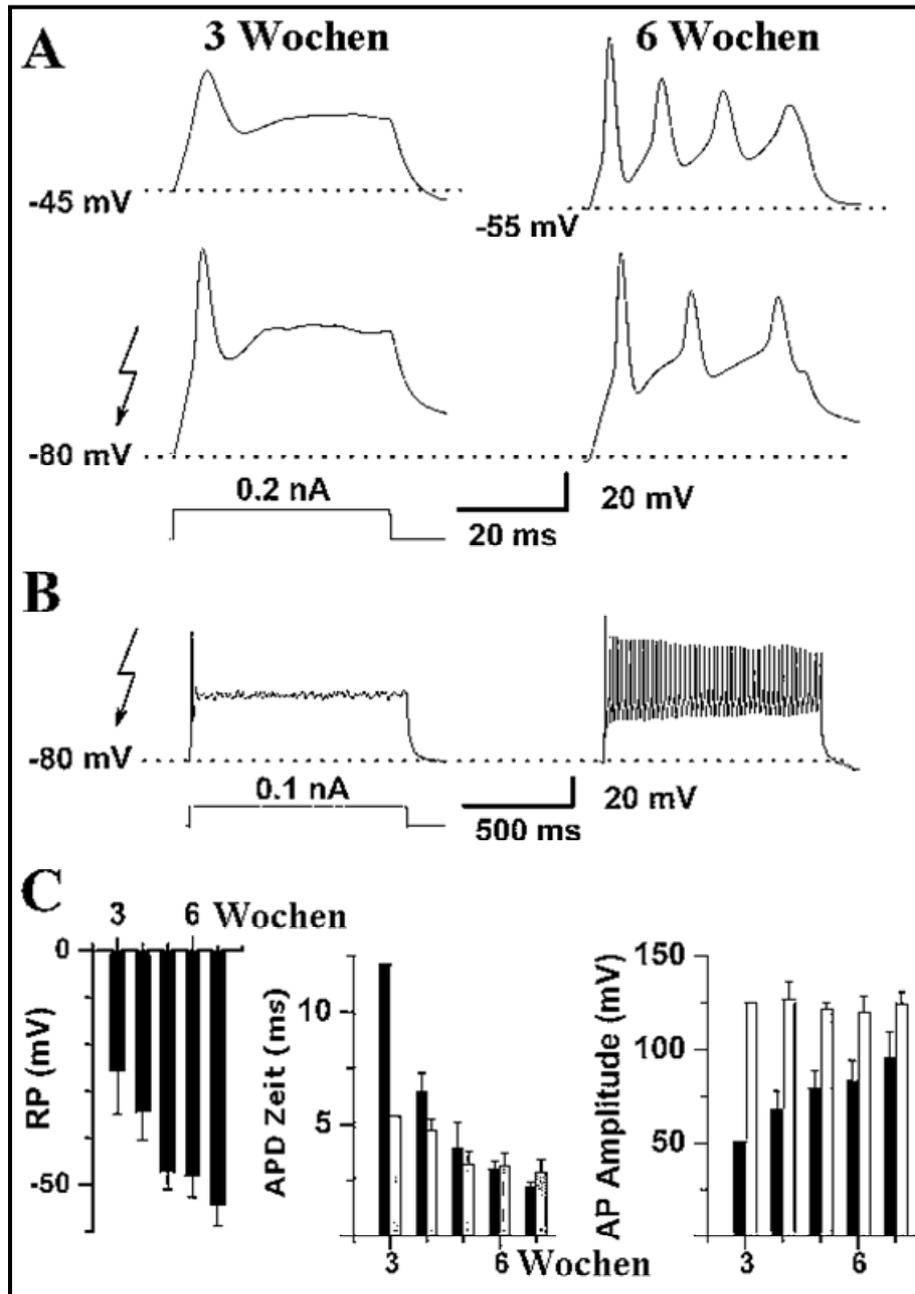
Eine Reifung des Ruhepotentials von  $-25,8 \pm 9,0$  mV nach 3 Wochen auf  $-54,5 \pm 4,3$  mV nach 7 Wochen konnte ebenfalls beobachtet werden (Abb. 29C).

### **3.5.3 Entwicklung Kalzium-abhängiger Kaliumströme**

Das Einspülen einer externen, Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-armen Lösung resultierte in einer reversiblen Reduktion des gesamten Auswärtsstromes. Dies war ein Hinweis auf das Vorhandensein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Kaliumströme. Die Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumströme resultierte letztendlich in einer verlängerten Aktionspotential-Dauer.

### 3.5.4 Entwicklung von EPSPs und EPSCs

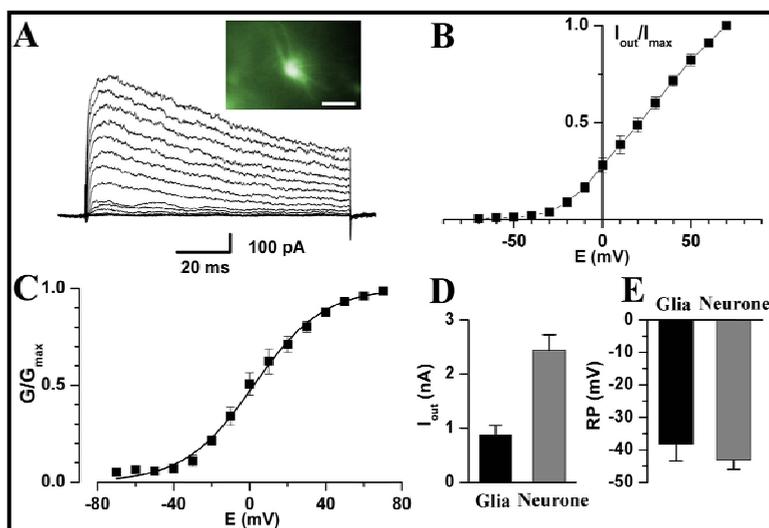
Im Zeitraum von 5 bis 7 Wochen nach Transplantation konnten spontane Einwärtsströme in den Neuronen des Transplantats detektiert werden. Die Kanäle für diese Einwärtsströme inaktivierten sich spontan innerhalb von 2 bis 4 ms bei einem fixierten Haltepotential von -60 mV. Mit einer Template-basierenden Ereignissuche mit Hilfe von pClamp 9.2 wurden kontinuierlich spannungsunabhängige Ableitungen analysiert, um den Höchstwert der Amplitude eines jeden Ereignisses bestimmen zu können, das eine minimale Amplitude von  $11,6 \pm 0,6$  pA zeigte. In der Konfiguration der Stromklemme wurden schnelle und spontane Depolarisationen unterschiedlicher Amplitude beobachtet, was für exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSPs) spricht, die aus Neuronen des Transplantats abgeleitet werden konnten. Das Vorhandensein von EPSPs resultierte bei 7 von 13 Zellen in der Bildung von Aktionspotentialen. Umgekehrt zeigten alle 7 untersuchten EGFP+ Neurone, die spontan in der Lage waren Aktionspotentiale zu generieren, bei Frequenzen von 1 bis 18,5 Hz, auch spontane EPSPs. Bei niedrigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Lösung konnte eine reduzierte Frequenz hinsichtlich Anzahl und Größe der EPSC-Amplituden gemessen werden. Außerdem war eine Verringerung der EPSPs und der Aktionspotentiale zu beobachten.



**Abb. 29: Aktionspotentiale und Ruhepotentiale der transplantierten Zellen.** A zeigt Aktionspotentiale (APs), die bei einer 40 ms dauernden Strominjektion beim natürlichen Ruhepotential der Zellen (obere Abb.) oder beim fixierten Ruhepotential von -80 mV (unteres Diagramm) gemessen wurden. Die Neurone des Transplantats waren 5 Wochen nach Transplantation außerdem in der Lage repetitiv zu feuern (1 s; B). (C) Veränderung des Ruhepotentials ( $E_r$ ) im Zeitraum von 3 bis 7 Wochen nach Transplantation ( $n = 3-10$ ; linke Abb.). Die mittlere Abb. zeigt die Dauer der APs bei  $E = 0$  mV (schwarze Säulen) und beim fixierten Ruhepotential von  $E = -80$  mV (weiße Säulen). In der rechten Abb. sind die Amplituden der APs bei natürlichem  $E_r$  (schwarze Säulen) und fixiertem  $E_r$  (-80 mV; weiße Säulen;  $n = 7-9$ ) im Zeitraum von 3 bis 7 Wochen nach Transplantation dargestellt.

### 3.5.5 Elektrophysiologische Eigenschaften der Gliazellen

Neben typischen elektrophysiologischen Eigenschaften von Neuronen konnten in 72,3 % aller untersuchten Zellen des Transplantats typische elektrophysiologische Eigenschaften von Gliazellen nachgewiesen werden ( $n = 99$ ). Da diese Zellen allerdings nicht primärer Gegenstand dieser Arbeit waren, wurden nur wenige eingehend elektrophysiologisch untersucht. Die Gliazellen unterschieden sich von den Neuronen durch ihre verzweigte Morphologie und durch das Fehlen von Einwärtsströmen (Abb. 30A, B). Der Schwellenwert der Aktivierung der Auswärtsströme lag bei  $-30$  mV (Abb. 30B). Die halbmaximale Aktivierung ( $E_{50}$ ) lag bei  $2,1 \pm 0,7$  mV mit einer Steigung von  $18,1 \pm 0,7$  mV/e (Abb. 30C). Im Vergleich zu den Neuronen des Transplantats wiesen die Auswärtsströme der Gliazellen eine dreimal kleinere Amplitude auf (Abb. 30D). Ihr Eingangswiderstand lag bei  $2,7 \pm 1,2$  G $\Omega$  und ihr Ruhepotential war mit  $-38 \pm 5,1$  mV positiver als das der untersuchten Neurone mit  $-43,1 \pm 2,8$  mV (Abb. 30E).



**Abb. 30: Charakterisierung der Ströme in den Gliazellen des Transplantats.** Abb. A zeigt die Fluoreszenzaufnahme einer untersuchten EGFP+ Gliazelle (Maßstab 10  $\mu$ m). In A ist weiterhin eine Ableitung derselben Gliazelle in der *Voltage-clamp*-Konfiguration dargestellt. Zu erkennen ist das Fehlen von einwärtsgerichteten Natriumströmen sowie das Auftreten von auswärtsgerichteten, schnell inaktivierenden Kaliumströmen. (B) Normierte Strom-Spannungskurve der auswärtsgerichteten Kaliumströme ( $n = 5$ ). (C) Die Aktivierungskurve der Auswärtsströme mit einer halbmaximalen Aktivierung von  $2,1 \pm 0,7$  mV ( $n = 5$ ). Abb. D und E vergleichen die mittleren Kaliumauswärtsströme (D) und die mittleren Ruhepotentiale (E) von EGFP+ Gliazellen ( $n = 5$ ) und EGFP+ Neuronen ( $n = 37$ ).

## 4. Diskussion

Experimentelle Schlaganfallstudien haben gezeigt, dass eine unterbrochene bzw. verminderte Blutzufuhr Gewebeschädigungen verursacht, die trotz multimodaler therapeutischer Interventionen oft irreversibel sind. Der Gewebeersatz durch Transplantation exogener Stammzellen bietet eine Alternative, geschädigte Hirnareale nach einem Schlaganfall zu regenerieren (Martinez-Vila und Irimia, 2005). Die transplantationsbasierte Zelltherapie neurodegenerativer Erkrankungen hat den Anspruch, untergegangene Zellen des ZNS zu ersetzen. Allerdings wird aus den zahlreichen präklinischen Studien der letzten Jahre zunehmend ersichtlich, dass die eingesetzten Stammzelltypen eher als „neurotrophe“ Pumpen agieren und auf diese Weise Verhaltensverbesserungen erzielen (Mahmood et al., 2004; Chen et al., 2002). Bis auf die Untersuchungen an neuralen Stammzellen (Modo et al., 2002; Veizovic et al., 2001; Saporta et al., 1999; Borlongan et al., 1998) geht aus keiner der Studien hervor, dass transplantierte Zellen zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten ausreifen. Hinzu kommt, dass die Funktionalität der Neurone und Astrozyten in keiner der bisherigen Studien überprüft wurde.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war daher die Beantwortung der Frage, ob ES-Zellen der Maus im Infarktgebiet eines ischämiegeschädigten Rattenhirns überleben und zu funktionsfähigen Neuronen ausdifferenzieren. Da uns von Ratten keine fluoreszenzmarkierten ES-Zellen zur Verfügung standen, wurden EGFP+ ES-Zellen der Maus verwendet. Diese wurden in Nestin+ neurale Vorläuferzellen vordifferenziert und 1 Woche nach Schlaganfall intrazerebral appliziert. Die vorliegenden Resultate belegen, dass die transplantierten Zellen selbst im nekrotischen Gewebe überleben und in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten ausdifferenzieren. Die funktionelle Ausreifung der vom

Transplantat gebildeten Neurone und Astrozyten konnte elektrophysiologisch durch *Patch-Clamp*-Analysen bestätigt werden.

