Universität Ulm
Klinik der Neurologie
Leiter: Prof. Dr. med. A.C. Ludolph

Untersuchung zum Homing-Verhalten unterschiedlicher Stammzellpopulationen nach Cisterna magna-Injektion in einem tierexperimentellen Modell

Dissertation
zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Donat Roman Binder
aus Leonberg
2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Albert Christian Ludolph

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Tobias M. Böckers

Tag der Promotion: 14.02.2008

In dir muss brennen,
was du in anderen entzünden willst.
Aurelius Augustinus (354-430)

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **III**

1) Einleitung **1**

1.1) Die Amyotrophe Lateralsklerose 1

1.2) Die Superoxid-Dismutase 1 und das SOD1-Mausmodell 2

1.3) Stammzelltransplantation als potentielle Behandlungsmethode der ALS 2

1.4) Stammzellen 3

1.5) Neuroanatomie der Maus 5

1.5.1) Zentrales Nervensystem 5

1.5.2) Liquorräume 6

1.5.3) Liquor: Produktion, Zirkulation und Resorption 7

1.5.4) Topographische Lage der Zisternen des äußeren Liquorraums und deren Kommunikation 10

1.6) Fragestellung 11

2) Material und Methoden **12**

2.1) Material 12

2.2) Versuchstiere 15

2.2.1) Genetischer Hintergrund, Zucht, Pathogenese, Lebenserwartung und Haltungsbedingungen der transgenen SOD-Mäuse 15

2.2.2) Genotypisierung der Mäuse 16

2.3) Markierung der zu transplantierenden Stammzellen 21

2.4) Immunsuppression bei xenogener Transplantation mit Cyclosporin A 21

2.5) Transplantation der verschiedenen adulten, humanen Stammzell-populationen in die Cisterna magna 22

2.5.1) Narkose 22

2.5.2) Transplantationstechnik 22

2.6) Histologie 25

2.6.1) Perfusion der Tiere 25

2.6.2) „Dura-Präp“: Präparation des Maus-ZNS in toto unter Erhalt der Dura mater 26

2.6.3) Schnitte 30

2.6.4) Immunhistologie 31

2.7) Methodik der Auswertung 33

3) Ergebnisse **35**

3.1) Verteilung der vier verschiedenen Stammzellpopulationen MSC, MNSC, UBC und UNSC im ZNS-Gewebe und den Liquorräumen zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion von 100 000 Zellen 35

3.1.1) Verteilung im inneren Liquorraum 36

3.1.2) Verteilung im äußeren Liquorraum 41

3.1.3) Intraparenchymale Verteilung 59

3.1.4) Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse nach Transplantations-gruppen geordnet 63

3.2) Verteilung der vier verschiedenen Stammzellpopulationen MSC, MNSC, UBC und UNSC im ZNS-Gewebe und den Liquorräumen 65 Tage nach Cisterna magna-Injektion von 100 000 Zellen 65

3.3) Ausblick: Verteilung von 750 000 transplantierten UBC zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion im ZNS-Gewebe und den Liquorräumen 65

3.3.1) Verteilung im inneren Liquorraum 65

3.3.2) Verteilung im äußeren Liquorraum 67

3.3.3) Intraparenchymale Verteilung 69

4) Diskussion **71**

5) Zusammenfassung **89**

6) Literaturverzeichnis **91**

Abkürzungsverzeichnis

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
BrdU	Bromodeoxyuridin
C.	Cisterna
CsA	Cyclosporin A
CD	Clusters of differentiation
CSF	Cerebrospinal fluid, Liquor
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphoshat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fALS	Familiäre Form der ALS
g	Erdanziehungskraft; $g \approx 9{,}81 m/s^2$
G93A-SOD1-Mutation	Mutation im Gen der SOD1, die zu einem Austausch von Glycin zu Alanin an Position 93 des SOD1-Proteins bewirkt.
GFAP	glial fibrillary acid protein
hMNSC	human hMSC-derived neural stem cell-like cells
hMSC	Humane Knochenmarksstromazellen, human mesenchymal stromal cells
hUBC	humane Nabelschnurblutzellen, human umbilical cord blood cells
hUNSC	human hUBC-derived neural stem cell-like cells
HuNu	„human nuclear antigen“
i.a.	Intraarteriell
ICP	Intrakranieller Druck
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
KG	Körpergewicht

MHC	Major histocompatibility
NaCl	Natriumchlorid
NSC	neural stem cells, neurale Stammzellen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RL4V	Recessus lateralis ventriculi quarti
sALS	sporadische Form der ALS
SOD	Superoxid-Dismutase
UBC	Nabelschnurblutzellen, umbilical cord blood cells
UNSC	UBC-derived neural stem cell-like cells
ZNS	Zentrales Nervensystem

1.) Einleitung

1.1) Die Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), die auch als Lou-Gehrig Erkrankung bekannt ist, wurde 1874 erstmals von Charcot beschrieben **[139].**

Dabei handelt sich um eine Motoneuronerkrankung, die durch den selektiven und progredienten Untergang von Motoneuronen in Cortex, Hirnstamm und Rückenmark gekennzeichnet ist **[31].** Durch die Schädigung des ersten (oberen) und des zweiten (unteren) Motoneurons treten Muskelatrophien, Kombinationen aus spastischen und atrophischen Paresen sowie Faszikulationen und Muskelkrämpfe auf.

Pro Jahr erkranken etwa 2 von 100.000 Menschen an ALS, wobei die höchste Inzidenz zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr besteht und etwas mehr Männer als Frauen erkranken. Damit ist die ALS die häufigste Form einer Motoneuronerkrankung im Erwachsenenalter **[42] [72] [110] [138] [147]**. Die Inzidenz der ALS ist sogar vergleichbar mit der der Multiplen Sklerose. Dennoch differieren die Prävalenzen dieser beiden Erkrankungen stark, da die mittlere Überlebenszeit bei der ALS nach Diagnosestellung lediglich 3 bis 5 Jahre beträgt **[139].** Dies wiederum ist durch die Schwächung der Atemmuskulatur bedingt, die zu einer Atemlähmung und folgenden Sekundärkomplikationen führt **[12] [130] [147]**.

Die Ätiopathogenese der ALS ist bis heute ungeklärt, dennoch kann man zwischen einer sporadischen Form (sALS) und einer familiären Form (fALS) differenzieren. Bei der häufigeren sALS werden epidemiologische Faktoren sowie Theorien über virale Infektionen, Prionenerkrankungen, Exposition von Schwermetallen, Autoimmunität und Paraneoplastizität als mögliche Ursachen genannt **[9] [12] [110] [139]**. Bei der fALS, die nur etwa 10% der ALS Fälle ausmacht, konnten hingegen familiäre bzw. genetische Ursachen nachgewiesen werden. So trägt jeder fünfte fALS-Patient eine Mutation im Gen der Superoxid-Dismutase 1 auf Chromosom 21. Bisher konnten über 100 verschiedene SOD1-Mutationen nachgewiesen werden, deren Phänotypen sich in Bezug auf Krankheitsbeginn, Schweregrad und Progredienz unterscheiden **[1] [5] [42] [100] [137] [139].**

1.2) Die Superoxid-Dismutase 1 und das SOD1-Mausmodell

Bei der Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes zytoplasmatisches Enzym, das als Radikalfänger dient und so die Zelle vor oxidativem Stress schützt **[1] [5] [21] [42] [46] [45] [98].** Dennoch führt ein Verlust der SOD-Aktivität („loss of function“) nicht zur Ausbildung der Erkrankung **[135].** Vielmehr wird davon ausgegangen, dass die Mutation, die zu einem Aminosäurenaustausch an Position 93 des SOD1-Proteins führt (G93A), einen toxischen Funktionsgewinn des Enzyms („gain of function“) bewirkt. **[5] [18] [42] [137].** Außerdem ist es gelungen, diese humane G93A-SOD1-Mutation auf ein Mausgenom zu übertragen, so dass ein transgenes Mausmodell zur Verfügung steht, das klinische und neuropathologische Charakteristika einer selektiven Vorderhorndegeneration aufweist. Dadurch kann an diesem Tiermodell die Pathogenese und Therapie der ALS untersucht werden. **[1] [5] [33] [52] [104] [105]**.

1.3) Stammzelltransplantation als potentielle Behandlungsmethode der ALS

Die Idee, eine Stammzelltransplantation als therapeutisches Mittel in der Behandlung der ALS einzusetzen und dies am Tiermodell zu erforschen, ist aus vielerlei Gründen interessant:

Zum einen besteht keine kurative Therapie für die ALS, wodurch die symptomatische Therapie im Vordergrund steht. Auch die Möglichkeiten durch neuroprotektive Maßnahmen eine Progressionshemmung zu erzielen, sind nicht zufrieden stellend. So ist als einziger Wirkstoff zur neuroprotektiven Therapie beim Menschen Riluzol (Rilutek) zugelassen. Riluzol senkt die Mortalität und verlangsamt die Abnahme der Muskelkraft bei ALS-Patienten, indem es die präsynaptische Glutamatfreisetzung inhibiert und so die glutamaterge Neurotoxizität mindert. Des Weiteren kommt Vitamin E zum Einsatz, das durch seine antioxidative Wirkung eine Verzögerung des Krankheitsprogresses, jedoch keine Verlängerung der Lebenszeit bewirkt **[3] [12] [72] [90] [105] [169]**. Aufgrund dieser eingeschränkten Möglichkeiten ist es unerlässlich, neue therapeutische Strategien –wie die Stammzelltransplantation- zur Behandlung der ALS zu entwickeln, zumal die Voraussetzungen mit einem fest etablierten Mausmodell sehr gut sind.

Zum anderen konnte schon in Tiermodellen zahlreicher neurologischer und neurodegenerativer Erkrankungen –auch im SOD1-Modell der ALS- nachgewiesen werden, dass transplantierte Zellen -wie embryonale oder adulte Stammzellen- die Fähigkeit besitzen, zum geschädigten Gewebe zu wandern, sich *in vivo* zu differenzieren, Funktionen tlw. zu übernehmen und den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen **[14] [25] [31] [39] [48] [49] [60] [65] [81] [83] [143] [144] [150]**.

So interessant wie brisant ist ebenfalls, dass bereits Stammzell-Transplantationen bei ALS-Patienten durchgeführt wurden **[70] [109]**. Auch der bekannte deutsche Maler und ALS-Patient Jörg Immendorff ließ sich 2005 in Peking olfaktorische Hüllzellen transplantieren, obwohl völlig unklar ist, was transplantierte Zellen im Gehirn ALS-Kranker bewirken **[124]**.

Darum muss erforscht werden, ob transplantierte Zellen ins Nervengewebe einwandern, sich differenzieren und sich so funktionell in neuronale Schaltkreise integrieren oder ob eine Bereitstellung von neurotrophen Faktoren durch die transplantierten Stammzellen zu einer symptomatischen Verbesserung und Lebenszeitverlängerung führt bzw. führen kann **[65] [101]**.

1.4) Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte, multipotente Zellen, die sich über einen längeren Zeitraum durch Zellteilung selbst erneuern können und unter bestimmten physiologischen oder experimentellen Bedingungen ausdifferenzieren können, d.h. zu Zellen mit einer bestimmten Funktion werden können. Die eigentliche Aufgabe von Stammzellen ist es, zugrunde gegangenes Gewebe zu ersetzen oder in sich entwickelndem Gewebe zu Organen heran zu reifen **[32] [83] [150].**

Man unterscheidet je nach Herkunft der Stammzellen embryonale und adulte Stammzellen. Bei embryonalen Stammzellen handelt es sich um pluripotente Zellen, die in alle verschiedenen Zelltypen des Körpers ausdifferenzieren können. Doch ethische Bedenken, gesetzliche Regelungen und die Neigung zur Ausbildung Teratom-ähnlicher Tumore *in vivo* beschränken den Einsatz embryonaler Stammzellen **[14] [32].** Ein weiterer Grund für die Verwendung adulter humaner Stammzellen ist der Ausblick auf eine autologe Stammzelltherapie, bei der Stammzellen aus dem Knochenmark des Patienten entnommen, vermehrt, gezielt manipuliert und schließlich re-implantiert werden. Dies würde eine

Abstoßungsreaktion über MHC-Proteine –wie sie bei allogenen Transplantationen ausgelöst wird- verhindern. So wurden mehreren ALS-Patienten in einer Pilotstudie bereits autologe Knochenmarkszellen injiziert **[32] [83] [99] [143].**

Aus diesen Gründen haben wir uns für die Verwendung von vier verschiedenen humanen, adulten Stammzellpopulationen entschieden.