#### **4.1 Volumen und Überleben der Transplantate 1, 4 und 12 Wochen nach Transplantation**

Zu allen Zeitpunkten nach Transplantation konnten EGFP+ Zellen im Empfängergewebe nachgewiesen werden (Abb.11; S. 52). Sogar im Schadensgebiet wurden 4 und 12 Wochen nach Transplantation EGFP+ Zellen detektiert (Abb. 11B, E, F; S. 52). Die EGFP-Fluoreszenz der transplantierten Zellen reichte zwar aus, um sie nach 12 Wochen wiederzufinden, allerdings ließ sich feststellen, dass die Fluoreszenzstärke bei Zellen mit neuronaler Differenzierung schwächer war, als bei Zellen die zu Astrozyten differenzierten. Offensichtlich wird der  $\beta$ -Actin Promotor des verwendeten EGFP-Konstruktes während der neuronalen Differenzierung herunterreguliert. Außerdem ist das EGFP-Protein hauptsächlich perinukleär konzentriert. Dies erschwerte die Identifikation möglicher axonaler Ausläufer von EGFP+ Zellen. Eine Woche nach kontralateraler Transplantation wurden in allen Tieren Transplantate gefunden. In den ipsilateral transplantierten Tieren wurden 4 Wochen nach Transplantation in 10 von 11 Tieren EGFP+ Zellen identifiziert, wobei alle 10 Tiere mediale Transplantate besaßen und 8 der 10 Tiere laterale Transplantate aufwiesen (Transplantationsschema siehe Abb. 6; S. 31) Bei der Transplantatgröße fiel auf, dass es im Zeitraum zwischen der 1. bis 4. Woche zu einer drastischen Zunahme des Transplantatvolumens kam. Vergleicht man den Wert des kontralateralen Transplantats nach 1 Woche ( $0,86 \text{ mm}^3$ ) mit dem des lateralen Transplantats nach 4 Wochen ( $7 \text{ mm}^3$ ), so lässt sich ein siebenfacher Anstieg des Volumens ersehen (wobei jeweils 100.000 Zellen transplantiert wurden). Der Volumenunterschied von  $5 \text{ mm}^3$  zwischen medialem ( $12 \text{ mm}^3$ ) und lateralem Transplantat ( $7 \text{ mm}^3$ ) nach 4 Wochen, erklärt sich durch die doppelte Zellzahl von 200.000 Zellen, die

medial appliziert wurden (Abb. 12; S. 53). Auch Hayashi et al. (2006) beobachten eine Zunahme des Transplantatvolumens von 11,5 auf 19,1 mm<sup>3</sup> im Zeitraum von 2 bis 4 Wochen nach Transplantation. Die höheren Transplantatvolumina im Vergleich zu unserer Studie resultieren aus der höheren Zahl von 100.000 bis 400.000 transplantierten Zellen (Hayashi et al., 2006).

Proliferation und Reifung der Zellen erachten wir als hauptsächliche Ursachen für den Volumenanstieg des Transplantats zwischen 1 und 4 Wochen. Der große Anteil Ki-67+ Zellen nach einer Woche belegt die hohe Zellteilungsrate des Transplantats zu diesem Zeitpunkt (Abb. 15; S. 58). Neben der zunehmenden Zellzahl ist die Ausreifung der transplantierten Zellen in Astrozyten und Neurone mit einer Volumenzunahme verbunden. Beide Zelltypen bilden Zellfortsätze aus, wodurch sich der interzelluläre Raum vergrößert. Während Neurone über Axone und Dendriten Kontakt zu entfernter gelegenen Zellen aufnehmen, bilden Astrozyten Fortsätze aus, mit deren Oberfläche sie den neuronalen Zellkörper sowie große Teile der Dendriten bedecken.

Durch den Untergang verschiedener Zelltypen nach einer Ischämie bilden sich Hohlräume aus, in denen zunächst Ödeme entstehen. Später bauen reaktive Astrozyten Glianarben auf, durch die das verbleibende Gewebe strukturell erhalten wird. Die neuronalen Vorläuferzellen finden somit nach ihrer Transplantation ein strukturelles Netzwerk vor, in welches sie sich integrieren können. Durch den Zellverlust im Gewebe haben sie zudem genügend Platz um sich zu entwickeln und miteinander zu vernetzen. Sowohl die Nissl-Färbungen als auch die EGFP-Fluoreszenz verdeutlichen einen physischen Kontakt zwischen Empfängergewebe und Transplantat (Abb. 11B, E; S. 52). Ob Blutgefäße direkt aus dem Empfängergewebe in das Transplantat gewachsen sind, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht genau belegen. Zumindest ließen sich im Transplantat selbst kleinere gefäßähnliche Strukturen erkennen. In Übereinstimmung mit unseren Daten stehen die Ergebnisse von Duan et al. (1998), die neurale Stammzellen direkt ins Quinolinsäure-geschädigte Striatum

applizierten. Nach der Transplantation ließen sich im Entzündungsgebiet genauso viele Zellen nachweisen wie nach Transplantation ins ungeschädigte Gewebe. Außerdem bildeten sich im Bereich der Entzündung größere Transplantate, deren Dichte geringer war als bei den Transplantaten im ungeschädigten Striatum. Zwei kürzlich publizierte Transplantationsstudien an experimentellen Schlaganfallmodellen demonstrierten, dass aus ES-Zellen abgeleitete neuronale Vorläuferzellen nach Transplantation ins geschädigte Hirnareal überleben und in verschiedene Neuronentypen und Gliazellen ausdifferenzieren (Hayashi et al., 2006; Takagi et al., 2005). Das Anwachsen der transplantierten Zellen in der geschädigten Hemisphäre wird vermutlich durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren unterstützt. So ist belegt, dass durch Schädigung aktivierte Astrozyten und Mikrogliazellen Wachstumsfaktoren wie BDNF, NGF, NT-3 und NT-4/5 sezernieren (Lee et al., 2002; Miwa et al., 1997; Elkabes et al., 1996). Durch GFAP-Färbungen konnten wir eine hohe Ansammlung endogener Astrozyten nachweisen, die das Transplantat vollständig umschlossen. Charakteristisch für diese Astrozyten war eine starke GFAP- sowie Nestin-Expression, deren funktionelle Bedeutung unklar ist (Abb. 13A-F; S. 56). Eine solche Ansammlung spezifischer Astrozyten, die bereits von Deacon et al. (1998) beschrieben wurde, wird gemeinhin als Astrozytennarbe bezeichnet. Auszuschließen ist aber auch nicht, dass die starke und langanhaltende Nestin-Expression in endogenen Astrozyten durch sekretierte Faktoren des Transplantats ausgelöst wurde. Es ist außerdem bekannt, dass Astrozyten des Empfängergewebes immunsuppressive Faktoren wie TGF- $\beta$  oder IL-10 sezernieren, die das Einwandern immunkompetenter Zellen ins Transplantat verhindern (Frei et al., 1994; Devaiyothi et al., 1993). Dieser Aspekt könnte erklären, weshalb bis zu 4 Wochen nach Transplantation außerordentlich viele Zellen überlebten.

Im Zeitraum von 4 bis 12 Wochen nach Transplantation war eine drastische Abnahme des Transplantatvolumens bzw. das vollständige Verschwinden der transplantierten Zellen in

mehr als der Hälfte der Tiere zu beobachten. Von 10 transplantierten Tieren wiesen 4 Transplantate auf, von denen 2 medial und 2 lateral lokalisiert waren. Das durchschnittliche Volumen der Transplantate (lateral:  $0,37 \text{ mm}^3$ , medial:  $0,065 \text{ mm}^3$ ) war im Vergleich zu 4 Wochen auf 0,5 bis 2 % geschrumpft (Abb. 12; S. 53). Der Verlust an transplantierten Zellen ist vermutlich auf Abstoßungsprozesse des Empfängergewebes zurückzuführen. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Überlebensfähigkeit und Differenzierbarkeit transplantiertes ES-Zellen im ischämischen Hirngebiet von Schlaganfall geschädigten Ratten. Ein möglicher Abstoßungsprozess sollte deshalb dokumentiert, der zugrunde liegende Mechanismus jedoch nicht im Detail untersucht werden. Bereits ältere Studien zeigten, dass Mikrogliazellen und infiltrierende T-Zellen die zellulären Hauptakteure bei dieser auch als *Host versus Graft* genannten Transplantatabstoßung sind (Finsen et al. 1991; Poltorak und Freed 1989). Finsen et al. zeigten dabei, dass die Expression von MHC II Molekülen auf diesen Zellen hochreguliert wird und dies möglicherweise von einer verstärkten Expression von MHC I Molekülen auf den Donorzellen begleitet wird. Beides führt zu einer Stimulierung von T-Killerzellen des Empfängers und zur Transplantatabstoßung. Die Tatsache, dass 10 von 11 Tieren nach 4 Wochen noch ein Transplantat besaßen, währenddessen nach 12 Wochen nur in 4 von 10 Tieren Transplantate nachweisbar waren, die zudem noch sehr klein waren, belegt einen fortschreitenden Abstoßungsprozess. Dieser ging einher mit einer langandauernden Infiltration ED1+ Zellen (Abb. 23C, D; S. 68), die das Transplantat infiltrierten, es umsäumten und zahlreich in angrenzenden Blutgefäßen akkumulierten. Medial lokalisierte Transplantate wurden verstärkt von ED1+ Zellen anvisiert, die aus dem lateralen Ventrikel ins Gewebe übertraten. Da der ED1-Antikörper lysosomale Proteine sowohl von Makrophagen als auch von aktivierten Mikrogliazellen erkennt, ist eine genaue Identifikation dieser Zelltyps nicht möglich. Die abgerundete amöboide Morphologie und die starke Eigenfluoreszenz deuten allerdings stark auf Makrophagen hin. Es befanden sich

außerdem viele mitotisch aktive endogene Zellen innerhalb des Transplantats sowie im angrenzenden Empfängergewebe und in den Blutgefäßen. Mit keinem der untersuchten neuronalen und glialen Marker konnte eine Kolokalisation dieser Zellen beobachtet werden. Morphologisch betrachtet könnte es sich hierbei um Leukozyten handeln. Die Transplantation von ES-Zellen der Maus in Ratten, eine sogenannte Xenotransplantation, war vermutlich ein zusätzlicher Stimulus für die Abstoßungsreaktionen.

An Ratten durchgeführte Transplantationsstudien mit Mauszellen belegen, dass die Fremdzellen in erster Linie durch aktivierte Lymphozyten und Mikrogliazellen erkannt werden (Brevig et al., 2000). Nach Aktivierung der T-Lymphozyten setzen diese Mitogene wie z.B. Interleukine frei, die eine verstärkte Proliferation der T-Zellen induzieren. Die Mikrogliazellen reifen außerdem zu Makrophagen und dendritischen Zellen heran und entwickeln sich zu Antigen-präsentierenden Zellen (APCs; Santambrogio et al., 2001; Banchereau und Steinmann, 1998). Ursächlich für die verspätete Abstoßung des Transplantats nach 12 Wochen könnte eine zu geringe Dosierung des Immunsuppressivums Cyclosporin A sein. Wir verwendeten eine allgemein übliche Konzentration von 10 mg/ kg (Thinyane et al., 2005; Kim et al., 2002; Borlongan et al., 1998). Cyclosporin A hemmt hochselektiv die Proliferation von T-Lymphozyten (CD8<sup>+</sup>-Zellen, CD4<sup>+</sup>-Zellen) und indirekt die der B- Lymphozyten. Bis zu 4 Wochen nach Transplantation wurden die Tiere täglich mit Cyclosporin A behandelt. Von diesem Zeitpunkt an wurde Cyclosporin A nur noch jeden 2. Tag appliziert. Es ist daher möglich, dass die geringere Dosierung innerhalb der letzten 8 Wochen den Abstoßungsprozess durch T-Lymphozyten begünstigt hat. Dennoch wurde oftmals gezeigt, dass es trotz Unterdrückung des Immunsystems mit Cyclosporin A zu einer Abstoßung im Empfängergewebe kam (Wennberg et al., 2001; Larsson et al., 2000). Dass die alleinige Gabe des Immunsuppressivums die Abstoßungsreaktionen nicht vollständig unterbinden kann, belegen auch experimentelle und klinische Befunde, wonach eine Tripplemedikation

aus Prednisolon, Azathioprin und Cyclosporin A das Überleben der Transplantate um einiges verbesserten (Pedersen et al., 1995). Hinzu kommt, dass Cyclosporin A spezifisch gegen T-Lymphozyten wirkt, während die von Mikrogliazellen induzierte Abstoßung nicht medikamentös supprimiert wurde. Dafür eignen könnte sich der Makrophagen / Mikroglia inhibierende Faktor MIF, der die Aktivierung von Mikrogliazellen hemmt (Wang und Tsirka, 2005). Auf lange Sicht dürfte jedoch die Immunsuppression der Mikrogliazellen das Überleben des Transplantats nicht verbessern, da die neuroprotektive Wirkung der Mikrogliazellen durch Freisetzung von Neurotrophenen unterdrückt wird (Lee et al., 2000; Miwa et al., 1997; Elkabes et al., 1996).

#### **4.2 Differenzierung und Migration der kontralateral applizierten**

##### **neuralen Vorläuferzellen 1 Woche nach Transplantation**

Während die applizierten Zellen zum Zeitpunkt der Transplantation Nestin<sup>+</sup> waren, hatten sie nach einer Woche das Entwicklungsstadium der Nestin<sup>+</sup> neuralen Vorläuferzelle verlassen und begannen sich in junge DCX<sup>+</sup> Neurone zu differenzieren (Abb. 14 A, B; S. 57). Hierbei fällt auf, dass ausschließlich randständige EGFP<sup>+</sup> Zellen DCX exprimierten, wohingegen im Kern des Transplantats keine neuronale Differenzierung zu beobachten war. Dieses Resultat legt die Vermutung nahe, dass der Zell-Zellkontakt zwischen Empfängergewebe und Transplantat induzierend auf die neuronale Differenzierung wirkte. Allerdings befanden sich zu diesem Zeitpunkt weder NeuN<sup>+</sup> Neurone (Abb. 14C, D; S. 57) noch GFAP<sup>+</sup> Astrozyten (13C, D; S. 56) im Transplantat. Ursache dafür könnte sein, dass sich 80 bis 90 % der transplantierten Zellen in der Zellteilung befanden.

Vorangegangene Transplantationsstudien berichten von einem starken Migrationspotential muriner ES-Zellen in Richtung Schädigung, wenn diese nach einem Schlaganfall in die ungeschädigte kontralaterale Hemisphäre transplantiert wurden (Hoehn et al., 2002). Im Gegensatz dazu zeigten die murinen vordifferenzierten ES-Zellen in unserer Studie nur

eine geringfügige Tendenz zur Migration. Zwar ließen sich vereinzelt EGFP<sup>+</sup> Zellen beobachten, die bis zu 300 µm ins umliegende Empfängergewebe wanderten und häufig mit DCX kolokalisiert waren (Abb. 14A; S. 57), im Schädigungsgebiet selbst konnten jedoch nach 1 Woche keine EGFP<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden. Eine Ursache für das geringe Migrationsvermögen könnte sein, dass die transplantierten Zellen im Unterschied zu den von Hoehn et al. verwendeten Zellen bereits vordifferenziert waren. Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass auch neurale Stammzellen (Modo et al., 2002; Veizovic et al., 2001) und humane aus ES-Zellen abgeleitete neurale Vorläuferzellen (Tabar et al., 2005) in der Lage waren zu migrieren. Von endogenen neuronalen Stammzellen ist bekannt, dass ihre Migration von Faktoren gesteuert wird, die von Zellen im Schadensgebiet freigesetzt werden. So sezernieren Astrozyten in der ischämischen Randzone SDF-1 $\alpha$  und induzieren die Migration neuraler Stammzellen durch Bindung an deren Chemokin-Rezeptor CXCR4 (Imitola et al., 2005). Es ist also möglich, dass die Konzentration von SDF-1 $\alpha$  1 Woche nach eMCAO nicht mehr ausreichend war um eine Migration der transplantierten Zellen in Richtung Schaden zu induzieren. Möglicherweise wirkt auch die Expression des Zelladhäsionsmoleküls NCAM inhibitorisch auf die Migration. NCAM ist ein Glykoprotein, das auf den Nestin<sup>+</sup> Vorläuferzellen zum Zeitpunkt der Transplantation exprimiert wurde. Es induziert Bindungsreaktionen mit Adhäsionsmolekülen benachbarter Zellen und fördert so deren interzellulären Zusammenhalt. Gerade dies könnte jedoch das Migrieren der transplantierten Zellen ins umliegende Empfängergewebe erschwert haben. Bereits erwähnt wurde die Glianarbe, die sich um das Transplantat und den Einstichkanal der Applikationsnadel bildete. Diese Ansammlung endogener Astrozyten, die stark Nestin und GFAP exprimierten, war mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Migrationsbarriere für die transplantierten Zellen (Abb. 13C-F; S. 56). Es ist außerdem bekannt, dass NG2<sup>+</sup> Oligodendrozytenvorläufer verstärkt in Glianarben akkumulieren. NG2 ist ein Matrixmolekül, das unter *in vitro* Bedingungen die Migration von Neurosphen hemmt

(Kearns et al., 2003). Interessanterweise konnte in dieser Studie nach 1 Woche eine starke Anreicherung NG2<sup>+</sup> Zellen um das Transplantat beobachtet werden (Abb. 13G, H; S. 56). Es ist daher möglich, dass aktivierte endogene Oligodendrozytenvorläufer neben der von Astrozyten gebildeten Glianarbe, die Migration der transplantierten Zellen verhindert haben. Die fehlende Migration führte letztendlich dazu, dass das Transplantat als kompakter Zellhaufen angeordnet blieb, was sich besonders eindrucksvoll in der Ki-67-Färbung erkennen ließ (Abb. 15; S. 58).

### **4.3 Differenzierung der ipsilateral applizierten Vorläuferzellen**

#### **4 und 12 Wochen nach Transplantation**

Erste Transplantationsexperimente an den Tiermodellen des Morbus Parkinson und der Chorea Huntington erbrachten den Befund, dass neurale Vorläuferzellen nicht nur in der Lage sind, in den geschädigten Hirnregionen zu überleben. Sie bilden auch dopaminerge bzw. GABAerge Neurone aus, die motorische Verhaltensverbesserungen induzieren (Isacson et al., 1986; Redmond et al., 1986; Perlow und Freed, 1979). Der Schlaganfall unterscheidet sich von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Chorea Huntington darin, dass nicht nur ein neuronaler Subtyp betroffen ist, sondern verschiedenste Neuronentypen, Astrozyten, Oligodendrozyten und Endothelzellen als Gewebeverband absterben. Dass ES-Zellen *in vitro* unter bestimmten Kulturbedingungen in neuronale und gliale Zellen ausreifen, ist schon oft beschrieben worden (Reubinoff et al., 2001; Lee et al., 2000; Brüstle et al., 1999; Li et al., 1998; Finley et al., 1996; Okabe et al., 1996; Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strübing et al., 1995). Diese Arbeit demonstriert, dass sich ES-Zellen abgeleitete neurale Vorläuferzellen nach Transplantation in das ischämische Infarktgebiet in Neurone, Astrozyten und zu einem geringen Prozentsatz in Oligodendrozyten entwickeln (Abb. 17A-C; S. 61 und 23A-B; S. 68). Sogar unterschiedliche Neuronentypen, die anhand ihrer Transmitter-Expression unterschieden

wurden, konnten nach 4 Wochen im Transplantat detektiert werden. Neben GABAergen, cholinergen und serotonergen Neuronen wurden striatale Neurone nachgewiesen, die DARPP32 und Substanz P exprimierten (Abb. 19A-D; S. 64 und 20A-C; S. 65). Die Neurone und Astrozyten konnten bis zu 12 Wochen nach Transplantation detektiert werden. Der immunhistochemische Nachweis von NeuN zeigte, dass sich sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen zwischen 25 und 30 % der EGFP+ Zellen zu reifen Neuronen entwickelt hatten (Abb. 18A; S. 62). Bezüglich des Gehalts an Neuronen konnten zwischen dem medialen und lateralen Transplantat keine Unterschiede festgestellt werden. Der Anteil an Neuronen ist vergleichbar mit den Daten von Wei et al. (2005), die bereits zwei Wochen nach Transplantation neural vordifferenzierter ES-Zellen der Maus in ein Schlaganfallmodell der Ratte 34 % Neurone quantifizierten. Der hohe Gehalt an Neuronen zu diesem frühen Zeitpunkt nach Transplantation, kann durch Unterschiede im Differenzierungsprotokoll der ES-Zellen erklärt werden. Während Wei et al. Retinolsäure zur Vordifferenzierung der ES-Zellen nutzten, erfolgte die Vordifferenzierung der in dieser Arbeit verwendeten ES-Zellen nach einem leicht modifizierten, fünf Stadien umfassenden Differenzierungsprotokoll (Lee et al., 2000; Okabe et al., 1996). Neben NeuN war in unseren Transplantaten eine starke Expression früher neuronaler Marker zu beobachten. Beide Marker, DCX und  $\beta$ III-Tubulin, wurden jedoch so reichlich gebildet, dass sie einzelnen Zellen nicht zugeordnet werden konnten und eine Quantifizierung unmöglich war (Abb. 16B-C; S. 60). Es lässt sich dennoch aus diesen Beobachtungen schließen, dass sich viele transplantierte Zellen in der Entwicklung zu reifen Neuronen befanden. Hayashi et al. (2006) quantifizierten 4 Wochen nach Transplantation 20 % GABAerge Neurone, 12,9 %, cholinerge und 5,7 % Parvalbumin+ Neurone. Weiterhin hatten sich 4,8 % der Zellen zu DARPP32+ Neuronen und 0,9 % zu serotonergen Neuronen entwickelt. Die beiden letzten Werte sind gut mit den Daten dieser Arbeit vergleichbar, da 4 Wochen nach Transplantation 6,4 % der Zellen DARPP32 und 1,3 % der Zellen Serotonin exprimierten.

Im Gegensatz dazu war der Gehalt an cholinergen Neuronen mit 1,3 % und Parvalbumin+ Neuronen, deren Anteil aufgrund des geringen Vorkommens nicht quantifizierbar war, deutlich unter den Werten der japanischen Gruppe (Abb. 21; S. 66). Der Prozentsatz GABAerger Neurone, der in unseren Transplantaten schätzungsweise zwischen 80 und 90% betrug, lag interessanterweise um ein Vierfaches höher als bei Hayashi et al. Erklärbar wären diese Unterschiede damit, dass Hayashi et al. ES-Zellen aus Primaten verwendet haben, während die ES-Zellen in unserer Studie aus der Maus stammten. Weiterhin könnte zu den Unterschieden beigetragen haben, dass die ES-Zellen aus Primaten bereits  $\beta$ III-Tubulin, einen frühen neuronalen Marker, zum Zeitpunkt der Transplantation exprimierten und damit weiter vordifferenziert waren als die murinen ES-Zellen. Während Hayashi et al. die Zellen schon 24 Stunden nach Schädigung transplantierten, wurden die ES-Zellen in dieser Studie erst nach 7 Tagen appliziert. Hayashi et al. benutzten zudem Mäuse als Rezipienten, die einer transienten Schädigung durch das „Fadenmodell“ unterlagen. In unserer Studie wurden Ratten nach einem Endothelin-induzierten Verschluss der mittleren Zerebralarterie (eMCAO) verwendet.

Recht auffällig in unserer Studie war der hohe Anteil GABAerger Neurone innerhalb des Transplantats (Abb.19A-B; S. 64). In der neuronalen Entwicklung wird  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) noch vor Ausbildung der Synapsen am axonalen Wachstumskegel sekretiert und hat großen Einfluss auf die Proliferation, Migration und Dendritenreifung (Represa und Ben-Ari, 2005; Gao und van den Pol, 2000). Außerdem bewirkt GABA die Freisetzung des neuronalen Wachstumsfaktors BDNF und fungiert als exzitatorischer Transmitter, der Membran-Depolarisationen auslösen kann und damit die Ausbildung von Aktionspotentialen und die Öffnung von Kalziumkanälen steuert (Obrietan et al., 2002). Geht man davon aus, dass die Entwicklung der transplantierten Zellen im Empfängergewebe ähnlich verläuft wie in der ontogenetischen Entwicklung, dann sprechen die immunhistochemischen Daten überzeugend dafür, dass sich die Zellen

morphologisch in das teils bestehende und teils geschädigte Nervengewebe integrieren. Die transplantierten Zellen sind damit nicht nur in der Lage zu differenzieren, sie produzieren auch trophische Faktoren wie z.B. GABA, die ihre Entwicklung positiv beeinflussen. Ein weiterer Wachstumsfaktor, der 4 Wochen nach Transplantation vereinzelt in den EGFP+ Zellen nachgewiesen werden konnte, ist der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2, Abb. 22; S. 66). FGF-2 wird in Gliazellen und distinkten Neuronenpopulationen gebildet. Er agiert einerseits als Mitogen, das die Proliferation neuraler Vorläuferzellen anregt (Ford-Perriss et al., 2001), andererseits stimuliert er die Differenzierung von neuronalen Vorläufern und Gliazellen (Dono et al., 1998; Speliotos et al., 1996). Nach ischämischer Verletzung wird FGF-2 verstärkt von Neuronen und Gliazellen der geschädigten Hemisphäre gebildet und außerdem von Makrophagen und Endothelzellen sezerniert (Issa et al., 2005). In diesem Zusammenhang lässt sich schlussfolgern, dass FGF-2 die Entwicklung der transplantierten Zellen beeinflusst. Seine Expression im Transplantat könnte u.a. durch die Schädigung im Empfängergewebe induziert worden sein. Andererseits zeugt die FGF-2-Expression von einer möglichen gerichteten Selbstorganisation des Transplantats.