So wurden zum einen frisch isolierte humane Knochenmarkstromazellen (hMSC) verwendet **[41].** Diese hMSC können sich in Zellen der mesodermalen **[10] [34] [86] [126] [162]** und der entodermalen Zelllinie entwickeln **[127] [128]**, doch für uns ist ihre Fähigkeit, sich auch in Zellen der ektodermalen Zelllinie -wie Astrozyten und funktionelle Neurone- entwickeln zu können, von entscheidendem Interesse **[19] [38] [73] [84] [86] [113] [141] [170].**

Aus diesen hMSC wurden auch die proneural konvertierten, sogenannten hMNSC abgeleitet. Diese hMNSC besitzen ein hohes Potential, Zelltypen des Nervensystems zu generieren **[47] [59] [83] [152] [174]**. Ersten Untersuchungen zufolge, scheinen sie in puncto Differentierungsfähigkeit den neuralen Stammzellen (NSC), die aus fetalem oder adultem Hirngewebe stammen, zu ähneln **[59] [61] [157]**.

Zum anderen wurden humane Nabelschnurblutzellen (hUBC) verwendet, die frisch aus Nabelschnurvenen isoliert und mittels Ficoll-Gradienten aufgereinigt wurden. In einem weiteren Schritt wurden daraus $CD34^+$ Zellen angereichert **[24]**. Diese hUBC können *in vitro* den morphologischen Phänotyp und die Antigenität neuraler Zellen annehmen und sogar *in vivo* können sie neurale Eigenschaften ausbilden **[13] [54] [142] [143] [175]**. Außerdem konnte bereits in früheren Studien ein positiver Effekt der UBC auf den Symptombeginn und die Überlebenszeit im SOD1-Tiermodell beobachtet werden **[39] [49].**

Aus diesen hUBC wurden über einen Zeitraum von drei Jahren ebenfalls proneural konvertierte Zellen, die hUNSC, herangezüchtet **[77].** Diese hUNSC exprimieren Marker, die sehr spezifisch für multipotente NSC sind. Dementsprechend hoch ist ihr Potential zur neuralen Differenzierung **[24].**

Die Transplantation der proneural konvertierten Stammzellen (hMNSC und hUNSC) ist von besonders hohem Interesse, da in vergangenen Studien gezeigt werden konnte, dass die Transplantation bereits gezielt beeinflusster Zellen einen verbesserten therapeutischen Effekt bewirken kann **[60] [63].**

1.5) Neuroanatomie der Maus

Da das Maus-ZNS den Aufbau eines typischen Säugetiergehirns besitzt **[30]**, werden – im Folgenden wie auch in der Fachliteratur- zur Nomenklatur der Neuroanatomie der C57BL/6J-Maus Begriffe in Analogie zur Humananatomie verwendet.

1.5.1) Zentrales Nervensystem

Das Gehirn einer Maus entspricht vom Aufbau her einem typischen Säugetiergehirn. Die beiden Großhirnhemisphären, zwischen denen sich posteriodorsal die Epiphyse befindet, werden durch die Fissura longitudinalis cerebri getrennt. Die sehr prominent ausfallenden Bulbi olfactorii befinden sich am anterioren Ende des Gehirns. Das Cerebellum besteht aus dem medianen, unpaaren Vermis, den beiden Kleinhirnhemisphären, die die für Säugetiere typische Anordnung der Lobi aufweisen, und den beidseits ventrolateral deutlich hervortretenden Paraflocculi. Auf der basalen Gehirnfläche lassen sich der Abgang und der Verlauf der Hirnnerven gut erkennen.

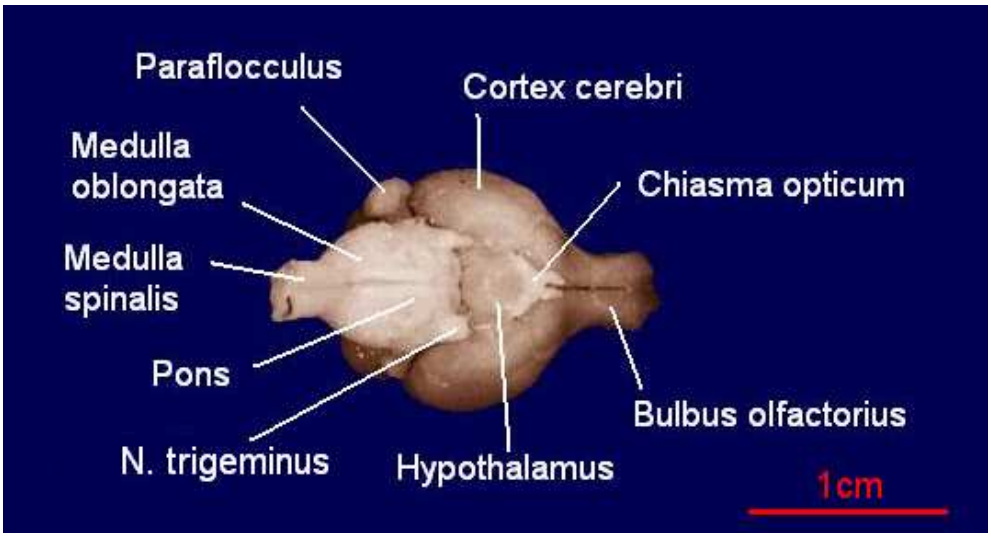


Abbildung 1: Mausgehirn in Basalansicht

Die Medulla oblongata, welche ventral des Cerebellums liegt, bildet das posteriore Ende des Gehirns und geht kaudal in das Rückenmark über **[30].** Das Rückenmark der Maus wird in acht zervikale, 13 thorakale, sechs lumbale, vier sakrale und drei coccygeale Segmente untergliedert **[148].** Geschützt wird es durch die Wirbelsäule, die bei Mäusen

aus sieben zervikalen, 13 tharokalen, sechs lumbalen, vier sakralen und 28 kaudalen Wirbelkörpern besteht **[29].**

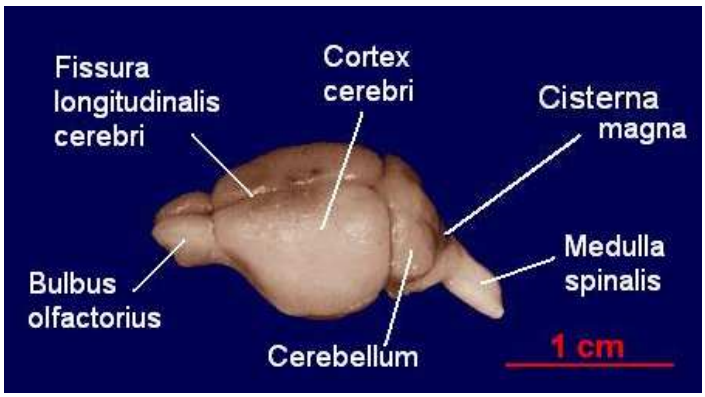
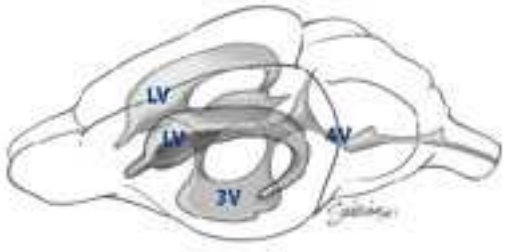


Abbildung 2: Mausgehirn von laterodorsal

1.5.2) Liquorräume

Das Liquorsystem kann in einen inneren Liquorraum und einen äußeren Liquorraum unterteilt werden, die miteinander in offener Beziehung stehen.

Der innere Liquorraum besteht aus vier Ventrikeln, deren Verbindungen und dem Zentralkanal des Rückenmarks. Dabei befinden sich die paarigen Seitenventikel (Ventriculi laterales) in den beiden Großhirnhemisphären. Per definitionem entspricht dabei der I.Seitenventrikel dem linken und der II.Seitenventrikel dem rechten Seitenventrikel. Jeder Seitenventrikel mündet über ein Foramen interventriculare (Foramen Monroi) in den unpaaren III.Ventrikel (Ventriculus tertius), der im Bereich des Diencephalons liegt. Von diesem geht der Aquaeductus cerebri (Aquaeductus Sylvii) aus, der durch das Mesencephalon zum IV.Ventrikel (Ventriculus quartus) zieht.



LV: Seitenventrikel 3V: III.Ventrikel 4V: IV.Ventrikel

Abbildung 3: Innerer Liquorraum der Maus

Der IV.Ventikel liegt im Bereich des Rhombencephalons, wobei der Boden von der Rautengrube und das Dach vom Cerebellum mit Velum medullare superius et inferius

gebildet werden. Der IV.Ventrikel verjüngt sich am unteren Ende der Medulla oblongata zunehmend und geht in den engen Zentralkanal des Rückenmarks (Canalis centralis medullae spinalis) über. Dieser Zentralkanal endet am Ende des Rückenmarks blind und nimmt nicht an der Liquorzirkulation teil **[87].**

Zudem besitzt der IV.Ventrikel eine mediane Öffnung (Foramen Magendii) und am Ende seiner beidseits vorhandenen Recessus laterales jeweils eine laterale Öffnung (Foramina Luschkae), die Verbindungen zwischen innerem und äußerem Liquorraum darstellen **[11] [51] [78] [123] [163].**

Der äußere Liquorraum umgibt sowohl das Gehirn als auch das Rückenmark vollständig und wird vom Subarachnoidalraum sowie dessen Erweiterungen (Zisternen) gebildet. Die beiden wichtigsten Zisternen sind die Cisterna magna und die Cisterna basalis, die auch bedeutende Zugangswege für neurochirurgische Eingriffe darstellen.

Als Cisterna magna wird der große, posteriore Abschnitt der Cisterna cerebellomedullaris bezeichnet. Sie kann beim Menschen wie auch bei der Ratte oder Maus durch die Membrana atlantooccipitalis punktiert werden **[65] [71] [120] [159] [161] [165] [171] [173]**, wobei eine Verletzungsgefahr für Medulla oblongata und Blutgefäße besteht. Die Cisterna magna steht durch das Foramen Magendii mit dem IV.Ventrikel und über das Foramen occipitale magnum mit dem Spatium subarachnoideum spinalis in Verbindung. Nach oben geht sie in die Cisterna cerebelli superior über und mit ihren lateralen Abschnitten, die um den Hirnstamm herum reichen, steht sie mit der Cisterna basalis in Verbindung. Die Cisterna basalis stellt ein vielkammeriges System aus mehreren paarigen lateralen und unpaaren medianen Zisternen dar. Sie erstreckt sich von der Unterfläche der Bulbi olfactorii bis zum Foramen magnum und enthält wichtige Strukturen wie Hirnnervenwurzeln und große Arterienstämme.