Aus ES-Zellen abgeleitete gliale Vorläuferzellen differenzierten erfolgreich zu Astrozyten und Oligodendrozyten (Scheffler et al., 2003; Brüstle et al., 1999). Im Gegensatz zu Oligodendrozyten, die schon erfolgreich in Tiere mit Myelindefekt transplantiert wurden (Brüstle et al., 1999), schenkte man jedoch der Transplantation von Astrozyten bislang wenig Aufmerksamkeit (Gates et al., 1998; Zhou und Lund, 1993). Dies überrascht insofern, da Astrozyten bei der Versorgung von Neuronen mit Nährstoffen und Sauerstoff fungieren, den Abtransport neuronaler Stoffwechselprodukte ( $\text{CO}_2$ ) und überschüssiger Ionen ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) übernehmen und freigesetzte Neurotransmitter wie Glutamat und Dopamin abbauen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt an Astrozyten im medialen und lateralen Transplantat mit Hilfe des für Astrozyten typischen

Intermediärfilaments GFAP bestimmt. Nach 4 Wochen hatten sich 6 bis 8 % und nach 12 Wochen 7 bis 9 % der transplantierten Zellen zu GFAP+ Zellen entwickelt (Abb. 18 B; S. 62). Die Daten verdeutlichen, dass der Anteil an Astrozyten zu beiden untersuchten Zeitpunkten annähernd gleich war. Auch zwischen medialem und lateralem Transplantat konnten bezüglich des Anteils an Astrozyten keine Unterschiede festgestellt werden. Noch heute ist wenig bekannt über die funktionelle Integration exogen applizierter Gliazellen im Empfängergewebe. Lediglich eine Arbeit demonstrierte, dass sich gliale Vorläuferzellen nach Transplantation auf hippocampale Schnittkulturen funktionell in das Netzwerk integrieren und über *Gap Junctions* mit Astrozyten des Empfängergewebes interagieren (Scheffler et al., 2003). Trotzdem ist der Zellersatz von Gliazellen nach einem Schlaganfall ebenso wichtig wie der Ersatz von Nervenzellen. Nur das Zusammenspiel zwischen Neuronen und Astrozyten bzw. Oligodendrozyten unterstützt die funktionelle Integration der transplantierten Zellen im Empfängergewebe und ermöglicht ein langfristiges Überleben der Zellen.

#### **4.4 Elektrophysiologische Eigenschaften der Neurone und Astrozyten des Transplantats**

Die vorliegende Arbeit zeigt als eine der ersten Studien die Entwicklung von reifen und funktionstüchtigen Neuronen aus ES-Zellen abgeleiteten Vorläuferzellen nach Transplantation in Ratten mit einem experimentellen Schlaganfall. In einem Drittel der transplantierten Zellen wurden im Zeitraum von 3 bis 7 Wochen nach Transplantation Aktionspotentiale und spannungsabhängige Natrium- und Kaliumströme gemessen (Abb. 26; S. 72). Nach externer Applikation von 100 nM Tetrodotoxin (TTX) konnten die Einwärtsströme blockiert werden, eine Eigenschaft, die typisch für spannungsabhängige TTX-sensitive Natriumkanäle ist (Scholz und Vogel, 2000; Abb. 27A; S. 73). TTX, ein Nervengift aus dem Kugelfisch, induziert eine reversible Blockade spannungsabhängiger

Natriumkanäle. Neun verschiedene Subtypen spannungsabhängiger Natriumkanäle sind derzeit bekannt ( $\text{Na}_v1.1$  bis  $\text{Na}_v1.9$ ; Goldin et al., 2000). Aufgrund unterschiedlicher Affinitäten für TTX unterscheidet man zwischen TTX-sensitiven und TTX-resistenten Isoformen von spannungsabhängigen Natriumkanälen. Während TTX bei sensitiven Natriumkanälen bereits in nanomolarer Konzentration wirkt, wird bei TTX-resistenten Natriumkanälen eine Blockade der Natriumpermeabilität erst im mikromolaren Bereich erreicht (Marban et al., 1998). Die im ZNS vorherrschenden Natriumkanaltypen  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$  und  $\text{Na}_v1.6$  sind alle TTX-sensitiv. Die kinetischen Parameter der Natriumströme in den transplantierten Zellen waren charakteristisch für den Natriumkanaltyp  $\text{Na}_v1.1$ , der im ZNS am häufigsten zu finden ist (Goldin et al., 2000). Die Existenz von  $\text{Na}_v1.1$  in den EGFP+ Zellen wurde mit spezifischen Antikörpern 4 und 12 Wochen nach Transplantation immunhistochemisch bestätigt (Abb. 28A-B; S. 74). Neben  $\text{Na}_v1.1$  wurde nach 12 Wochen auch der Natriumkanaltyp  $\text{Na}_v1.2$  im Transplantat nachgewiesen (Abb. 28C; S. 74). Während  $\text{Na}_v1.1$  vorwiegend im Soma exprimiert wurde, konnte  $\text{Na}_v1.2$  in den Fortsätzen der Neurone detektiert werden. Diese Daten stimmen gut mit den beschriebenen Verteilungsmustern überein. Demnach wird  $\text{Na}_v1.1$  verstärkt im Soma von Neuronen gebildet, wohingegen  $\text{Na}_v1.2$  in unmyelinisierten Axonen dominiert (Gong et al., 1999; Westenbroek et al., 1989).

Elektrophysiologische Untersuchungen an Neuronen, die sich aus ES-Zellen entwickelt hatten, wurden erstmals vor 10 Jahren an einschichtig wachsenden Kulturen durchgeführt (Finley et al., 1996; Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Strübing et al., 1995). Die damaligen Studien hatten gezeigt, dass aus ES-Zellen abgeleitete Neurone *in vitro* spannungsabhängige Ionenströme, Aktionspotentiale sowie inhibitorische und exzitatorische Synapsen bilden. Erst in den letzten Jahren wurden vordifferenzierte ES-Zellen unter *in vivo* Bedingungen auf ihre neuronale Funktionalität geprüft, nachdem sie in Mausembryonen (Wernig et al., 2004), Parkinson- (Kim et al., 2002) und Epilepsie-Ratten

(Rüschenschmidt et al., 2005) sowie auf hippokampale Schnittkulturen (Benninger et al., 2003) transplantiert wurden. Ähnlich zu unseren Ergebnissen entwickelten sich in diesen Arbeiten die vordifferenzierten ES-Zellen nach ihrer Transplantation ebenfalls in reife Neurone, die spannungsabhängige einwärtsgerichtete Natriumströme und auswärtsgerichtete Kaliumströme aufwiesen und in der Lage waren, Aktionspotentiale auszubilden. In der vorliegenden Arbeit konnten wir jedoch die funktionelle Reifung im Kontext einer Transplantation nach Schlaganfall zeigen.

Neben spannungsabhängigen Natriumkanälen gehören Kaliumkanäle zu den entscheidenden molekularen Grundbausteinen für die Ausbildung von Aktionspotentialen in Neuronen. Der Nachweis von auswärtsgerichteten Kaliumströmen in den transplantierten EGFP+ Zellen war somit ein weiteres Indiz für die neuronale Funktionalität dieser Zellen. Mit der langsamen Inaktivierungskinetik und der Blockade der auswärtsgerichteten Kaliumströme durch Tetraethylammonium (TEA) konnten zwei charakteristische Merkmale neuronaler Kaliumkanäle gefunden werden (Abb. 26B; S. 72). Die aus ES-Zellen abgeleiteten Neurone besaßen damit die molekularen Voraussetzungen für die Ausbildung von Aktionspotentialen. Tatsächlich konnten in den EGFP+ Zellen Aktionspotentiale gemessen werden. Mit längerer Überlebenszeit der transplantierten Zellen im Empfängergewebe war sogar eine Veränderung der Aktionspotentiale zu beobachten (Abb. 29A; S. 77). Diese war gekennzeichnet durch steigende Amplituden und eine verkürzte Aktionspotentialdauer (Abb. 29C; S. 77). Beides sind klare Indizien für die neuronale Reifung der transplantierten Zellen im Zeitraum von 3 bis 6 Wochen nach Transplantation. Außerdem waren die Zellen zunehmend in der Lage, repetitiv zu feuern, was bedeutet, dass sie mehrere Aktionspotentiale hintereinander ausbildeten (Abb. 29B; S. 77). Die Fixierung des Ruhepotentials bei  $-80$  mV führte zu höheren Amplituden der Aktionspotentiale. Offensichtlich ist dies auf eine erhöhte Anzahl aktivierbarer Natriumkanäle zurückzuführen. So lässt sich aus der Inaktivierungskurve ersehen, dass ein

hoher Teil der Natriumkanäle bei einem Ruhepotential von -30 bis -45 mV inaktiviert blieb, während sich die meisten Natriumkanäle bei -80 mV öffnen ließen (Abb. 25C; S. 70). Die Reifung der transplantierten Zellen zu funktionellen Neuronen konnte damit in zweifacher Weise belegt werden. Zum einen durch den immunhistochemischen Nachweis der Expression von Markerproteinen verschiedener Reifestufen (DCX,  $\beta$ III-Tubulin und NeuN) und zum anderen durch die elektrophysiologischen Untersuchungen. Eine Reifung der Aktionspotentiale von ES-Zell-abgeleiteten Neuronen beschreiben auch Benninger et al. (2003) nach Applikation vordifferenzierter ES-Zellen auf hippokampale Hirnschnitte und Rüschemschmidt et al. (2005) nach Transplantation der Zellen in epileptische Ratten. Im Gegensatz zu unserer Arbeit wurden bei beiden Transplantationsstudien jedoch humane ES-Zellen eingesetzt. Benninger et al. (2003) berichten weiterhin von einer Abnahme des Ruhepotentials nach längerer Überlebenszeit der transplantierten Zellen. Auch wir konnten beobachten, dass das Ruhepotential negativer wird, je länger die transplantierten Zellen im Empfängerorganismus überlebten.

Eine wichtige Voraussetzung für die Kommunikation zwischen Neuronen ist die Ausbildung synaptischer Kontakte. Mit dem immunhistochemischen Nachweis des präsynaptischen Vesikelproteins SV2 erhielten wir bereits einen ersten Hinweis, dass die transplantierten Zellen Synapsen ausbilden (Abb. 20D; S. 65). Mit der Messung spontaner exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (EPSPs) und exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSCs) in den EGFP<sup>+</sup> Zellen konnte gezeigt werden, dass die transplantierten Zellen einen synaptischen Eingang erhalten (Abb. 29 D-G; S. 77). Als Antwort auf diesen synaptischen Eingang erzeugten die Zellen Aktionspotentiale unterschiedlicher Frequenzen, eine Eigenschaft, die auch für corticale Netzwerke charakteristisch ist (Antkowiak et al., 2002). EPSCs wurden bereits an Neuronen beschrieben, die sich nach Transplantation in Mausembryonen aus vordifferenzierten ES-Zellen entwickelt hatten (Wernig et al., 2004). Allerdings bedurfte es zum elektrophysiologischen Nachweis dieser

EPSCs einer vorherigen externen Stimulation. Auch andere Gruppen wiesen postsynaptische Potentiale an ES-Zell-abgeleiteten Neuronen nach. Zusätzlich zu EPSCs wurden inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSCs) gemessen, deren hemmende Wirkung über  $\gamma$ -Aminobuttersäure vermittelt wurde, während die nachgewiesenen EPSCs durch Freisetzung von Glutamat hervorgerufen wurden (Rüschenschmidt et al., 2005; Wernig et al., 2004; Benninger et al., 2003).

Ob die abgeleiteten Zellen den synaptischen Eingang von anderen transplantierten Zellen erhielten oder vom Empfängergewebe selbst, ist aus unseren Daten nicht ersichtlich. Die Tatsache, dass die EPSPs von abgeleiteten Zellen gebildet wurden, die wir einige hundert Mikrometer entfernt vom Zentrum des Transplantats fanden, lässt jedoch vermuten, dass der synaptische Eingang von Zellen des Empfängergewebes kam. Um dies experimentell zu belegen, wäre es notwendig gewesen, gepaarte Ableitungen durchzuführen. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, bei dem Zellen in einer bestimmten Hirnregion elektrisch gereizt und die daraus resultierenden postsynaptischen Antworten von Zellen einer anderen Hirnregion zeitgleich gemessen werden (Miles und Poncer, 1996). Würde man nun Zellen des Empfängergewebes elektrisch reizen, könnte man im Falle einer funktionellen Interaktion zwischen Transplantat und Empfängergewebe in den transplantierten Zellen postsynaptische Ströme bzw. postsynaptische Potentiale messen. Im umgekehrten Fall ließen sich nach elektrischer Stimulation der transplantierten Zellen postsynaptische Antworten im Empfängergewebe nachweisen. Dass dies prinzipiell möglich ist, zeigten Benninger et al. (2003), die vordifferenzierte ES-Zellen auf ungeschädigte hippocampale Schnittkulturen applizierten. Drei Wochen nach Applikation der Zellen waren sie mehrere Mikrometer tief in den Hippokampuschnitt migriert und hatten sich im Gyrus dentatus angesiedelt. Die funktionelle Integration der Zellen im Gyrus dentatus wurde anschließend durch Reizung im enthorinalen Cortex überprüft.

Die elektrophysiologische Beschreibung ES-Zell-abgeleiteter Neurone nach Applikation in Ratten mit Parkinson-Symptomen ist die bisher einzige Transplantationsstudie, die die funktionelle Ausreifung der Neurone im Kontext einer neurodegenerativen Erkrankung untersucht hat (Kim et al., 2002). In dieser Studie wurden Nurr1-überexprimierende Vorläuferzellen in das geschädigte Striatum 6-Hydroxydopamin-(6-OH-DA) behandelter Ratten transplantiert. Funktionelle Analysen konnten aufzeigen, dass die Neurone des Transplantats über Synapsen mit dem Empfängergewebe interagieren. Obwohl der Nachweis einer funktionellen Integration nach Stimulation misslang, resultierte ein extrazellulär verabreichter Stimulus an den transplantierten Zellen in EPSPs von Empfängerneuronen, die außerhalb des Transplantats lokalisiert waren. Im Gegensatz dazu entwickelten die transplantierten Zellen nach Reizung benachbarter Empfängerneurone IPSPs. Kritisch anzumerken ist allerdings, dass die transplantierten Zellen zum Zeitpunkt der elektrophysiologischen Messungen keine Vitalmarkierung aufwiesen und erst im nachhinein durch den Nachweis von Tyrosinhydroxylase, einem Marker für dopaminerge Neurone, detektiert wurden. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass die IPSPs der transplantierten Zellen durch Stimulation ihrer eigenen Fortsätze verursacht wurden. Die in unserer Studie verwendeten Zellen exprimierten ubiquitär das EGFP-Protein und waren deshalb eindeutig anhand ihrer Grünfluoreszenz zu erkennen. Es wurde damit sichergestellt, dass nur transplantierte Zellen im *Patch-Clamp* untersucht wurden. Gleichzeitig konnte die Morphologie der untersuchten Zellen weitestgehend identifiziert werden.

Eine funktionelle Integration der Neurone ist nur dann von langfristiger Dauer, wenn ihre Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff gewährleistet ist. Diese Versorgung erfolgt hauptsächlich durch Astrozyten, die direkt in Kontakt mit Blutgefäßen stehen. Inwieweit endogene Astrozyten an der Versorgung der Neurone des Transplantats beteiligt waren, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht gesagt werden. Im Transplantat selbst

wurden durch den immunhistochemischen Nachweis von GFAP zwischen 6 und 9 % Astrozyten detektiert. Die *Patch-Clamp*-Untersuchungen zeigten, dass diese spannungsabhängige auswärtsgerichtete Kaliumströme besaßen, die sich in ihren kinetischen Eigenschaften von denen der Neurone des Transplantats unterschieden. So waren die Auswärtsströme schneller inaktivierbar und zeigten eine dreimal kleinere Amplitude als die Auswärtsströme der Neurone (Abb. 30A-D; S. 78). Ein weiteres Charakteristikum der untersuchten Zellen war ihr Ruhepotential. Mit  $-38$  mV war es positiver als das der Neurone und somit ein weiteres Indiz für Gliazellen (Abb. 30E; S. 78). Interessanterweise besaßen 72 % der elektrophysiologisch untersuchten Zellen Eigenschaften von Gliazellen. Damit zeigt sich eine deutliche Diskrepanz zu den immunhistochemischen Untersuchungen, die nur 6 bis 9 % der EGFP+ Zellen als GFAP+ identifizierten. Dieser Unterschied lässt sich dadurch erklären, dass der Marker GFAP nicht alle Astrozyten im Transplantat detektiert. So ist u.a. gezeigt worden, dass im Gehirn Astrozyten vorkommen, die nicht GFAP sondern S100 $\beta$  exprimieren (Kimmelberg, 2004). Außerdem ist die Quantifizierung GFAP / EGFP doppelmarkierter Zellen schwierig, da eine Vielzahl von GFAP+ Fortsätzen im Transplantat nicht immer einzelnen EGFP+ Zellen eindeutig zugeordnet werden konnte. Es lässt sich somit nicht ausschließen, dass der eigentliche Astrozytenanteil im Transplantat deutlich höher war. Die funktionelle Reifung von ES-Zell-abgeleiteten Astrozyten nach ihrer Transplantation wurde bislang nur an hippokampalen Hirnschnitten demonstriert (Scheffler et al., 2003). Scheffler et al. differenzierten die Zellen bereits vor der Transplantation zu glialen Vorläufern und applizierten sie anschließend auf die Oberfläche eines Hippokampusschnittes von 9 Tage alten Ratten. Nach Inkorporation der Gliazellen in den Gyrus dentatus entwickelten sie über einen Zeitraum von 3 Wochen Kaliumströme, die sowohl auswärts als auch einwärts gerichtet waren und auch Hintergrund-Kaliumströme.

Zusammenfassend zeigen die elektrophysiologischen Untersuchungen unserer Arbeit, dass vordifferenzierte ES-Zellen in der Lage sind, im Schadensgebiet des Schlaganfalls anzuwachsen und funktionell zu Neuronen und Gliazellen auszureifen. Ob diese Zellen auch funktionell mit dem Empfängergewebe interagieren, kann aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden. Ein Indiz für eine mögliche Interaktion zwischen Transplantat und Empfängergewebe sind EGFP+ Axone, die nach 4 und 12 Wochen in Richtung Empfängergewebe ausgesprossen waren (Abb. 25; S. 70).

#### **4.5 Entwicklung der intraventrikulär applizierten Zellen nach Transplantation**

Die Zellen wurden unter Verwendung stereotaktischer Koordinaten appliziert. Anatomische Variabilitäten gepaart mit gewissen operativen Schwankungen führten dazu, dass einigen Tieren die Zellen versehentlich in den lateralen Ventrikel appliziert wurden (Abb. 24A; S. 69). Vier und 12 Wochen nach Transplantation konnten im lateralen Ventrikel EGFP+ Zellen detektiert werden. Diese waren an der medialen Ependymschicht des lateralen Ventrikels angewachsen und hatten sich ebenso wie im Parenchym in Neurone und Astrozyten differenziert (Abb. 24C-D; S. 69). Recht auffallend war die starke Anhäufung endogener Nestin+ Zellen an der Ventrikelwand, welche die Verbindung zwischen Empfängergewebe und Transplantat herstellte (Abb. 24B; S. 69). Die Fähigkeit der transplantierten Zellen, Wachstumsfaktoren wie FGF-2 zu sezernieren, legt nahe, dass sie selbst die Akkumulation endogener Nestin+ Zellen induziert haben könnten. In diesem Zusammenhang belegen Untersuchungen, dass eine intraventrikuläre Applikation von Wachstumsfaktoren, die Genese neuraler Vorläuferzellen im Lateralventrikel steigert (Baldauf und Reymann, 2005).

Auch Jin et al. (2005) beobachteten ein clusterartiges Anwachsen fötaler neuronaler Vorläuferzellen nach Transplantation in adulte Ratten. Auffällig hierbei war, dass ein Teil

der transplantierten Zellen durch die laterale Wand hindurch ins Striatum migrierten. Diese Migration war in Ischämie geschädigten Tieren sogar noch verstärkt.

Die intraventrikuläre Applikation neuraler Vorläuferzellen ist eine häufig verwendete Applikationsform, um die regionenspezifische Differenzierung dieser Zellen während der Gehirnentwicklung zu verfolgen. Bei diesem Ansatz wird davon ausgegangen, dass regionale Einflüsse innerhalb der Ventrikularzone, der „Geburtsstätte“ der Neurone, die Vorläuferzellen stark prägen. In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die Vorläuferzellen nach Implantation in die Seitenventrikel embryonaler Empfängertiere anfangs clusterartig an der Ventrikelwand verteilen und später in verschiedene Hirnregionen migrieren. Dort entwickelten sie sich dann in Abhängigkeit von der Umgebung und regionenspezifischer extrinsischer Signale in verschiedene neuronale und gliale Phänotypen (Reubinoff et al., 2001; Zhang et al., 2001; Brüstle et al., 1999; Brüstle et al., 1997).

Ob und wie weit die neuralen Vorläuferzellen nach Implantation in den lateralen Ventrikel in angrenzende Hirnregionen wanderten, haben wir in dieser Arbeit nicht detailliert untersucht. Es sei jedoch erwähnt, dass EGFP+ Zellen an verschiedenen Stellen innerhalb des Ventrikels in caudaler Richtung angewachsen waren.

#### **4.6 Tumore**

Ein ernst zu nehmendes Problem bei der Verwendung von ES-Zellen für Zellersatzstrategien ist ihre Fähigkeit zur Tumorbildung. So berichten einige Studien von der Bildung maligner Teratokarzinome und Teratome nach Transplantation von ES-Zellen in gesunde Tiere (Erdö et al., 2003; Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998). Die Häufigkeit einer Tumorgenese reduzierte sich, wenn die ES-Zellen vor der Transplantation *in vitro* vordifferenziert wurden (Kim et al., 2002; Zhang et al., 2001; Brüstle et al., 1999). In diesem Zusammenhang berichteten Erdö et al. (2003), dass undifferenzierte murine ES-

Zellen nach Transplantation in Mäuse zu 91 % makroskopisch sichtbare Tumore und Mikrometastasen erzeugten, während vordifferenzierte Nestin<sup>+</sup> ES-Zellen nur zu 86 % Tumore bildeten. Vergleichend dazu neigten die gleichen Zellen nach Transplantation in Ratten nur geringfügig zur Tumorgenese. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Verwendung von Xenotransplantaten das tumorgenetische Potential von ES-Zellen einzudämmen scheint (Erdö et al., 2003). In unseren Untersuchungen wurden vordifferenzierte Nestin<sup>+</sup> ES-Zellen als Xenotransplantat verwendet. In keinem der transplantierten Tiere detektierten wir makroskopisch sichtbare Tumore. Dieses Ergebnis wurde von der immunhistochemischen Färbung mit Ki-67 bestätigt. Während sich nach 1 Woche zwischen 80 und 90 % der transplantierten Zellen teilten, waren es nach 4 Wochen nicht mehr als 5 %. Demnach teilten sich die neuralen Vorläuferzellen kurz nach ihrer Transplantation, begannen dann aber zu differenzieren ohne dabei makroskopisch sichtbare Wucherungen auszubilden. Trotz dieser Befunde kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich im Transplantat neben Nervengewebe auch andere Gewebstypen entwickelt hatten. So ließen sich vereinzelt mikroskopisch sichtbare Zellansammlungen an neuroektodermalem Gewebe beobachten, die möglicherweise auf kleine Teratome hindeuteten, offensichtlich aber solitär blieben und nicht infiltrierend weiterwuchsen.

#### **4.7 Bedeutung der ES-Zellen für die zukünftige Stammzellforschung**

Die Behandlung von Schlaganfall mit Stammzellen ist in den letzten Jahren in mehreren tierexperimentellen Studien durchgeführt worden. Dabei wurden eine Reihe adulter Stammzellen wie Knochenmarksstammzellen (Chen et al., 2001a; 2003a; b; Li et al., 2000), Nabelschnurblutzellen (Boltze et al., 2005; Vendrame et al., 2004; Chen et al., 2001b), immortalisierte Zelllinien (Modo et al., 2002; Veizovic et al., 2001; Park et al., 2000), adipöse Stromazellen (Kang et al., 2003) und fötale Stammzellen (Kelly et al., 2004) untersucht. Bei vielen Untersuchungen zeigte sich zwar eine motorische

Verhaltensverbesserung der Tiere (Chen et al., 2001a; b; 2003b; Zhao et al., 2002; Li et al., 2000; 2001; Saporta et al., 1999), der Anteil der Zellen, die überlebten bzw. sich in neurale Zellen differenzierten, war jedoch verschwindend gering. Von 3 Millionen mesenchymalen Stammzellen, die intravenös appliziert wurden, konnten nur 1 % im Hirn wiedergefunden werden. Lediglich 2 % dieser Zellen hatte sich zu Neuronen entwickelt (Chen et al., 2001a). Es wird angenommen, dass nicht die transplantierten Zellen selbst, sondern von ihnen freigesetzte neurotrophe Faktoren die endogenen Reparaturmechanismen ankurbeln (Mahmood et al., 2004; Chen et al., 2002). So könnte eine durch neurotrophe Faktoren reduzierte Apoptose sowie die Stimulation der endogenen Neurogenese wesentlich zur Reparatur des läsierten Hirnareals beitragen (Chen et al., 2003b). Es ist zudem bewiesen, dass nach einem Schlaganfall transplantierte mesenchymale Stammzellen in Endothelzellen differenzieren, die wiederum an der Neubildung von Gefäßen beteiligt sind (Chen et al., 2003a; Hess et al., 2002).

Ähnlich den mesenchymalen Stammzellen induzieren Nabelschnurblutzellen nach ihrer Transplantation durch Abgabe trophischer Faktoren funktionelle Verhaltensverbesserungen (Willing et al., 2003). Es gibt Untersuchungen, die belegen, dass neben mesenchymalen Stammzellen und Nabelschnurblutzellen auch embryonale Karzinomzellen (NT2-Zellen), Verhaltensverbesserungen induzieren (Saporta et al., 1999; Borlongan et al., 1998). Wie in den Studien zuvor spekulieren die Autoren, dass die Neurone des Transplantats durch Sekretion von Wachstumsfaktoren zur verbesserten Symptomatik beigetragen haben. Es sollte erwähnt werden, dass das Überleben der NT2-Zellen nach Transplantation äußerst gering war und an einer Quantifizierung von NT2-Zellen abgeleiteten Neuronen und Astrozyten mangelt es beiden Studien.