1.5.3) Liquor: Produktion, Zirkulation und Resorption

Der Liquor wird überwiegend vom Plexus choroideus der vier Hirnventrikel gebildet, aber ein Anteil von bis zu 40% stammt aus extrachoroidalen Quellen **[131]**. Der Liquor füllt den inneren und äußeren Liquorraum (ventrikulärer und subarachnoidaler Liquor) aus und steht in freiem Austausch mit der Flüssigkeit im Extrazellularraum des Hirngewebes (interstitieller Liquor).

Die Liquorzirkulation geht von den Seitenventrikeln aus, von denen der Liquor über die Foramina interventricularia in den III.Ventrikel und von dort über den Aquaeductus cerebri weiter in den IV.Ventrikel strömt. Von dort gelangt er über die Aperturae laterales et mediana in den Subarachnoidalraum, also auch in die Cisterna magna, und nimmt von dieser zwei unterschiedliche Wege:

Der erste, kaudale Weg führt in den spinalen Subarachnoidalraum, wo ein Teil des Liquors an den Austrittsstellen der Spinalnerven resorbiert wird.

Der zweite, rostrale Weg führt in die Cisterna basalis, entlang der basalen Oberfläche des Hirnstamms. Von dort gelangt der Liquor in den frontalen und lateralen Subarachnoidalraum der Hemisphären oder über die Cisterna ambiens und die Cisterna quadrigeminalis in den Subarachnoidalraum der medialen und okzipitalen Abschnitte des Endhirns. Ein geringer Anteil gelangt über den sog. transmuralen Weg durch das Parenchym zurück in die Ventrikel **[37].**

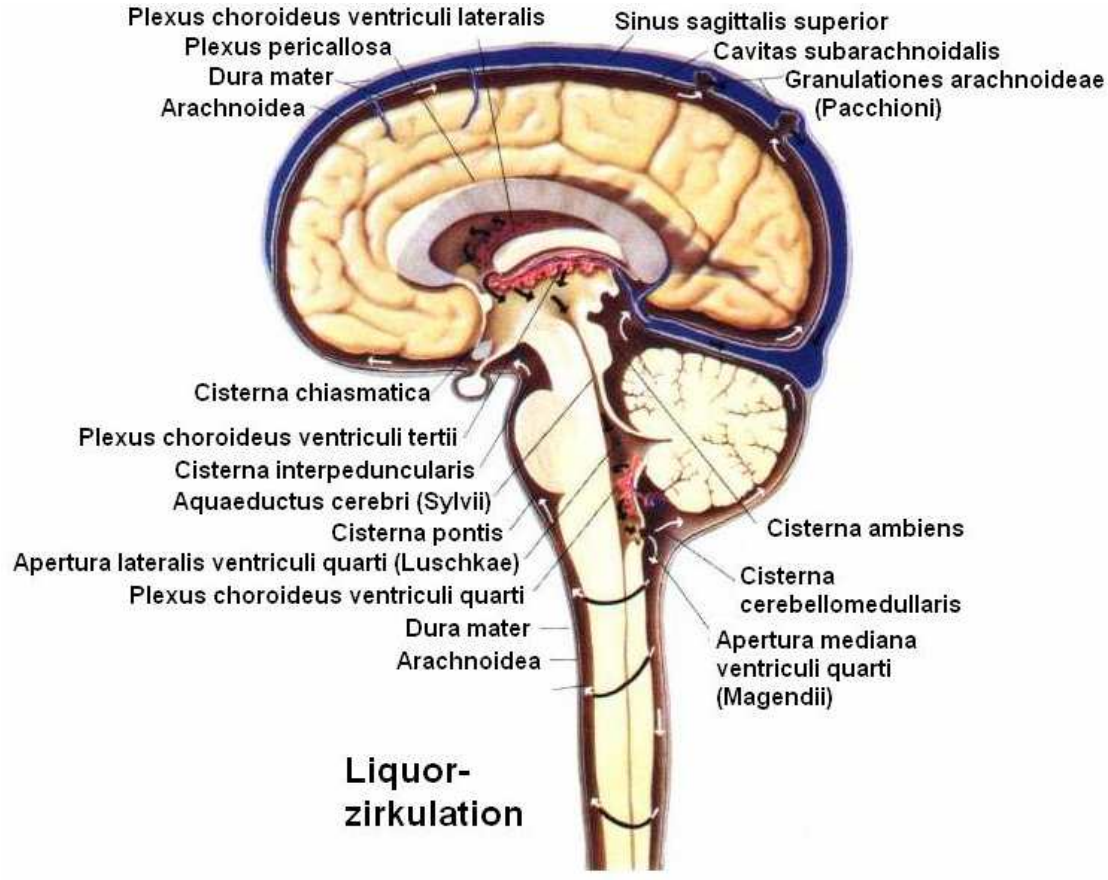


Abbildung 4: Liquorräume und Liquorzirkulation beim Mensch **[117]**

Dabei ist nahezu der gesamte Liquorfluss pulsatiler Natur **[66]**. Letztlich gelangt die Hauptmenge des Liquors in die kranialen Arachnoidalzotten (Pacchionische

Granulationen), wo er resorbiert wird **[80] [116] [123] [146] [151]**. Einen weiteren wichtigen Resorptionsort stellen die Austrittsstellen der Nervenwurzeln von Hirn- und Rückenmarksnerven dar **[74] [75]**.

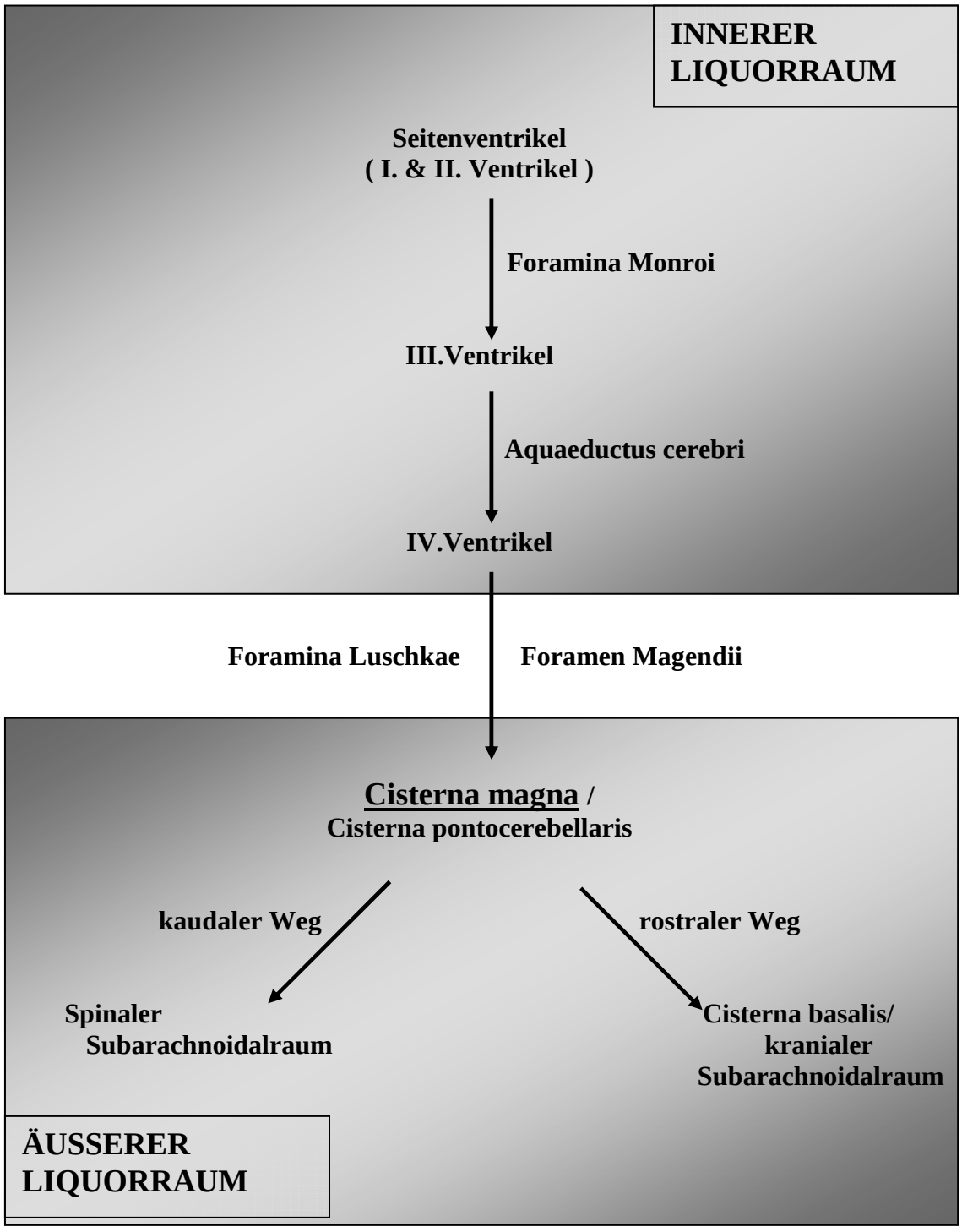


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Liquorräume und des Liquorflusses im Zentralen Nervensystem von Säugetieren (in Anlehnung an **[51]**)

1.5.4) Topographische Lage der Zisternen des äußeren Liquorraums und deren Kommunikation

Tabelle 1: Zisternen des äußeren Liquorraums – Lage und Kommunikation (in Anlehnung an **[36]**)

C. : Cisterna * gehört zum Zisternen-Komplex der Cisterna basalis

Cisterna	**Topographie**	**Kommunikation**
C. olfactoria*	reicht von der Basalfläche des Bulbus bis zum Chiasma opticum	C. chiasmatica
C. chiasmatica*	umgibt das Chiasma opticum	C. interpeduncularis C. hypophysea
C. hypophysea*	zwischen Diaphragma sellae und Hypophyse	C. chiasmatica
C. interpedulcularis*	basal des Mittelhirns	C. pontis C. ambiens
C. ambiens*	umfasst lateral des Mesencephalon	C. interpedincularis C. quadrigeminalis
C. quadrigeminalis	Lamina quadrigeminalis, enthält Epiphyse	C. ambiens C. pericallosa - über C. cerebelli superior mit C. magna
C. pontis*	basal der Pons, zwischen Pons und Clivus	C. premedullaris C. interpeduncularis
C. pontocerebellaris*	lateral der Pons, Kleinhirnbrückenwinkel	C. ambiens C. pontis C. cerebellomedullaris - über Foramen Luschkae mit dem IV.Ventrikel
C. premedullaris*	ventral der Medulla oblongata	Spatium subarachnoideum spinalis C. cerebellomedullaris C. pontis
C.cerebellomedullaris lateralis*	ventrolateral von Medulla oblongata, zwischen Foramen magnum und unterem Rand der Pons	C. premedullaris C. pontis C. pontocerebellaris C. magna Spatium subarachnoideum Spinalis
C. magna (C.cerebellomedullaris posterior)	begrenzt durch Cerebellum, Medulla und Velum medullare inferior	- über das Foramen Magendii mit dem IV.Ventrikel - über das Foramen magnum mit dem Spatium subarachnoideum spinalis - über die C.cerebelli superior mit der C. quadrigeminalis - über die C. cerebellomedullaris Lateralis mit der C. basalis
Spatium subarachnoideum spinalis	umgibt das Rückenmark; ventral zur C. spinalis anterior erweitert	C.premedullaris C. cerebellomedullaris lateralis C.magna

1.6) Fragestellung

Die Aussicht auf eine Stammzelltherapie –besonders einer autologen- ist bei ALS-Patienten wie bereits beschrieben aus vielerlei Gründen von Interesse. Es besteht derzeit keine kausale Therapie für die ALS und eine Stammzelltransplantation hat schon in Tiermodellen unterschiedlicher neurologischer und neurodegenerativer Erkrankungen eine positiven Effekt bewirkt. Die Tatsache, dass bereits erste Transplantationen bei ALS-Patienten durchgeführt wurden, ohne zu wissen ob oder was die transplantierten Zellen bewirken, macht die Untersuchung dieser Therpiestrategie umso notwendiger.

Eine wichtige, vom Wirkungsmechanismus unabhängige Vorraussetzung dafür, dass transplantierte Stammzellen einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf der ALS nehmen könnten, ist es, dass transplantierte Stammzellen in ausreichend hoher Anzahl in Bereichen des ZNS wie Cortex, Hirnsstamm oder Rückenmark angetroffen werden, die bei der ALS vorwiegend betroffen sind.

Ob diese Vorraussetzung nach einer Cisterna magna-Injektion von Stammzellen erfüllt wird, wurde in dieser Dissertation am SOD1-Mausmodell der ALS untersucht.

Dazu wurden insgesamt vier verschiedene humane, adulte Stammzellpopulationen - hMSC und hUBC sowie die proneural konvertierten hMNSC und hUNSC- mittels stereotaktischer Operation in die Cisterna magna von transgenen SOD1-Mäusen an deren 45. Lebenstag transplantiert. Anschließend wurde dann das Homingverhalten dieser Stammzell-populationen im transgenen SOD1-Mausmodell der ALS zehn und 65 Tage nach Cisterna magna-Transplantation untersucht:

1) Welches Verteilungsmuster zeigen die vier verschiedenen Stammzellpopulationen im Liquorraum des transgenen SOD1-Mausmodells der ALS 10 und 65 Tage nach Cisterna magna-Transplantation?
2) In welchen ZNS-Bereichen transgener SOD1-Mäuse finden sich transplantierte Stammzellen mit intraparenchymaler Lage 10 und 65 Tage nach Cisterna magna-Transplantation und in welchen Zellschichten finden sich diese Zellen?
3) Hat eine gezielte Migration der transplantierten Stammzellen im Sinne eines Tropismus in ZNS-Areale, die bei der ALS neurodegenerativen Prozessen unterliegen, stattgefunden?

2.) Material und Methoden

2.1) Material

Verwendetes Material

PBS [Dulbecco's PBS (1x)]	PAA Laboratories GmbH
Triton X-100	Sigma
Ziegenserum (Goat Serum)	DakoCytomation, Denmark
Tween 20	Bio-Rad Laboratories
BSA	Sigma-Aldrich
Gelatine (gelatine from porcine skin)	Sigma
Mouse Anti-Human Nuclei (HuNu), monoclonal antibody	Chemicon
Rabbit Anti-Neuronal Class III ß-Tubulin Polyclonal Antibody	Convance
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes Inc
Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes Inc
Vectashield H-1000 (Mounting Medium for Fluorescence)	Vector Laboratories Inc
Vectashield H-1200 (Mounting Medium for Fluorescence with DAPI)	Vector Laboratories Inc
HOECHST 33342	Sigma-Aldrich
Super Frost Plus	Menzel-Gläser
Deckgläser	Marienfeld
Sucrose	Sigma
Isopentan (2-Methylbutan)	Merck
M-1 Embedding Matrix,	Thermo Shandon
Leica Cryofect	Leica Microsystems
Präparationsbesteck	Aescolap
EDTA	Sigma
PFA (Accustain)	Sigma-Aldrich
dest. Wasser	
10 X PCR Puffer	Invitrogen.

$MgCl_2$ (50mM)	Invitrogen
dNTP Set (100mM Soltions)	Amersham Biosciences
Primer SOD Maus 42	Thermo Electron GmbH
Primer SOD Maus 43	Thermo Electron GmbH
Primer SOD Maus 113	Thermo Electron GmbH
Primer SOD Maus 114	Thermo Electron GmbH
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen
Standardagarose LE-Agarose	Biozym
Tris	
Glycerin	
Bromphenlblau	
Ethidiumbromid	Sigma
GeneRuler, 100bp DNA Ladder	Fermentas
Xylazin (Rompun 25)	Bayer
Ketamin 10%	Bela-Pharm GmbH & Co.KG
Atropinsulfat	B.Braun Melsungen AG
Chloralhydrat	
Cyclosporin A (Sandimmun optoral)	Novartis
Klammern DS-25	Ullrich Medizintechnik
GC-Spritzen 25µl, gastight, Typ 1702 RN mit auswechselbarer Nadel (gauge 30, Schliff pst2, 51mm)	Hamilton

Verwendete Programme

AxioVision 3.1

AxioVision LE Rel. 4.2.

Verwendete Kits

PCR-Kit	Taq DNA Polymerase, recombinant. Invitrogen
DNA-Isolierung	DNeasy Tissue Kit ,QIAGEN

Verwendete Geräte

Mischgerät	GFL 3005, Gesellschaft für Labortechnik mbH
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135, Zeiss
Camera	AxioCam, Zeiss
Vortex	MS2 Minishaker, IKA
Mikrotom	Leica CM3050S, Leica microsystems
Wasserbad	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik
Mikrowelle	Micromat, AEG
Licht (Durapräparation)	KL 1500 electronic, Schott
Bench	Heraeus
Mikroskop (Durapräparation)	M6C-10
Kühlschrank -80°C	Herafreeze, Heraeus Instruments
Kühlschrank -20°C	GS 1423 Index 24B/001, Liebherr Premium
Kühlschrank +4°C	KTP 1730 Index 26/001, Liebherr Premium
pH-Meter	pH-Meter ph 523, WTW
Elektrophorese-Kammer	Wide mini-sub cell GT, Bio Rad
Rüttelinkubator	GFL, 3033, Gesellschaft für Labortechnik mbH
Stereotaktische Apparatur	Small Animal Stereotactic Frame, ASI-Instruments
Perfusor	Perfusor fm, Braun
Transplantationspumpe	Micro 4, Controller for the Ultra Microsyringe Pump, World Precision Instruments Inc.
Operationsmikroskop	Stemi 2000-C, Zeiss
Operationsbeleuchtung	KL 1500 electronic, Zeiss
Netzgerät Elektrophorese	Power Pac 300, Bio Rad
Agarosegel-Kamera	Gel Doc 1000, Bio Rad
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra

2.2) Versuchstiere

2.2.1) Genetischer Hintergrund, Zucht, Pathogenese, Lebenserwartung und Haltungsbedingungen der transgenen SOD-Mäuse

Es wurden transgene B6SJL-Mausmännchen, die die humane SOD1-Mutation G93A tragen (B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J), und nicht transgene B6SJL-Mausweibchen bei Jackson Laboratory (Ben Harbor, ME, USA) erworben. Diese Tiere wurden in der Tierforschungsanstalt der Universität Ulm verpaart, um eine heterozygote Mauslinie zu erhalten.

Um festzustellen, bei welchen der gezüchteten Tiere es sich um transgene Tiere handelt, wurde bei jedem Tier eine Gewebeprobe genommen und damit eine PCR durchgeführt **[52]**. Bei den transgenen Tieren wurde zusätzlich noch die Anzahl der SOD1-G93A-Genkopien ermittelt **[55]**, da eine Abnahme der Kopienzahl mit einem verlängerten Überleben einhergeht **[53].**

Die durchschnittliche Überlebenszeit dieser Tiere schwankt zwischen 115 und 150 Tagen (mittel 130 Tage), wobei etwa ab Tag 80 erste Symptome wie Reflexsteigerung und Tremor beobachtet werden, später (ab Tag 120) gefolgt von zunehmenden Muskelparesen.

Alle Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten: 21°C Raumtemperatur, 55% relative Luftfeuchtigkeit, 12h-Licht/12h-Dunkel-Wechsel, Licht ab 8Uhr morgens. Dabei wurde aufgrund der Immunsuppression der Tiere besonders auf Hygiene geachtet.

Die Verwendung der Tiere ist zuvor von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Tübingen, Referat 35 genehmigt worden (Registriernummer 816).

2.2.2) Genotypisierung der Mäuse

2.2.2.1) DNA-Isolierung aus Mäuseschwänzen

Um zu bestimmen, welche der gezüchteten Tiere transgen waren, benötigte man eine Gewebeprobe von jedem Tier. Hierzu wurde die Schwanzspitze der Tiere um etwa 5mm gekappt und die Gewebeproben wurden einzeln in 1,5 ml Eppendorf-Küvetten getan. Die Eppendorf-Küvetten wurden beschriftet und das jeweils zugehörige Tier wurde mittels Einkerbungen an den Ohren markiert.

Zur Isolierung der Mäuse-DNA wurde der DNeasy Tissue Kit von QIAGEN verwendet.

Als erster Schritt wurden in die Eppendorf-Küvetten, die die Gewebeproben enthielten, 180 µl Puffer ATL und 20 µl Protease K gegeben und über Nacht bei 55 ºC in einem Rüttel-Inkubator belassen. Am nächsten Tag wurden die nun verdauten Proben gevortext, 400 µl Puffer AL - Ethanol (Verhältnis Puffer AL / Ethanol 1:1) hinzugegeben und erneut gevortext. Diese Mischung wurde nun auf die Filtermembran (DNeasy-Membran) der Filtersäule (DNeasy Mini Spin Column), die sich in einer 2ml Sammelküvette (collection tube) befand, gegeben und bei 6.000 g für eine Minute zentrifugiert. Darauf wurde die Sammelküvette samt der enthaltenen Flüssigkeit verworfen. Die Filtersäule wurde jedoch in eine neue 2ml Sammelküvette gesteckt, 500 µl Puffer AW1 auf die Filtermembran gegeben und bei 6.000 g für eine Minute zentrifugiert. Nun wurde wiederum die Sammelküvette mitsamt ihrer enthaltenen Flüssigkeit verworfen, die Filtersäule in einer neuen 2ml Sammelküvette platziert, 500 µl Puffer AW2 auf die Filtermembran pipettiert und für 3 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert, um die Filtermembran zu trocknen.

Die Filtersäule wurde jetzt in eine 1,5 ml Eppendorf-Küvette gesteckt. Um die DNA aus der DNeasy-Membran auszuwaschen, wurden 100 µl Puffer AE direkt auf die Filtermembran pipettiert, das Ganze eine Minute bei Raumtemperatur zum Inkubieren stehen gelassen und dann bei 6000 g für eine Minute zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde nochmals wiederholt, worauf die Filtersäule verworfen wurde. Die Eppendorf-Küvetten enthielten nun die isolierte DNA und wurden bis zur Durchführung der PCR bei 4ºC aufbewahrt.

2.2.2.2.) DNA-Amplifikation mittels PCR

Die PCR ist eine enzymatische Methode, um eine spezifische Gensequenz *in vitro* exponentiell zu vermehren. Der Reaktionsansatz besteht dabei aus der isolierten DNA, die nur bei den transgenen Tieren das mutierte SOD1-Gen enthält, der thermostabilen Taq-Polymerase, einem dNTP-Mix, den Primern und einem Puffer (s.u.). Die Taq-Polymerase ist eine DNA-Polymerase, die aus dem thermophilen Bakterium Thermus aquaticus stammt. Die Primer sind synthetische Oligonukleotide, die am Ende der zu untersuchenden DNA-Sequenz komplementär an einen der beiden DNA-Stränge binden und als Polymerisationsstarter dienen. Der dNTP-Mix (10mM) besteht zu gleichen Teilen aus dATP, dCTP, dTTP und dGTP.

Während einer PCR werden in einem Thermocycler mehrere Zyklen durchlaufen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht. Zuerst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen in seine Einzelstränge aufgespaltet (Denaturierung). Dann wird der Reaktionsansatz abgekühlt, damit die Primer an die ihnen komplemantären DNA-Sequenzen binden können (Annealing). Nun werden an die Primer durch die Taq-Polymerase die jeweils komplementären NTPs angeknüpft (Elongation) und so das DNA-Molekül kopiert. Daraufhin wird durch erneutes Erhitzen ein neuer Zyklus begonnen.