Humane neurale Stammzellen induzierten nach Transplantation ebenfalls Verhaltensverbesserungen (Modo et al., 2002; Veizovic et al., 2001). Diverse Stammzelllinien wurden schon kreiert, ihre Effekte sind bisher jedoch nicht genau untersucht worden

(Modo et al., 2002; Park et al., 2000). Über die Plastizität von MHP-36, einer immortalisierten hippokampalen Zelllinie, ist nur so viel bekannt, dass 30-35 % der Zellen nach kontralateraler Transplantation ins geschädigte Hirnareal einwandern und dort 30 % von ihnen Neurone bilden (Modo et al., 2002).

Auch Stromazellen des Fettgewebes sind in der Lage sich zu Nervenzellen zu entwickeln (Safford et al., 2002). Kang et al. (2003) beobachteten, dass in geschädigte Ratten transplantierte Stromazellen des Fettgewebes eine gezielte Migration ins Schadensgebiet zeigen. Zusätzlich dazu wiesen die Tiere im Vergleich zu nicht-transplantierten Kontrollen motorische und somatosensorische Verhaltensverbesserungen auf.

Die Aussichten einer Therapie neurodegenerativer Erkrankungen mit adulten Stammzellen scheinen vielversprechend zu sein. Allerdings bleibt die Frage nach dem tatsächlichen Zellersatz, d.h. nach der Entstehung neuer Neurone und Astrozyten durch die transplantierten Zellen noch weitgehend unbeantwortet. Das größte Hindernis hierbei ist sicherlich die mangelnde Markierung adulter Stammzellen und damit das Wiederfinden der Zellen nach der Transplantation. Ein weiteres Problem bei der Charakterisierung adulter Stammzellen ist die häufig vorkommende Heterogenität des injizierten Transplantats. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass sich in Zellpräparaten aus adultem Gewebe mehrere Stammzelltypen befinden. Tatsächlich wurde vor kurzem belegt, dass die angebliche Regeneration von Blutzellen aus Muskelstammzellen, in Wirklichkeit auf die Verunreinigung mit hämatopoetischen Stammzellen zurückzuführen war (Schöler et al., 2003). Diese Heterogenität ist auch ein Problem bei der Verwendung fötaler Stammzellen, d.h. adulter Stammzellen aus dem sich entwickelnden Embryo. So verwendete man bisher für Transplantationen bei Morbus Parkinson fötale Zellen aus dem ventralen Mesencephalon. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch neuraler Vorläuferzellen unterschiedlichen Reifegrades. Zusätzliche Heterogenität entsteht durch die Verwendung

mehrerer Spender sowie durch unterschiedliche Qualitäten bei der Präparation einzelner Transplantate.

Ein weiterer Grund für die beobachtete Plastizität adulter Stammzellen könnte eine Fusion mit anderen Zellen sein, die zu tetraploiden Zelllinien führt (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). Adulte Stammzellen sind nur in geringer Zahl vorhanden und die derzeitigen Kenntnisse über optimale Kulturbedingungen dieser Zellen sind noch sehr lückenhaft. So ist man beispielsweise nicht in der Lage, hämatopoetische Stammzellen *in vitro* zu vermehren. Das liegt größtenteils daran, dass man die natürliche Umgebung von Stammzellen in einem Organ und die Wachstumsfaktoren, die in diesen Nischen gebildet werden, *in vitro* bisher nicht nachstellen kann.

Welche Stammzellen am Ende den Weg in die neurologische Klinik finden werden, ist heute schwer vorauszusagen. Adulte Stammzellen sind nach dem heutigen Stand nur sehr begrenzt verfügbar und ihre Vermehrung ist kompliziert. Allerdings sind diese Zellen bereits vordifferenziert und es besteht ein geringes Risiko der Tumorbildung. ES-Zellen sind fast unbegrenzt vermehrbar und lassen sich *in vitro* in fast jeden Zelltyp differenzieren. Auch ist die genetische Manipulierbarkeit dieser Zellen wesentlich einfacher und effektiver anzuwenden als bei adulten Stammzellen. Dies eröffnet neue Möglichkeiten für eine Gentherapie. Die größten Hindernisse für die Anwendung dieser Zellen liegen jedoch in der Gefahr der Tumorbildung. Die Ergebnisse unserer Arbeit verdeutlichen, dass ES-Zellen einer verwandten Spezies ein geringes Potential zur Tumorbildung besitzen. Allerdings wird dieser Vorteil offensichtlich mit einer verstärkten Abstoßung des Transplantats erkaufte. Die Anwendbarkeit von ES-Zellen für die Zelltherapie erfordert also zum einen die Entwicklung von Methoden einer effektiven Vordifferenzierung gepaart mit einer 100 %igen Selektion undifferenzierter ES-Zellen (letzteres würde die Tumorbildung drastisch reduzieren) und zum anderen die Entwicklung des therapeutischen Klonens, d.h. die Schaffung von ES-Zellen, die mit dem Empfänger

genetisch identisch sind. Auf diese Weise würde die Abstoßung des Transplantats verhindert werden. Die mit der Anwendung von ES-Zellen verbundenen ethischen Probleme sollen an dieser Stelle erwähnt werden, aufgrund ihrer Vielschichtigkeit aber nicht vertiefend diskutiert werden.

Aber auch ohne Lösung der beiden genannten Probleme ist die experimentelle Untersuchung von ES-Zellen unverzichtbar, da die Transplantation von ES-Zellen wichtige Informationen über Proliferation, Migration, Differenzierung, Abstoßung oder auch mögliche Zellfusionen von transplantierten Zellen mit Empfängerzellen liefert. Diese Erkenntnisse sind letztlich auch für die Anwendbarkeit adulter Stammzellen unverzichtbar.

## 5. Zusammenfassung

Die begrenzte Regenerationsfähigkeit des Zentralen Nervensystems nach einem Schlaganfall ist und bleibt eine der größten Herausforderungen für die experimentelle und klinische Neurowissenschaft (Björklund und Lindvall, 2000). Ziel dieser Arbeit war es, das Überleben und die Entwicklung vordifferenzierter ES-Zellen nach ihrer Transplantation in Ratten mit einem künstlich induzierten Schlaganfall zu verfolgen.

Die transplantierten Zellen, die eine Woche nach dem Schlaganfall direkt in das nekrotische Schädigungsgebiet bzw. in die Nähe des lateralen Ventrikels appliziert wurden, waren bis zu 12 Wochen überlebensfähig. Nach anfänglicher Proliferation im Empfängergewebe differenzierten die Zellen zu Neuronen und Astrozyten. Während sich etwa ein Drittel der Zellen nach 4 und 12 Wochen zu Neuronen entwickelt hatte, differenzierten zwischen 6 und 9 % der transplantierten Zellen zu Astrozyten. Verschiedene neuronale Subtypen, die u.a. typisch für striatale Zellen sind, wurden ebenso im Transplantat detektiert. Im Gegensatz zum enormen Differenzierungspotential besaßen die transplantierten Zellen jedoch ein äußerst geringes Migrationspotential.

Die Neurone des Transplantats auch funktionell zu charakterisieren, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Durch *Patch-Clamp*-Analysen wurden in den ES-Zell-abgeleiteten Zellen typische neuronale Eigenschaften wie einwärtsgerichtete Natriumströme, auswärtsgerichtete Kaliumströme, Aktionspotentiale sowie EPSPs und EPSCs nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang damit erstmals der Nachweis, dass sich vordifferenzierte ES-Zellen nach ihrer Transplantation in Ratten mit einem experimentellen Schlaganfall zu reifen und funktionstüchtigen Neuronen entwickeln.

Die Gefahr der Tumorbildung und die Abstoßung des Transplantats sind Herausforderungen, die es für eine zukünftige Therapie mit ES-Zellen zu lösen gilt.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AP	Anterior-Posterior
APs	Action potentials (Aktionspotentiale)
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosin-Triphosphat
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
ChAT	Cholin-Azetyltransferase
CPS	Cryoprotection solution (Kryoprotektionslösung)
CsA	Cyclosporin A
DARPP	Dopamin regulierendes Phosphoprotein
DCX	Doublecortin
DG	Dentate gyrus (Gyrus dentatus)
d.h.	das heißt
E	Embryonaltag
eMCAO	endothelin induced Middle Cerebral Artery Occlusion
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EPSCs	Excitatory Postsynaptic Currents (Exzitatorische Postsynaptische Ströme)
EPSPs	Excitatory Postsynaptic Potentials (Exzitatorische Postsynaptische Potentiale)
$E_r$	natürliches Ruhepotential
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FGF-2	basic Fibroblast Growth Factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
GABA	$\gamma$ -Amino Butyric Acid ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)

---

GAD	Glutamat-Decarboxylase
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
6-OH-DA	6-Hydroxydopamin
IPSPs	Inhibitory Postsynaptic Potentials (Inhibitorische Postsynaptische Potentiale)
Konz.	Konzentration
L	Lateral
LIF	leukemia inhibitory factor (Leukämischer Inhibitorischer Faktor)
LT-HSZ	long term haematopoietic stem cells
MCA	Middle Cerebral Artery (mittlere Zerebralarterie)
MEF	Murine Embryonic Fibroblasts (embryonale Mausfibroblasten)
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIF	Macrophagen / Microglia Inhibitorischer Faktor
mM	Millimolar
MSZ	mesenchymale Stammzellen
Na <sub>v</sub>	Spannungssensitiver Natriumkanal
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecul
NeuN	Neuron-spezifisches Nukleär-Protein
NF-200	Neurofilament 200
NGF	Nerve Growth Factor
NT	Neurotrophin
NT2-Zellen	Teratokarzinomzellen
OB	Bulbus olfactorius
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PPV	Posteriorer Periventrikel
RMS	rostraler migratorischer Strom
RT	Raumtemperatur

---

rt-PA	recombinant tissue plasminogen activator
SDF-1 $\alpha$	Stromal cell-derived factor
ST-HSZ	short term haematopoietic stem cells
STM	Striatum
SV2	Präsynaptisches Vesikelprotein
SVZ	Subventrikularzone
TEA	Tetraethylammonium
TTX	Tetrodotoxin
u.a.	unter anderem
V	Volumen
VM	ventrales Mesencephalon
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

## 7. Literaturverzeichnis

**Adachi N, Ochi M, Deie M, Ito Y** (2005) Transplant of mesenchymal stem cells and hydroxyapatite ceramics to treat severe osteochondral damage after septic arthritis of the knee. *J Rheumatol* 32: 1615-1618

**Altman J** (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137: 433-457

**Altman J, Das GD** (1967) Postnatal neurogenesis in the guinea pig. *Nature* 214: 1098-1101

**Altman J** (1966) Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol* 16: 263-278

**Altman J, Das GD** (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124: 319-335

**Antkowiak B** (2002) *In vitro* networks: cortical mechanism of anaesthetic action. *Br J Anaesth* 89: 102-111

**Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O** (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8: 963-970

**Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ** (1996) The role of inflammation and cytokines in brain injury. *Neurosci Biobeh Rev* 20: 445-452

**Bachoud-Levi AC, Gaura V, Brugieres P, Lefaucheur JP, Boisse MF, Maison P, Baudic S, Ribeiro MJ, Bourdet C, Remy P, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M** (2006) Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long term follow-up study. *Lancet Neurol* 5: 303-309

**Bachoud-Levi AC, Remy P, Nguyen JP, Brugieres P, Lefaucheur JP, Bourdet C, Baudic S, Gaura V, Maison P, Haddad B, Boisse MF, Grandmougin T, Jeny R, Bartolomeo P, Dalla Barba G, Degos JD, Lisovoski F, Ergis AM, Pailhous E, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M** (2000) Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356: 1975-1979

**Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI** (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. Dev Biol 168: 342-357

**Baldauf K, Reymann KG** (2005) Influence of EGF / bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. Brain Res 1056: 158-167

**Banchereau J, Steinman RM** (1998) Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392: 245-252

**Barker RA, Widner H** (2004) Immune problems in central nervous system cell therapy. NeuroRx 1: 472-481

**Bates GP, Harper PS, Jones AL eds.** (2002) Huntington's disease. Oxford: Oxford University Press

**Benninger F, Beck H, Wernig M, Tucker KL, Brüstle O, Scheffler B** (2003) Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in hippocampal slice cultures. J Neurosci 23: 7075-7083

**Bianco P, Robey PG** (2001) Stem cells in tissue engineering. Nature 414: 118-121

**Björklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O** (2002) Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. Proc Natl Acad Sci USA 99: 2344-2349

**Björklund A, Lindvall O** (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. Nat Neurosci 3: 537-544

**Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH** (1983) Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. Acta Physiol Scand Suppl 522: 9-18

**Björklund A, Stenevi U** (1979) Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. Brain Res 177: 555-560

**Block F, Schwarz M** (1999) Neuroprotektion beim Schlaganfall. Nervenarzt 70: 101-110

**Boltze J, Kowalski I, Geiger K, Reich D, Gunther A, Buhle C, Egger D, Kamprad M, Emmrich F** (2005) Experimental treatment of stroke in spontaneously hypertensive rats by CD34+ and CD34- cord blood cells. *GMS Ger Med Sci* 3: Doc09

**Borlongan CV, Tajima Y, Trojanowski JQ, Lee VM, Sanberg PR** (1998) Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp Neurol* 149: 310-321

**Brevig T, Holgersson J, Widner H** (2000) Xenotransplantation for CNS repair: immunological barriers and strategies to overcome them. *Trends Neurosci* 23: 337-344

**Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD** (1999) Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 285: 754-756

**Brüstle O, Spiro AC, Karram K, Choudhary K, Okabe S, McKay RD** (1997) *In vitro*-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14809-14814

**Cameron HA, McKay RD** (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435: 406-417

**Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E** (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56: 337-44

**Campbell K, Kalen P, Wictorin K, Lundberg C, Mandel RJ, Björklund A** (1993) Characterization of GABA release from intrastriatal striatal transplants: dependence on host-derived afferents. *Neurosci* 53: 403-415

**Cedar SH** (2006) The function of stem cells and their future roles in healthcare. *Br J Nurs* 15: 104-107

**Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, Lu M, Zhu Z, Chopp M** (2003a) Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 92: 692-699

**Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, Lu M, Gautam SC, Chopp M** (2003b) Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in femal rat. *J Neurosci Res* 73: 778-786

**Chen X, Li Y, Wang L, Katakowski M, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam SC, Chopp M** (2002) Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology* 22: 275-279

**Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M** (2001a) Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32: 1005-1011

**Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M** (2001b) Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 32: 2682-2688

**Chen R, Ende N** (2000) The potential for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1 mice. *J Med* 31: 21-30

**Chiu D, Krieger D, Villar-Cordova C, Kasner SE, Morgenstern LB, Bratina PL, Yatsu FM, Grotta JC** (1998) Intravenous tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke: feasibility, safety, and efficiacy in the first year of clinical practice. *Stroke* 29: 18-22

**Corotto FS, Henegar JA, Maruniak JA** (1993) Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 149: 111-114

**Cui Q, Wang GJ, Balian G** (2000) Pluripotential marrow cells produce adipocytes when transplanted into steroid-treated mice. *Connect Tissue Res* 41: 45-56

**Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, Ratliff J, Isacson O** (1998) Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol* 149: 28-41

**Devajyothi C, Kalvakolanu I, Babcock GT, Vasavada HA, Howe PH, Ransohoff RM** (1993) Inhibition of interferon-gamma-induced major histocompatibility complex class II gene transcription by interferon-beta and type beta 1 transforming growth factor in human astrocytoma cells. Definition of cis-element. *J Biol Chem* 268: 18794-18800

**Dihné M, Bernreuther C, Hagel C, Wesche KO, Schachner M** (2006) Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain. *Stem cells* (im Druck)

**Dihné M, Bernreuther C, Sibbe M, Paulus W, Schachner M** (2003) A new role for the cell adhesion molecule L1 in neural precursor cell proliferation, differentiation, and transmitter-specific subtype generation. *J Neurosci* 23: 6638-6650

**Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA** (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391-397

**Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A** (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716

**Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R** (1998) Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J.* 17: 4213-4225

**Doss MX, Koehler CI, Gissel C, Hescheler J, Sachinidis A** (2004) Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med* 8: 465-473

**Duan WM, Widner H, Cameron RM, Brundin P** (1998) Quinolinic acid-induced inflammation in the striatum does not impair the survival of neural allografts in the rat. *Eur J Neurosci* 10: 2595-2606

**Dugan LL, Choi DW** (1994) Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes *Ann Neurol* 35: S17-S21

**Dunnett SB, Nathwani F, Björklund A** (2000) The integration and function of striatal grafts. *Prog Brain Res* 127: 345-380

**Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB** (1996) Brain microglia / macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16: 2508-2521

**Erdö F, Bürle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Föcking M, Küstermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T** (2003) Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow* 23: 780-785

**Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH** (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317

**Evans MJ, Kaufman MH** (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156

**Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fischman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, Isacson O** (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* 9: 273-278

**Finley MF, Kulkarni N, Huettner JE** (1996) Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells. *J Neurosci* 16: 1056-1065

**Finsen BR, Sorenson T, Castellano B, Pedersen EB, Zimmer J** (1991) Leukocyte infiltration and glial reactions in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain. A light and electron microscopical immunocytochemical study. *J Neuroimmunol* 32: 159-183

**Fleischmann BK, Hescheler J** (2004) Stammzellen und ihr potentieller Einsatz für therapeutische Zwecke. *BioFocus* 68: 1-11

**Ford-Perriss M, Abud H, Murphy M** (2001) Fibroblast growth factors in the developing central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 493-503

**Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J** (1995) *In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 108: 3181-3188

**Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S** (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710-719

**Freeman TB, Olanow CW, Hauser RA, Nauert GM, Smith DA, Borlongan CV, Sanberg PR, Holt DA, Kordower JH, Vingerhoets FJ et al.** (1995) Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 38: 379-388

**Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A** (1994) Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and production of cytokines depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol* 152: 2720-2728

**Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH** (1998) Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 1239-1247

**Gage FH** (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-1438

**Gao XB, van den Pol AN** (2000) GABA release from mouse axonal growth cones. *J Physiol* 523: 629-637

**Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, Hudson JE, Chen N, Davis CD, Sanberg PR** (2003) Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 12: 255-270

**Garbuzova-Davis S, Willing AE, Milliken M, Saporta S, Zigova T, Cahill DW, Sanberg PR** (2002) Positive effect of transplantation of hNT neurons (Ntera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol* 174: 169-180

**Gates MA, Olsson M, Bjerregaard K, Björklund A** (1998) Region-specific migration of embryonic glia grafted to the neonatal brain. *Neuroscience* 84: 1013-1023

**Goldin AL, Barchi RL, Caldwell JH, Hofmann F, Howe JR, Hunter JC, Kallen RG, Mandel G, Meisler MH, Netter YB, Noda M, Tamkun MM, Waxman SG, Wood JN, Catterall WA** (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28: 365-368

**Gong B, Rhodes KJ, Bekele-Arcuri Z, Trimmer JS** (1999) Type I and type II Na<sup>(+)</sup> channel alpha-subunit polypeptides exhibit distinct spatial and temporal patterning, and association with auxiliary subunits in rat brain. *J Comp Neurol* 412: 342-352

**Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flugge G, Fuchs E** (1998) Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3168-3171

**Grabowski M, Brundin P, Johansson BB** (1992) Fetal neocortical grafts implanted in adult hypertensive rats with cortical infarcts following a middle cerebral artery occlusion: ingrowth of afferent fibers from the host brain. *Exp Neurol* 116: 105-121

**Granger DN, Kvietys PR, Perry MA** (1993) Leukocyte-endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 71: 61-75

**Grogaard B, Schurer L, Gerdin B, Arfors KE** (1989) Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat. The role of polymorphonuclear leukocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 500-505

**Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kumaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ** (1986) Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 17: 246-253

**Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ** (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100

**Hayashi J, Takagi Y, Fukuda H, Imazato T, Nishimura M, Fujimoto M, Takahashi J, Hashimoto N, Nozaki K** (2006) Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* (im Druck)

**Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J, Carothers J** (2002) Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 33: 1362-1368

**Hoehn M, Küstermann E, Blunk J, Wiedermann D, Trapp T, Wecker S, Föcking M, Arnold H, Hescheler J, Fleischmann BK, Schwindt W, Bührle C** (2002) Monitoring of implanted stem cell migration *in vivo*: a highly resolved *in vivo* magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16267-16272

**Horner PJ, Power AE, Kempermann G, Kuhn HG, Palmer TD, Winkler J, Thal LJ, Gage FH** (2000) Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20: 2218-2228

**Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Khoury SJ** (2005) Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 $\alpha$  / CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 18117-18122

**Isacson O, Dunnett SB, Björklund A** (1986) Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2728-2732

**Issa R, AlQteishat A, Mitsios N, Saka M, Krupinski J, Tarkowski E, Gaffney J, Slevin M, Kumar S, Kumar P** (2005) Expression of basic fibroblast growth factor mRNA and protein in the human brain following ischaemic stroke. *Angiogenesis* 8: 53-62

**Janson CG, Ramesh TM, During MJ, Leone P, Heywood J** (2001) Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J Hematother Stem Cell Res* 10: 913-915

**Jiang X, Cui PC, Chen WX, Zhang ZP** (2003) *In vivo* chondrogenesis of induced human marrow mesenchymal stem cells in nude mice. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 23: 766-769, 773

**Jin K, Sun Y, Xie L, Mao XO, Childs J, Peel A, Logvinova A, Banwait S, Greenberg DA** (2005) Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiol Dis* 18: 366-374

**Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA** (2001) Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4710-4715

**Kaemmerer WF und Low WC** (1999) Cerebellar allografts survive and transiently alleviate ataxia in a transgenic model of spinocerebellar ataxia type-1. *Exp Neurol* 158: 301-311

**Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, Ogawa Y, Toyama Y, Miyata T, Okano H** (2000) Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci* 22: 139-153

**Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS** (2003) Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 183: 355-366

**Kaplan MS, Hinds JW** (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092-1094

**Katsura K, Kristian T, Siesjö BK** (1994) Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22: 991-996

**Kearns SM, Laywell ED, Kukekov VK, Steindler DA** (2003) Extracellular matrix effects on neurosphere cell motility. *Exp Neurol* 182: 240-244

**Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, Masel J, Yenari MA, Weissman IL, Uchida N, Palmer T, Steinberg GK** (2004) Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11839-11844

**Kendall AL, Rayment FD, Torres EM, Baker HF, Ridley RM, Dunnett SB** (1998) Functional integration of striatal allografts in a primate model of Huntington's disease. *Nat Med* 4: 727-729

**Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R** (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418: 50-56

**Kimelberg HK** (2004) The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int* 45: 191-202

**Kinner MA, Daly WL** (1992) Skin transplantation. *Crit Care Nurs Clin North Am* 4: 173-178

**Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S** (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7: 430-436

**Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R** (2000) Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 49: 328-337

**Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitman MA, Bynum L** (2000) Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 55: 565-569

**Kopyov OV, Jacques S, Lieberman A, Duma CM, Eagle KS** (1998) Safety of intrastriatal neurotransplantation for Huntington's disease patients. *Exp Neurol* 149: 97-108

**Kordower JH, Rosenstein JM, Collier TJ, Burke MA, Chen EY, Li JM, Martel L, Levey AE, Mufson EJ, Freeman TB, Olanow CW** (1996) Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, quantitative, ultrastructural, and metabolic studies. *J Comp Neurol* 370: 203-230

**Kordower JH, Freeman TB, Snow BJ, Vingerhoets FJ, Mufson EJ, Sanberg, PR, Hauser RA, Smith DA, Nauert GM, Perl DP et al.** (1995) Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 332: 1118-1124.

**Kornack DR, Rakic P** (1999) Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5768-5773

**Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH** (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16: 2027-33

**Lachmann LB, Brown DC, Dinarello CA** (1987) Growth promoting effect of recombinant IL-1 and TNF for human astrocyte cell line. *J Immunol* 138: 2913-2916

**Larsson LC, Czech KA, Brundin P, Widner H** (2000) Intrastriatal ventral mesencephalic xenografts of porcine tissue in rats: immune responses and functional effects. *Cell Transplant* 9: 261-272

**Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J** (2001) Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 344: 1815-1822

**Lee TH, Kato H, Chen ST, Kogure K, Itoyama Y** (2002) Expression disparity of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in ischemic hippocampal neurons. *Neuroreport* 13: 2271-2275

**Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD** (2000) Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18: 675-679

**Leegwater-Kim J, Cha JH** (2004) The paradigm of Huntington's disease: therapeutic opportunities in neurodegeneration. *NeuroRx* 1: 128-138

**Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD** (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60: 585-595

**Li Y, Chen J, Wang L, Lu M, Chopp M** (2001) Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology* 56: 1666-1672

**Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautman SC, Xu YX, Zhang ZG** (2000) Intrastratial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 1311-1319

**Li M, Pevny L, Lovell-Badge R, Smith A** (1998) Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 8: 971-974

**Lichtenwalner RJ, Parent JM** (2006) Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 1-20

**Lindvall O** (1994) Clinical application of neuronal grafts in Parkinson's disease. *J Neurol* 241: S54-S56

**Lois C, Alvarez-Buylla A** (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264: 1145-1148

**Mahmood A, Lu D, Chopp M** (2004) Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 21: 33-39

**Mankani MH, Kuznetsov SA, Fowler B, Kingman A, Robey PG** (2001) *In vivo* bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol Bioeng* 72: 96-107

**Marban E, Yamagishi T, Tomaselli GF** (1998) Structure and function of voltage-gated sodium channels. *J Physiol* 508: 647-657

**Martin GR** (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early embryos cultured in medium conditioned by teratomacarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634-7638

**Martinez-Vila E, Irima P** (2005) Challenges of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke treatment. *Cerebrovasc Dis* 20: 148-158

**Mattsson B, Sorenson JC, Zimmer J, Johansson BB** (1997) Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments. *Stroke* 28: 1225-1231

**Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, Pastore I, Marasso R, Madon E** (2003) Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4: 158-161

**Mies G, Iijima T, Hossmann KA** (1993) Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4: 709-711

**Miles R, Poncer JC** (1996) Paired recordings from neurones. *Curr Opin Neurobiol* 6: 387-394

**Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y, Kohsaka S** (1997) Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J Neurosci Res* 50: 1023-1029

**Modo M, Stroemer RP, Tang E, Patel S, Hodges H** (2002) Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke* 33: 2270-2278