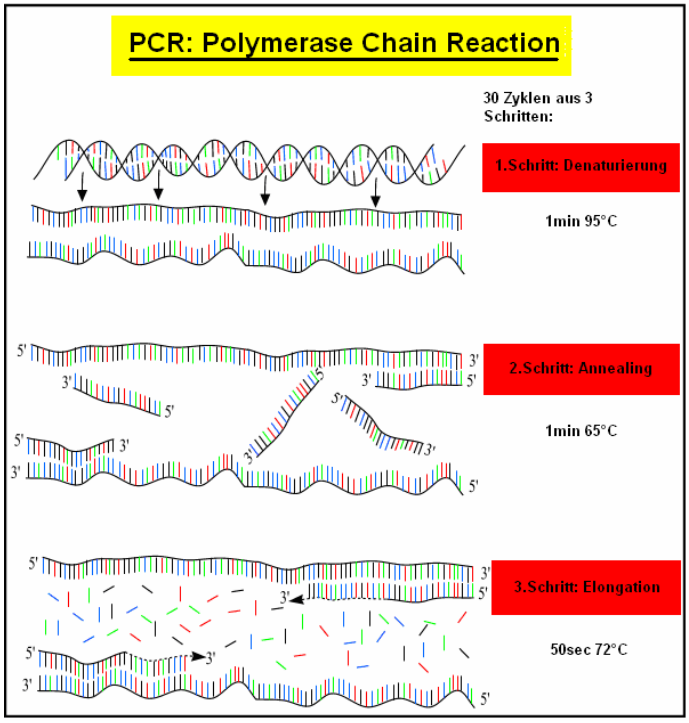


Abbildung 6: Schematischer Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

SOD-PCR-Ansatz

Zu jeder DNA-Probe von 4,0µl wird hinzu gegeben:

Dest. Wasser	27,0 µl
PCR-Puffer	5,0 µl
$MgCl_2$ (50mM)	1,5 µl
dNTPs (10mM)	4,0 µl
Primer 42	2,0 µl
Primer 43	2,0 µl
Primer113	2,0 µl
Primer 114	2,0 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl

Thermocycler Programm

1.) 5 Minuten: 95°C
2.) 1 Minute: 95°C
3.) 1 Minute: 60°C
4.) 50 Sekunden: 72°C
5.) 30 Zyklen: 30x Schritt 2.) - 4.)
6.) 10Minuten: 72°C

SOD-1 Primer: Sequenzen

Primer 42: 5` CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT 3`
Primer 43: 5` GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC 3`
Primer 113: 5` CAT CAG CCC TAA TCC ATC TGA 3`
Primer 114: 5` CGC GAC TAA CAA TCA AAG TGA 3`

2.2.2.3) Agarosegel-Elektrophorese und Visualisierung der Banden

Die Agarosegel-Elektrophorese dient zur Auftrennung bzw. zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten. Sie bedient sich dabei der unterschiedlichen Wandergeschwindigkeiten verschieden großer DNA-Stücke im elektrischen Feld. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern DNA-Moleküle im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode, wobei kleine DNA –Fragmente schneller wandern als große. Gleich große DNA-Stücke wandern gleich schnell und bilden dadurch sogenannte „Banden“ aus. Diese Banden werden unter einer UV-Lampe sichtbar, weil sich das im Gel befindliche Ethidiumbromid, welches unter UV-Licht fluoresziert, interkalierend in die DNA –Stücke einlagert. Zur Größenbestimmmung können sogenannte „DNA –Leitern“ verwendet werden, die DNA- Fragmente bekannter Größen enthalten und somit mehrere Banden ausbildet. Die Laufstrecken dieser bekannten DNA –Fragmente werden nun mit der Laufstrecke der DNA –Proben verglichen und so kann die Größe der Proben-DNA abgeschätzt werden.
In unserem Fall diente die Elektrophorese der Feststellung, ob ein Tier transgen war oder nicht. Bei einem transgenen Tier entsteht in der PCR ein DNA- Fragment, das sich in der Größe von dem DNA –Fragment, das bei einem nicht-transgenem Tier in der PCR entsteht, unterscheidet. Dieser Größenunterschied bewirkt, dass sich in der Gelelektrophorese für transgene bzw. nicht-transgene Tiere zwei unterschiedliche Banden bilden.

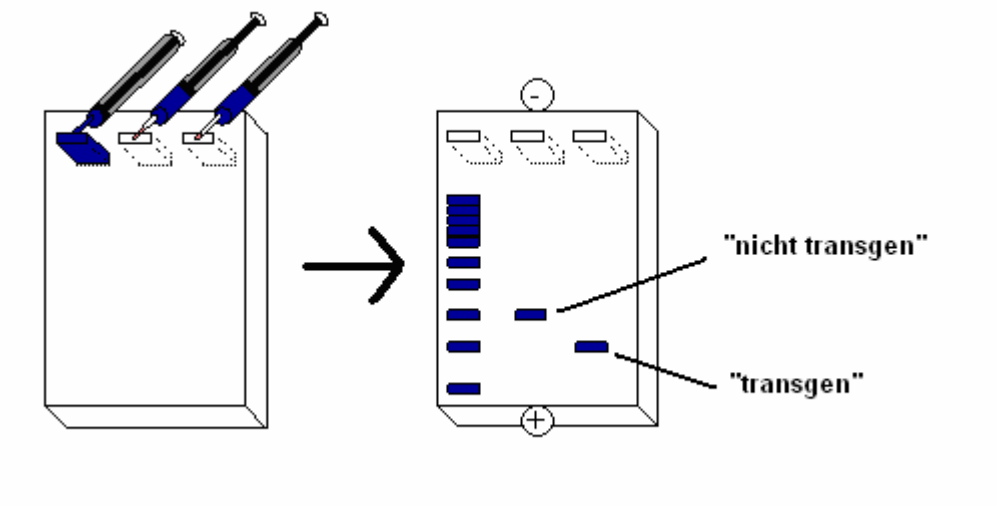


Abbildung 7: Schematischer Ablauf einer Agarosegel-Elektrophorese

Herstellung Agarosegel:

Zunächst wurde eine 2%ige Agaroselösung in 1x TAE-Puffer hergestellt. Diese wurde dann in der Mikrowelle erhitzt, damit die Agarose vollständig in Lösung ging. In die sich abkühlende Lösung wurden dann etwa 1µl Ethidiumbromid pro10ml Gellösung gegeben. Dabei ist zu beachten, dass Ethidiumbromid mutagen wirkt! Die Lösung musste nun gut gerührt werden, um eine gleichmäßige Verteilung des Ethidiumbromids zu gewährleisten, bevor sie in eine geeignete Gelkammer gegossen wurde. In diese Gelkammer ragte etwa 5 mm vom Rand entfernt ein „Kamm“ von oben in die Gellösung hinein, so dass später im Gel sogenannte „Taschen“ bzw. „slots“ entstanden.

Herstellung des 1x TAE-Puffer:

Zunächst wurde eine 50x TAE stock-Lösung hergestellt, indem 121 g Tris-HCl und 28,55 g Essigsäure (99-100%) mit 0,5 M EDTA auf pH 8 titriert und anschließend mit Aqua dest. auf 500 ml aufgefüllt wurden. Durch eine 1:50 Verdünnung dieser stock-Lösung mit Aqua dest. erhielt man dann den 1x TAE-Puffer.

Herstellung Ladepuffer:

40 mg Bromphenolblau und 4 ml Glycerin wurden mit 0,5 M EDTA auf pH 8 titriert.

Durchführung der Gelelektrophorese:

Die hergestellte Gelmatrix wurde so in die Gelelektrophoreseapparatur gelegt, dass sich die „slots“ auf der Kathodenseite befanden. Außerdem musste das Gel vollständig mit 1x TBE-Laufpuffer bedeckt sein. In die erste „Tasche“ wurden etwa 5µl einer „DNA –Leiter“ (GeneRuler, 100bp DNA Ladder, Fermentas) gegeben und in jede weitere Tasche 8µl einer DNA-Probe zusammen mit 2µl Ladepuffer. Dann wurde eine Spannung von 80V für etwa 30 Minuten angelegt. Anschließend wurden die gebildeten Banden unter einem UV-Transilluminator und mit Hilfe einer Analyse-Kamera (Gel Doc 1000, Bio Rad) sichtbar gemacht. Dabei gehörten die Banden, die weiter an der Anode lagen, zu den transgenen Tieren (s. Abbildung 7)

2.3.) Markierung der zu transplantierenden Stammzellen

Um die transplantierten Stammzellen 10 Tage nach ihrer Transplantation im Gewebe des Empfängers nachweisen zu können, wurden sie vor ihrer Transplantation mit
1 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO) für 30 Minuten bei 37°C in DMEM, das 10% FBS enthielt (hMSC, hUBC und hUNSC) bzw. in P4-8F Medium (hMNSC) markiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschritte mit PBS, um überschüssigen HOECHST 33342-Farbstoff zu entfernen, der nicht von Zellen aufgenommen wurde. Aus demselben Grund und um HOECHST zu entfernen, das von den Zellen zunächst aufgenommen, aber nicht gebunden wurde, wurden die hMSC und hMNSC noch zusätzlich für eine Dauer von 24 Stunden in einem frischen Kulturmedium angesetzt. Anschließend wurden die Zellen kurz vor ihrer Transplantation gezählt und in PBS mit einer Zelldichte von 10.000Zellen/µl resuspendiert
Im Gegensatz dazu wurden jenen Tieren, bei denen die Verteilung der transplantierten Zellen 65 Tage nach der Transplantation erfasst werden sollte, nicht markierte Zellen (hMSC, hMNSC, hUBC, hUNSC) transplantiert. Dies war notwendig, da HOECHST 33342 über längere Zeit zelltoxisch wirkt. Stattdessen wurde hier für den Nachweis der Zellen eine immunhistologische Färbung mit einem Antikörper gegen „human nuclear antigen“ (HuNu) gewählt (s. Kapitel 2.6.4.)

2.4) Immunsuppression bei xenogener Transplantation mit Cyclosporin A

Alle Tiere wurden ab ihrem 44.Lebenstag, also ab einem Tag vor der xenogenen Transplantation, bis zu ihrem Todestag täglich mit Cyclosporin A behandelt, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern **[17].** Das CsA (Sandimmun Optoral Lösung, Novartis) wurde dabei oral mit einer täglichen Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Um eine Geruchs- bzw. Geschmacksirritation der Versuchstiere zu vermeiden, wurde das CsA in einer Apfelsaft-Wasser-Mischung (Verhältnis 1:4) gelöst und in dieser Form den Tieren angeboten.

2.5) Transplantation der verschiedenen adulten, humanen Stammzellpopulationen in die Cisterna magna

2.5.1) Narkose

Für die Durchführung der stereotaktischen Operation wurden die Tiere narkotisiert. Hierzu wurden den Tieren Xylazin (16mg/kg KG) und Ketamin (100mg/kg KG) mittels einer Kombi-Spritze intraperitoneal (i.p.) injiziert. Zuvor wurde noch Atropin (0,05 mg/kg KG) als Prämedikation subkutan gespritzt.