**Moos M, Tacke R, Scherer H, Teplow D, Fruh K, Schachner M** (1988) Neural adhesion molecule L1 as a member of the immunoglobulin superfamily with binding domains similar to fibronectin. *Nature* 334: 701-703

**Nakao N, Ogura M, Nakai K, Itakura T** (1999) Embryonic striatal grafts restore neuronal activity of the globus pallidus in a rodent model of Huntington's disease. *Neurosci* 88: 469-477

**Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M** (2002) Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110: 429-41

**Nathan C, Xie QW** (1994) Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell* 78: 915-918

**Neher E, Sakmann B** (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802

**Nehls DG, Park CK, McCulloch J** (1989) Cerebral circulatory effects of dizocilpine (MK 801) in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: S376-S376

**Obrietan K, Gao XB, Van den Pol AN** (2002) Excitatory actions of GABA increase BDNF expression via a MAPK-CREB-dependent mechanism - a positive feedback circuit in developing neurons. *J Neurophysiol* 88: 1005-1015

**Oertel M, Menthen A, Dabeva MD, Shafritz DA** (2006) Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem / progenitor cells. *Gastroenterology* 130: 507-520

**Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y** (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313-319

**Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD** (1996) Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*. *Mech Dev*: 59: 89-102

**Okano H** (2002) Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *51*: 115-128

**Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB** (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54: 403-414

**Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P** (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10344-10349

**Palfi S, Conde F, Riche D, Brouillet E, Dautry C, Mittoux V, Chibois A, Peschanski M, Hantraye P** (1998) Fetal striatal allografts reverse cognitive deficits in a primate model of Huntington disease. *Nat Med* 4: 963-966

**Parent JM, Vexler ZS, Gong C, Derugin N, Ferriero DM** (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52: 802-13

**Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH** (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17: 3727-3738

**Park KI** (2000) Transplantation of neural stem cells: cellular & gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury. *Yonsei Med J* 41: 825-835

**Paxinos G, Watson C** (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th edition, Academic Press

**Pedersen EB, Poulsen FR, Zimmer J, Finsen B** (1995) Prevention of mouse-rat brain xenograft rejection by a combination therapy of cyclosporin A, prednisolone and azathioprine. *Exp Brain Res* 106: 181-186

**Pencea V, Bingaman KD, Freedman LJ, Luskin MB** (2001) Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* 172: 1-16

**Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ** (1979) Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204: 643-647

**Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L** (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 12543-12548

**Pevny LH, Sockanathan S, Placzek M, Lovell-Badge R** (1998) A role for SOX1 in neural determination. *Development* 125: 1967-1978

**Philpott LM, Kopyov OV, Lee AJ, Jacques S, Duma CM, Caine S, Yang M, Eagle KS** (1997) Neuropsychological functioning following fetal striatal transplantation in Huntington's chorea: three case presentations. *Cell Transplant* 6: 203-212

**Piccini P, Lindvall O, Björklund A, Brundin P, Hagell P, Ceravolo R, Oertel W, Quinn N, Samuel M, Rehncrona S, Widner H, Brooks DJ** (2000) Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann Neurol* 48: 689-695

**Piccini P, Brooks DJ, Björklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O** (1999) Dopamine release from nigral transplants visualized *in vivo* in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci* 2: 1137-1140

**Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR** (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147

**Poltorak M, Freed WJ** (1989) Immunological reactions induced by intracerebral transplantation: evidence that host microglia but not astroglia are the antigen-presenting cells. *Exp Neurol* 103: 222-233

**Pringle AK, Schmidt W, Deans JK, Wulfert E, Reymann KG, Sundstrom LE** (2003) 7-Hydroxylated epiandrosterone (7-OH-EPIA) reduces ischaemia-induced neuronal damage both *in vivo* and *in vitro*. *Eur J Neurosci* 18: 117-124

**Quagliarello VJ, Wispelwey B, Long WJ Jr, Scheld WM** (1991) Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J Clin Invest* 87: 1360-1366

**Redmond DE, Sladek JR Jr, Roth RH, Collier TJ, Elsworth JD, Deutch AY, Haber S** (1986) Fetal neuronal grafts in monkeys given methylphenyltetrahydropyridine. *Lancet* 1: 1125-1127

**Represa A, Ben-Ari Y** (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 28: 278-283

**Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T** (2001) Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19: 1134-1140

**Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A** (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 18: 399-404

**Reynolds BA, Weiss S** (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710

**Rocheffort C, Gheusi G, Vincent JD, Lledo PM** (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *J Neurosci* 22: 2679-2689

**Ross BD, Hoang TQ, Bluml S, Dubowitz D, Kopyov OV, Jacques DB, Lin A, Seymour K, Tan J** (1999) *In vivo* magnetic resonance spectroscopy of human fetal neural transplants. *NMR Biomed* 12: 221-236

**Rüschenschmidt C, Koch PG, Brüstle O, Beck H** (2005) Functional properties of ES cell-derived neurons engrafted into the hippocampus of adult normal and chronically epileptic rats. *Epilepsia* 46: 174-183

**Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE** (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 371-379

**Saito K, Suyama K, Nishida K, Sei Y, Basile A** (1996) Early increases in TNF-alpha, IL-6 and IL-1 beta levels following transient cerebral ischemia in gerbil brain. *Neurosci Lett* 206: 149-152

**Sanchez-Ramos JR** (2002) Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 69: 880-893

**Santambrogio L, Belyanskaya SL, Fischer FR, Cipriani B, Brosnan CF, Ricciardi-Castagnoli P, Stern LJ, Strominger JL, Riese R** (2001) Developmental plasticity of CNS microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6295-6300

**Saporta S, Borlongan CV, Sanberg PR** (1999) Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neurosci* 91: 519-525

**Savitz SI, Dinsmore JH, Wechsler LR, Rosenbaum DM, Caplan LR** (2004) Cell therapy for stroke. *NeuroRx* 1: 406-414

**Sawle GV, Bloomfield PM, Björklund A, Brooks DJ, Brundin P, Leenders KL, Lindvall O, Marsden CD, Rehncrona S, Widner H et al.** (1992) Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET (18F)6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol* 31: 166-173

**Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL** (2000) Granule-like neurons at the hilar / CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* 20: 6144-6158

**Scheffler B, Schmandt T, Schröder W, Steinfarz B, Hussein L, Wellmer J, Seifert G, Karram K, Beck H, Blümcke I, Wiestler OD, Steinhäuser C, Brüstle O** (2003) Functional network integration of embryonic stem cell-derived astrocytes in hippocampal slice cultures. *Development* 130: 5533-5541

**Schmidt W, Reymann KG** (2002) Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 334: 153-6

**Schöler HR** (2003) Das Potential von Stammzellen - Ist der Mensch regenerierbar? *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 56. Jahrgang, Heft 10: 525-539

**Scholz A, Vogel W** (2000) Tetrodotoxin-resistant action potentials in dorsal root ganglion neurons are blocked by local anesthetics. *Pain* 89: 47-52

**Scholz A, Groß M, Vogel W** (1998) Properties and functions of calcium-activated  $K^+$  channels in small neurones of rat dorsal root ganglion studied in a thin slice preparation. *J Physiol* 513: 55-69

**Sharkey J, Butcher SP** (1995) Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *J Neurosci Methods* 60: 125-131

**Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E** (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410: 372-376

**Siesjö BK** (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: pathophysiology. *J Neurosurg* 77: 169-184

**Sirinathsinghi DJ, Dunnett SB, Isacson O, Clarke DJ, Kendrick K, Björklund A** (1988) Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions - II. *In vivo* monitoring of GABA release in globus pallidus and substantia nigra. *Neurosci* 24: 803-811

**Snyder EY, Yoon C, Flax JD, Macklis JD** (1997) Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11663-11668

**Speliotis EK, Caday CG, Do T, Weise J, Kowall NW, Finklestein SP** (1996) Increased expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) following focal cerebral infarction in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 39: 31-42

**Spudich A, Kilic E, Xing H, Kilic Ü, Rentsch KM, Wunderli-Allenspach H, Bassetti CL, Hermann DM** (2006) Inhibition of multidrug resistance transporter-1-facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia. *Nat Neurosci* 9: 487-488

**Strübing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus AM** (1995) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage *in vitro* gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* 53: 275-287

**Sullivan GW, Carper HT, Sullivan J, Murata T, Mandell GL** (1989) Both recombinant interleukin-1 (beta) and purified human monocyte interleukin-1 prime human neutrophils for increased oxidative activity and promote neutrophil spreading. *J Leukoc Biol* 45: 389-395

**Tabar V, Panagiotakos G, Greenberg ED, Chan BK, Sadelain M, Gutin PH, Studer L** (2005) Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nature Biotechnol* 23: 601-606

**Takagi Y, Nishimura M, Morizane A, Takahashi J, Nozaki K, Hayashi J, Hashimoto N** (2005) Survival and differentiation of neural progenitor cells derived from embryonic stem cells and transplanted into ischemic brain. *J Neurosurg* 103: 304-310

**Takahashi T** (1990) Membrane currents in visually identified motoneurons of neonatal rat spinal cord. *J Physiol* 423: 27-46

**Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW** (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416: 542-545

**Thinyane K, Baier PC, Schindehütte J, Mansouri A, Paulus W, Trenkwalder C, Flügge G, Fuchs E** (2005) Fate of pre-differentiated mouse embryonic stem cells transplanted in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats: histological characterization of the grafted cells. *Brain Res* 1045: 80-87

**Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM** (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147

**Veizovic T, Beech JS, Stroemer RP, Watson WP, Hodges H** (2001) Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke* 32: 1012-1019

**Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, Zigova T, Sanberg CD, Sanberg PR, Willing AE** (2004) Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 35: 2390-2395

**Wang J, Tsirka SE** (2005) Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 36: 613-618

**Wei L, Cui L, Snider BJ, Rivkin M, Yu SS, Lee CS, Adams LD, Gottlieb DI, Johnson EM Jr, Yu SP, Choi DW** (2005) Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 19: 183-193

**Wennberg L, Czech KA, Larsson LC, Mirza B, Bennet W, Song Z, Widner H** (2001) Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. *Transplantation* 71: 1797-1806

**Wernig M, Benninger F, Schmandt T, Rade M, Tucker KL, Büsow H, Beck H, Brüstle O** (2004) Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons *in vivo*. *J Neurosci* 24: 5258-5268

**Wernig M, Scheffler B, Brüstle O** (2003) Medizinische Perspektiven der Stammzellforschung. Aus: *Grundlagen der Molekularen Medizin*, Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2.Auflage, 680-710

**Westenbroek RE, Merrick DK, Catterall WA** (1989) Differential subcellular localization of the RI and RII Na<sup>+</sup> channel subtypes in central neurons. *Neuron* 3: 695-704

**Willing AE, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, Hart C, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR** (2003) Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* 73: 296-307

**Xu ZC, Wilson CJ, Emson PC** (1991) Synaptic potentials evoked in spiny neurons in rat neostriatal grafts by cortical and thalamic stimulation. *J Neurophysiol* 65: 477-493

**Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG** (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416: 545-548

**Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, Zhang L, Wang L, Zhang L, Arniago P, Ho KL, Chopp M** (2003) Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann Neurol* 53: 259-263

**Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M** (2001) Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 105: 33-41

**Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC** (2002) Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174: 11-20

**Zhou H, Lund RD** (1993) Effects of the age of donor or host tissue on astrocyte migration from intracerebral xenografts of corpus callosum. *Exp Neurol* 122: 155-164

**Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futurell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH** (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228

## 8. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Klaus G. Reymann für die Überlassung des interessanten und aktuellen Themas danken, für seine Unterstützung und die kritische Durchsicht der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Holger Braun für die hervorragende Betreuung und das kritische Lesen des Manuskripts. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und verstand es stets mich zu motivieren.

Ich danke allen Mitarbeitern des FAN-Teams herzlich für die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit, die ich mit Ihnen verbracht habe. Mein Dank geht insbesondere an Doris Trzeciak für die hervorragende technische Unterstützung, Anja Günther-Kern für die Tipps bei den immunhistochemischen Färbungen, Dr. Kathrin Baldauf für das kritische Lesen des Skripts und Steven Sauerzweig für die Hilfe beim Verfassen der Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich bei unseren Kooperationspartnern Dr. Marcel Dihné, Dr. Christian Bernreuther und Frau Prof. Dr. Schachner in Hamburg sowie Dr. Andreas Scholz und Christoph Malik in Gießen für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit.

Meinen beiden Freundinnen Olga Chechneva und Claudia Pforte danke ich für die tolle Zeit und ihren steten Optimismus.

Mein größter Dank geht an meine Familie, insbesondere meinen Eltern, ohne deren Geduld und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ich danke Enrico für sein stets offenes Ohr.

## 9. Lebenslauf

Name	Bühnemann
Vorname	Claudia
Geburtsdatum	04.04.1978
Geburtsort	Dessau
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung

1984-1991	Besuch der Polytechnischen Oberschule in Dessau-Mildensee
1991-1996	Besuch des Gymnasiums Philanthropinum Dessau

### Berufsausbildung

1996-2002	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle
2002	Diplom im Fach Tierphysiologie
2002-2006	Promotionsarbeit bei Prof. Dr. K.G. Reymann am Leibniz Institut für Neurobiologie