2.5.2.) Transplantationstechnik

Die Stammzellen wurden den transgenen Tieren an deren 45. Lebenstag mittels stereotaktischer Operation in die Cisterna magna injiziert.
In Narkose (s.o) wurde zunächst die Nackenbehaarung abrasiert und die Haut desinfiziert. Nun musste die Maus in eine „Concorde“-artige Haltung gebracht und mit einer stereotaktische Apparatur (Small Animal Stereotactic Frame, ASI-Instruments) in dieser Position fixiert werden. Um eine bessere Positionierung vornehmen zu können, wurde der hintere Part der stereotaktischen Apparatur soweit erhöht, bis er mit der Tischoberfläche einen Winkel von 30° einnahm. Dann wurde der Kopf der Maus mittels Stützstangen, die in den äußeren Gehörgang eingeführt wurden, fixiert und es wurde eine Stoffrolle unter der Maus in der Körperlängsachse angebracht. Dabei wurde die Größe der Rolle so gewählt, dass die Linie, die vom höchsten Punkt des Schädels entlang der Spinae zog, einen Winkel von 15° mit der Horizontalen bildete (s. Abbildung 8). Nun wurde eine weitere, nasale Stützstange so am Kopf angebracht, dass die Stirnfläche des Schädels mit der Vertikalen einen Winkel von 15° (s. Abbildung 8) und mit der Körperlängsachse einen rechten Winkel einnahm. So wurde die „Concorde“-artige Position eingestellt, in der die Cisterna magna in etwa die höchste Stelle der Maus einnahm.

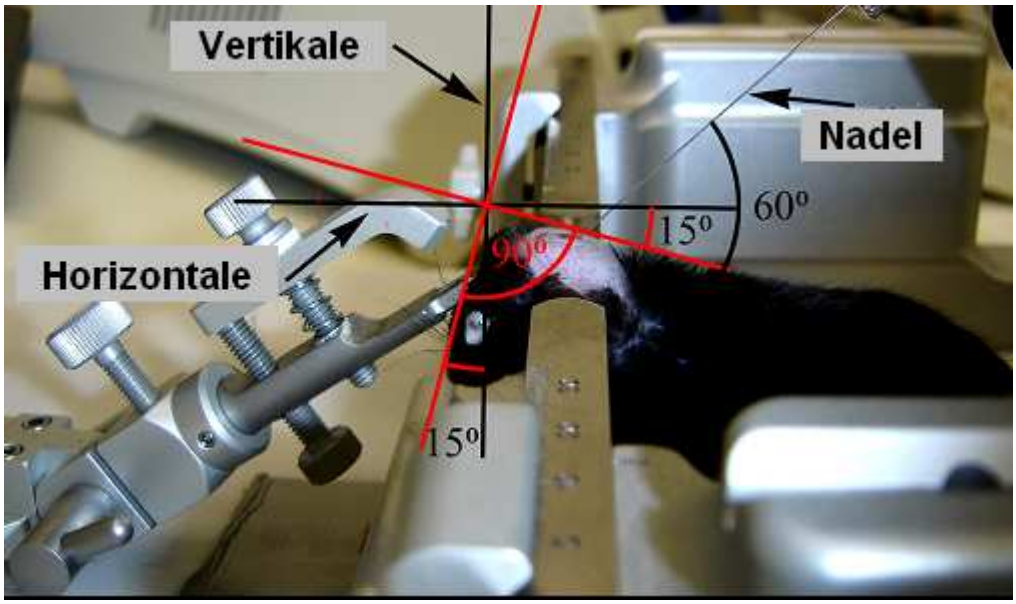


Abbildung 8: „Concorde“-artige Positionierung des Mauskörpers mittels stereotaktischer Apparatur (Fixierpunkte: äußerer Gehörgang und Stirn) unter Narkose während der Cisterna magna-Injektion von Stammzellen nach Punktion der Membrana atlantooccipitale unter Sicht

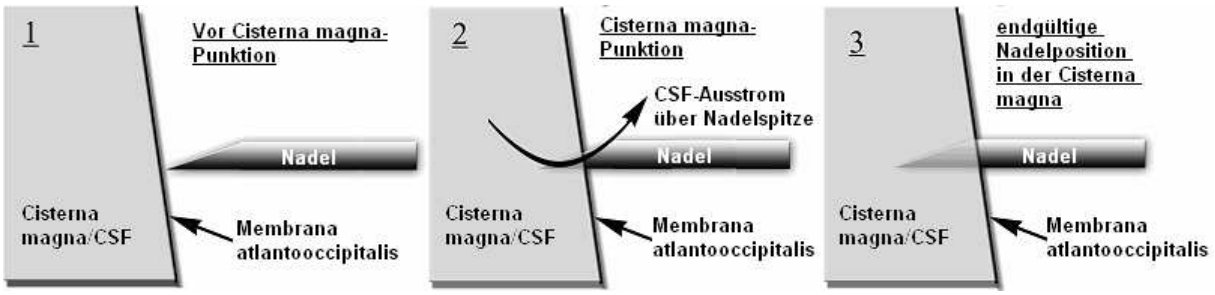
Darauf wurde in der Mittellinie ein Hautschnitt von der Linea nuchalis superior bis auf Höhe des dritten Halswirbels unter dem Operationsmikroskop durchgeführt und die Muskulatur des Nackens stumpf präpariert, so dass die atlanto-okzipitale Membran (Membrana atlantooccipitalis), die sich vom Os occipitale zum Arcus posterior des Atlas erstreckt, zum Vorschein kam.

Als nächster Schritt wurden 10µl einer Zellsuspension, die etwa 10 000 Zellen/µl (hMSC, hMNSC, hUBC oder hUNSC) enthielt, in eine 25 µl Hamilton-Spritze aufgezogen. Dann wurde diese Spritze auf einer Mikropumpe (Micro 4, Controller for the Ultra Microsyringe Pump, World Precision Instruments) angebracht und diese wiederum auf einem Mikromanipulator-Arm der stereotaktischen Apparatur.

Anschließend wurde die Nadel (gauge 30, Schliff pst2; Hamilton) in der Mittellinie der atlanto-okzipitalen Membran so positioniert, dass sie mit der Horizontalen einen Winkel von 45° bildete. Dabei wurde unter dem Operationsmikroskop durch die Membran hindurch sichtbar, dass die horizontale Linie in der Sagittalebene der Maus genau in den Spalt zwischen Medulla und Cerebellum hineinzeigte.

Zur Punktion der Membran waren nun folgende Schritte notwendig: Zuerst erfolgte eine leichte zusätzliche Inklination des Kopfes, wodurch die Membran gespannt gehalten wurde. Dann wurde die Nadelspitze so positioniert, dass sie die atlanto-okzipitale Membran in deren Mitte zwischen Os occipitale und dem hinteren Atlasbogen berührte (Abbildung 9/1). Nun wurde die Membran durch eine rasche Bewegung der Nadel

durchstochen und die Nadel genau dann gestoppt, als die Membran auf der Mitte des Nadelschliffes stand. Dadurch konnte etwas Cerebrospinalflüssigkeit über die Nadelspitze abfließen (Abbildung 9/2). Dies war nötig, um die Zellsuspension ohne wesentliche Steigerung des Hirndruckes injizieren zu können. Jetzt wurde die Nadel soweit in die Cisterna magna vorgeschoben, dass der gesamte Nadelschliff jenseits der Membran verschwand (Abbildung 9/3).



CSF: cerebrospinal fluid / Liquor

Abbildung 9: Vorgehen bei der Punktion der atlanto-okzipitalen Membran

Diese Prozedur konnte genau kontrolliert werden, da die Nadelspitze unter dem Operationsmikroskop auch durch die Membran hindurch sichtbar war. So konnten Verletzungen des Hirnstammes zuverlässig verhindert werden.

Bevor die Zellsuspension über einen Zeitraum von 10 Minuten in die Cisterna magna injiziert wurde, wurde noch ein großer Tropfen PBS (etwa 100 µl) auf das Operationsfeld gegeben (s. Abbildung 10).



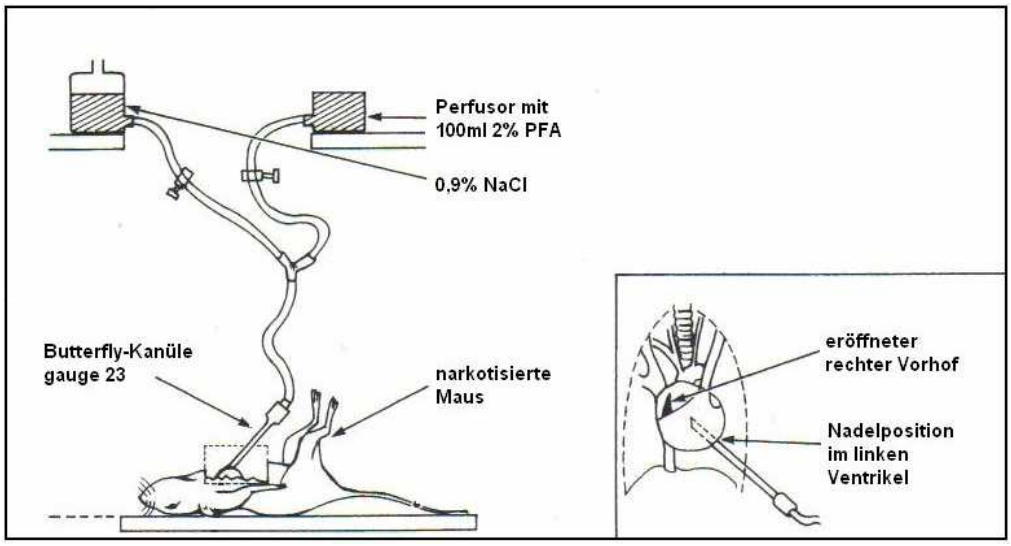
Abbildung 10: Operationsfeld mit großem PBS (phosphate buffered saline) - Tropfen während einer Cisterna magna-Injektion von Stammzellen

Während des anschließenden Injektionsvorgangs war es unerlässlich die Atembewegungen des Tieres zu überprüfen, um im Falle einer Atemabflachung bzw. eines Atemstillstands sofort die Nadel etwas zurückziehen zu können. Nach erfolgter Injektion wurde die Nadel noch für weitere 10 Minuten in der Cisterna magna belassen und erst danach zurückgezogen. Anschließend konnte aus dem PBS-Tropfen eine Probe entnommen werden, um ein eventuelles Ausströmen von Zellen feststellen zu können. Zuletzt wurde die Wunde mit sterilen Einmalhautklammern (Klammern DS-25, Ullrich Medizintechnik) verschlossen.

2.6) Histologie

2.6.1) Perfusion der Tiere

Für die Perfusion erfolgte die Narkotisierung der transgenen Tiere je nach Gewicht und Gesundheitszustand mit 150 – 200 µl Chloralhydrat 25% i.p.. Ein bis drei Minuten nach Injektion wurde wiederholt am Auge der Kornealreflex getestet und zwischen den Zehen wurde ein Schmerzreiz gesetzt, um zu überprüfen, ob die Narkose bereits ausreichend wirkt. War dies der Fall, wurde das Tier in einer Halteapparatur fixiert und das Fell mit 70% Isopropanol befeuchtet. Nun wurde das Fell von Thorax und Abdomen gelöst und der Brustkorb eröffnet. Als Nächstes erfolgte eine Inzision in den rechten Vorhof und es wurde eine Butterfly-Kanüle (gauge 23) in die linke Herzkammer eingeführt.
Um das Blut aus dem -durch die Vorhofinzision eröffneten- Gefäßkreislauf zu entfernen, wurde zunächst mit einer 0,9% igen NaCl-Lösung über die Butterfly-Kanüle vorgespült bis die aus dem rechten Atrium ausströmende Flüssigkeit klar war. Darauf folgte die Perfusion mit 100 ml 2% PFA ebenfalls über die Butterfly-Kanüle mittels eines Perfusors, der einen konstanten Fluss von 200 ml/h gewährleistet. Zur Nachfixierung wurde die transkardial perfundierte Maus zur Gänze mit 2% PFA bedeckt und über Nacht bei 4°C gelagert.



PFA: Paraformaldehyd; NaCl: Kochsalzlösung

Abbildung 11: Schaubild zur Fixierung einer Maus mittels transkardialer Perfusion. Nach Kanülierung der linken Herzkammer und Eröffnung des rechten Vorhofes wird das Tier zunächst mit Kochsalz-Lösung und anschließend mit Paraformaldehyd perfundiert, um das Tier so zu fixieren.

2.6.2) „Dura-Präp“: Präparation des Maus-ZNS in toto unter Erhalt der Dura mater

Im Anschluss an die benötigte Nachfixatation erfolgte die sog. „Dura-Präp“. Bei dieser Art der Präparation wird das gesamte ZNS unter mikroskopischer Sicht in toto entfernt, wobei entscheidend ist, dass die Dura mater unversehrt bleibt. Dieses Vorgehen war notwendig, da die Stammzellen in den Subarachnoidalraum mittels Cisterna magna-Injektion transplantiert worden waren. Wäre die Dura mater entfernt worden, wäre der Subarachnoidalraum eröffnet worden und dadurch wären vermutlich viele transplantierte Zellen, die sich im äußeren Liquorraum befanden, verloren gegangen.

Da ein solches Verfahren auch nach intensiver Literaturrecherche nicht ausfindig gemacht werden konnte, folgt nun eine exakte Beschreibung:
Als erster Schritt wurden die Beine und der Schwanz rumpfnah mit einer Schere durchtrennt, um anschließend die Haut am gesamten Körper und Kopf des Tieres zu entfernen. Dann wurden mit einer chirurgischen Pinzette sämtliche inneren Organe entnommen und die Schultergelenke sowie die Iliosakralgelenke exartikuliert.

Am Kopf wurden nun die Muskulatur und sonstige Strukturen wie Trachea oder die Speicheldrüsen gelöst bis nur noch der Schädel sichtbar war. Darauf wurde der Unterkieferknochen beidseits mit einer Schere durchtrennt und anschließend das Kiefergelenk exartikuliert.

Als nächster Schritt wurden die Rippen durch zwei parallel zur Wirbelsäule durchgeführte Scherenschnitte durchtrennt. Dann wurde begonnen, die paravertebrale Muskulatur entlang der gesamten Wirbelsäule mit einer Schere makroskopisch und mit einer feinen Pinzette (Stärke 5) unter mikroskopischer Sicht zu entfernen.

Da das Rückenmark bei Mäusen und Ratten etwa auf Höhe des vierten Lendenwirbels endet **[71]**, wurde der Bereich der oberen Lendenwirbelsäule gewählt, um den Wirbelkanal primär zu eröffnen und das Rückenmark freizulegen. Dazu wurden die Bänder zwischen den Dorn- und Querfortsätzen zweier Lendenwirbelkörper unter mikroskopischer Sicht mithilfe einer Pinzette durchtrennt. Dann wurde der Dornfortsatz des oberen der beiden Wirbelkörper mit der Pinzette abgebrochen, worauf das Rückenmark mit seiner weißlich glänzenden Dura mater zum Vorschein kam. Jetzt wurden noch die beiden Querfortsätze weggebrochen, so dass das Rückenmark auf Höhe dieses Wirbelkörpers weitgehend freilag (s. Abbildung 12a).

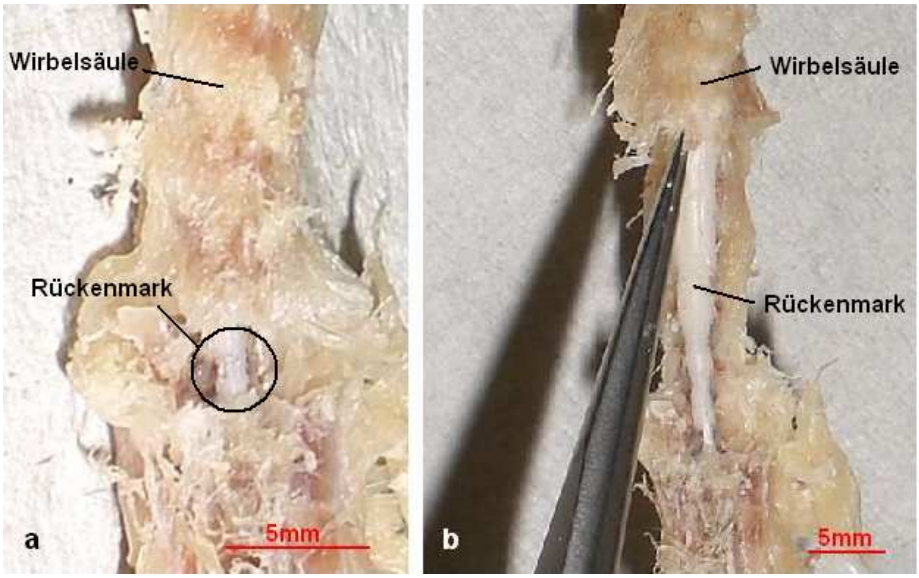


Abbildung 12 (a) & (b): Eröffnung des Spinalkanals und Freilegung des Rückenmarks

Darauf wurden mit dieser Technik sowohl in kranialer wie auch in kaudaler Richtung jeweils die Dorn- und Querfortsätze entfernt, aber die Wirbelkörper blieben als Schienung des Rückenmarks bestehen, um bei der späteren Präparation des Gehirns eine Verletzung des Rückenmarks durch Flexions- und Rotationsbewegungen zu verhindern.

Auf diese Weise konnten schließlich am kaudalen Ende des Rückenmarks die Cauda equina und nach Eröffnung der Sakralkanals auch das Filum terminale dargestellt werden. Am kranialen Ende des Rückenmarks kam hingegen nach der Entfernung des hinteren Wirbelbogens des Atlas die Membrana atlantooccipitalis mit der darunter liegenden Cisterna magna zum Vorschein.

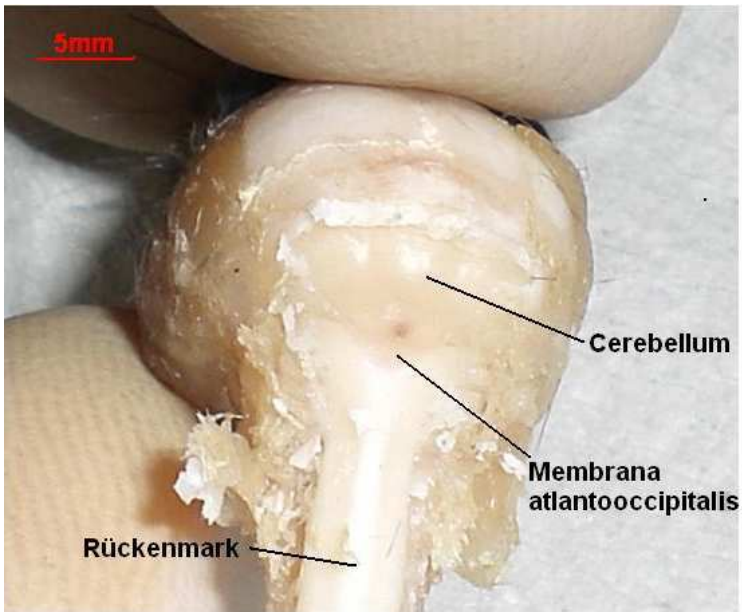


Abbildung 13: Intakte Membrana atlantooccipitalis nach Präparation

Jetzt wurden von kaudal das Os occipitale und das Os interparietale entfernt, indem sie in kleine Stücke gebrochen und darauf gelöst wurden. Dies war unter großer Vorsicht durchzuführen, da hierbei leicht die Membrana atlantooccipitalis zerreissen kann.

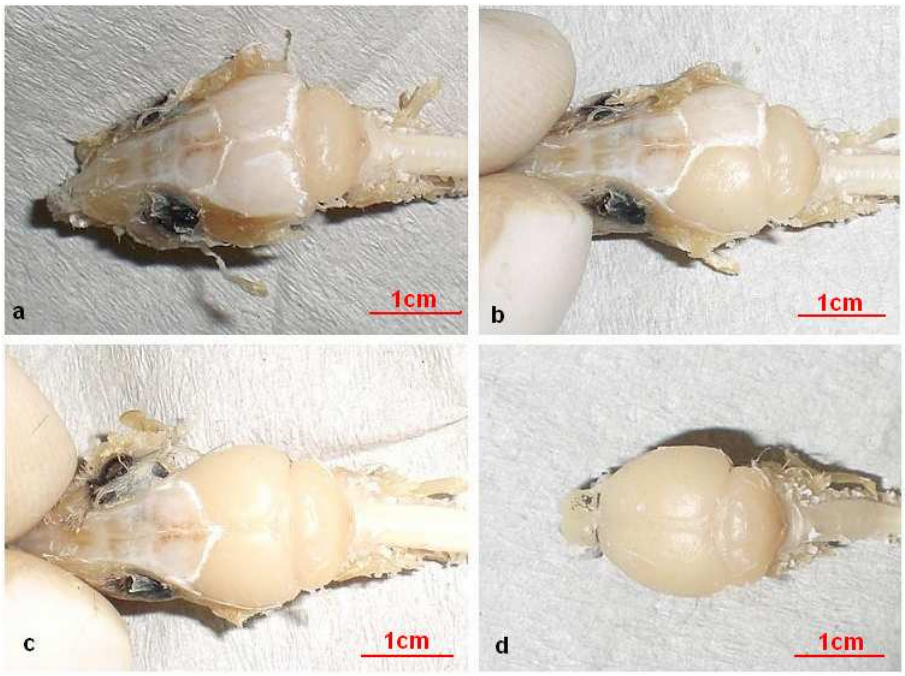


Abbildung 14 (a-d): Präparation des Schädeldaches

Um für die weitere Präparation eine gute Handhabung und Stabilität zu gewährleisten, wurde nun zunächst an der Schädelbasis weiter präpariert. Zuerst wurden die beiden Bullae tympanicae entfernt ebenso wie die Pars basalis des Os occipitale. Dann wurden die weiter nasal liegenden Knochen der Schädelbasis von kaudal her entfernt, wobei die Schwierigkeit darin bestand, die austretenden Hirnnerven und die hier fest an den Knochen gebundene Dura mater nicht zu verletzen.

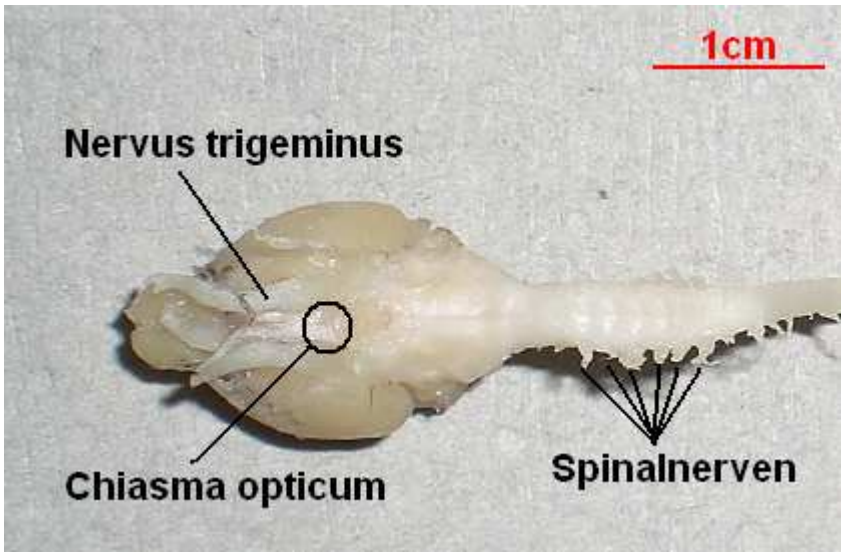


Abbildung 15: Basalansicht des präparierten Mausgehirns mit Verlauf von Hirnnerven und Darstellung der Spinalnervenabgänge

Als schließlich die gesamte Hirnbasis mitsamt ihren Hirnnerven freigelegt worden war, wurden die seitlich liegenden Knochenanteile des Schädels wie die Pars squamosa des Os temporale und die Knochen des Schädeldaches Os parietale und Os frontale entfernt. Wichtig hierbei war, dass keine Hebelbewegungen durchgeführt wurden, da sich sonst Knochenanteile leicht in das Hirngewebe bohren konnten.

Als letzte Schritte der Hirnpräparation wurden nun noch die Bulbi olfactorii freigelegt und die Nervi optici dargestellt. Dazu wurden die noch vorhandenen Ossa nasalia und die Maxilla, die bei der Gehirnpräparation als „Griffstelle“ für die Finger gedient hatten, entfernt.

Daraufhin wurden noch die Wirbelkörper entlang des Rückenmarks entfernt. Hierbei ist es möglich die Spinalnervenabgänge zu erhalten, was eine genaue Bestimmung der Schnitthöhe bei Rückenmarkuntersuchungen möglich machen kann.

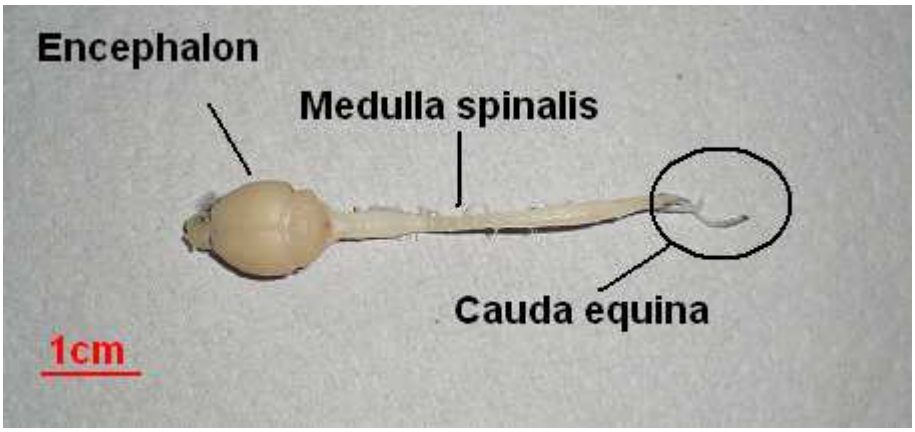


Abbildung 16: Zentrales Nervensystem (ZNS) der Maus von dorsal nach erfolgter „Dura-Präp“

Nachdem jetzt das ZNS in toto entfernt worden war, wurde es in 30% Sucrose/PBS überführt und für 2 Tage bei 4°C darin belassen, damit das interstitielle Wasser vollständig durch die Lösung verdrängt werden konnte.
Dann wurde das ZNS in 2-Methyl-Butan (Isopentan) bei -50 °C für 2 Minuten gefroren und für mindestens eine Nacht bei -80°C gelagert.

2.6.3) Schnitte

Als erster Schritt wurde das ZNS in zwei Teile getrennt. Die Schnittlinie verlief hierbei am Übergang des zervikalen zum thorakalen Abschnitt des Rückenmarks. Das kaudale Stück wurde zur Erfassung des Motoneuronverlustes im thorakalen und lumbalen Rückenmark im Rahmen einer weiteren Dissertation verwendet. Das Gehirn mit dem zervikalen Rückenmark wurde in M-1 EMBEDDING MATRIX auf Trockeneis eingebettet und bei -80°C mitsamt des sog. „Stempels“ des Cryostats über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurde das eingebettete Gewebe etwa zwei Stunden vor der Anfertigung der Schnitte in den Mikrotom-Kryostat gebracht, was einer Temperaturangleichung zwischen Gewebe und Kryostat diente. Dies war notwendig, um anschließend Schnitte mit möglichst geringen Artefakten anfertigen zu können. Das eingebettete Gewebe wurde dann bei -20°C mit dem Mikrotom-Kryostat in der Frontalebene von rostral her geschnitten. Die dabei entstandenen Coronal-Schnitte von 12µm Dicke wurden direkt auf Objektträger gezogen. Die beladenen Objektträger wurden dann bis zu ihrem Gebrauch bei -80°C gelagert.

Insgesamt wurde jeder dritte Schnitt auf einen Objektträger gezogen, aber von diesen wurde wiederum nur jeder fünfte Schnitt zur Bestimmung der Zellzahlen herangezogen. Dies bedeutet, dass von jedem ZNS-Abschnitt genügend Reserveschnitte vorhanden waren und dass letzlich nur auf einem von 15 Schnitten die Zellzahl ermittelt wurde. Dennoch wurden pro Maus etwa 100 Schnitte ausgewertet.

2.6.4) Immunhistologie

Um die Zellverteilung der transplantierten Zellen 65 Tage nach ihrer Transplantation ermitteln zu können, haben wir ein indirektes immunhistochemisches Nachweisverfahren gewählt, das auf einer Fluoreszenzmarkierung basiert.
Dabei bindet der Primärantikörper auf den Gewebeschnitten an das gesuchte Antigen. Um den dadurch entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex nachzuweisen, wird ein Sekundärantikörper eingesetzt, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist. Durch Licht spezifischer Wellenlänge wird dieser Fluoreszenzfarbstoff im Fluoreszenzmikroskop angeregt, selbst Licht einer anderen Wellenlänge zu emittieren. Dadurch wird dann der Antigen-Antikörper-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht.
Bei der indirekten Immunhistochemie lassen sich auch in einer Doppelfärbung zwei unterschiedliche Antigene gleichzeitig nachweisen. Allerdings müssen die Primärantikörper aus Seren verschiedener Tierarten, z.B. aus Mausserum (ms-Tub) und Kaninchenserum (rbt-GFAP), hergestellt worden sein und die jeweiligen Sekundärantikörper müssen sich in ihrer Fluoreszenzmarkierung und Artspezifität (z.B. Alexa-488 Anti-Mouse und Alexa-568 Anti-Rabbit) unterscheiden.

Färbeprotokoll für indirekte Immunhistologie

Die Gefrierschnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und für 15 Minuten mit PBS bewässert. Darauf wurden die Schnitte für 1,5 Stunden mit der Blocklösung (s.u) bedeckt, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern.
Als nächster Schritt wurden die Schnitte dreimal kurz mit PBS gespült und in einer feuchten Kammer bei 4°C mit dem Primärantikörper (s.u.) über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen, bevor sie für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper in PBS bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert wurden.
Die Schnitte wurden dann erneut dreimalig für fünf Minuten mit PBS gewaschen, bevor sie abschließend mit Mounting Medium, das DAPI enthielt (1:1), und einem Deckglas bedeckt wurden. Bei Schnitten von Tieren, denen HOECHST 33342-markierte Zellen transplantiert wurden, wurde auf DAPI verzichtet, da dies zu einer Überdeckung der HOECHST 33342-Markierung in der Fluoreszenzmikroskopie geführt hätte.

Blocklösung

- 3% Goat-Serum
- 1% BSA
- 0,1% cold fish skin gelatine
- 0,1% Triton X-100
- 0,05% Tween 20
- 1x PBS

Primärantikörper-Lösung

- 1% BSA
- 0,1% cold fish skin gelatine
- 1x PBS

Primärantikörper

Mouse Anti-Human Nuclei (HuNu), monoclonal antibody	Verdünnung 1:20
Rabbit Anti-Neuronal Class III ß-Tubulin Polyclonal Antibody	Verdünnung 1:200

Sekundärantikörper

Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Verdünnung 1:500
Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit IgG	Verdünnung 1:500

2.7) Methodik der Auswertung

Wie oben beschrieben sollte auf jedem 15. Schnitt die Zellzahl ermittelt werden. Dabei konnten die Zellzahlen bei den Tieren, die zehn Tage nach der Transplantation getötet wurden, durch die erfolgte Hoechst 33342-Markierung der transplantierten Zellen direkt ermittelt werden. Bei jenen Tieren, die 65 Tage nach der Transplantation histologisch untersucht wurden, musste jedoch aufgrund der fehlenden Zellmarkierung zunächst die Detektion der transplantierten Zellen mittels anti-human nuclear antigen-Antikörper (s. Kapitel 2.6.) durchgeführt werden, um dann die Zellzahl bestimmen zu können.

Um einem ZNS-Abschnitt (wie z.B. der Pons) oder einem Liquorbereich (wie z.B. der Cisterna magna) die jeweilige Zellzahl zuordnen zu können, war Folgendes notwendig:

Erstens erfolgte mithilfe eines Mausatlanten **[148]** eine exakte Zuordnung der histologischen Schnitte zum jeweiligen ZNS- bzw. Liquorabschnitt.

Zweitens wurde auf den Schnitten jeweils die Anzahl der transplantierten Zellen erfasst. Angesichts der Tatsache, dass nur jeder 15. Schnitt ausgezählt wurde und dass bei einer Schnittdicke von 12µm von nur einer Zellschicht auszugehen ist, konnte die ermittelte Zellzahl mit dem Faktor 15 multipliziert werden. Durch diese Hochrechnung –wie sie schon früher angewandt wurde **[144]** – wurde in etwa die jeweilige Gesamtzahl der Zellen pro ZNS- bzw. Liquorabschnitt erhalten.

Allerdings wird durch eine solche Hochrechnung natürlich keine exakte Zellzahl, sondern nur eine grobe Näherung des jeweiligen Wertes erzielt. Aus diesem Grund wurden die ermittelten Werte zehn festgelegten Zahlenbereichen zugeordnet (s. Tabelle 2). Da bei 100000 transplantierten Zellen eine hohe Streuweite der Werte möglich ist, wurde die Festlegung dieser Zahlenbereiche nicht linear, sondern annähernd exponentiell gewählt.

In einem Beispiel ausgedrückt bedeutet dies: Wenn in einem ZNS-Areal 100 Zellen gefunden wurden, wurde dieser Wert mit dem Faktor 15 multipliziert. Man erhält damit eine Gesamtanzahl transplantierte Zellen in diesem ZNS-Areal von 1500 Zellen. Da es sich bei diesem Wert aber nur um eine Hochrechnung handelt, wurde nun dieser Wert (1500 Zellen) noch dem Zellzahlbereich „1000 bis 2000 Zellen“ (s. Tabelle 2) zugeordnet und so in den Diagrammen dargestellt.

Tabelle 2: Einteilung der Zahlenbereiche und die Zuordnung der ermittelten Zellzahlen zum jeweiligen Zahlenbereich

Die Angabe der gefundenen Zellzahlen in einem jeweiligen Hirnabschnitt erfolgt mittels Zuordnung zu den unten genannten Zahlenbereichen. Dies geschieht, da es sich bei den ermittelten Werten um eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur jeder 15. histologische Schnitt ausgewertet wurde) handelt und sonst eine Genauigkeit der Werte vorgetäuscht würde, die so nicht vorläge.

ZNS: zentrales Nervensystem

Zahlen-bereich: Nummer	**Zugeordnete Zellzahlen**	**Beispiele:**	**In einem ZNS-Areal gezählte Zellzahl**	**Zur gezählten Zellzahl zugehörende Hochrechnung (Faktor 15)**
0	0		0	0
I	1-20		1	15
II	20-100		4	60
III	100-200		12	180
IV	200-1.000		44	660
V	1.000-2.000		110	1650
VI	2.000-10.000		320	4800
VII	10.000-20.000		920	13800
VIII	20.000-50.000		1840	27600
IX	50.000-100.000		4850	72750

3.) Ergebnisse

Alle abgebildeten mikroskopischen Bilder in diesem Ergebnisteil wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135 von Zeiss in 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.1.) Verteilung der vier verschiedenen Stammzellpopulationen MSC, MNSC, UBC und UNSC im ZNS-Gewebe und den Liquorräumen zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion von 100 000 Zellen

Zehn Tage nach der Cisterna magna-Injektion der verschiedenen Stammzellpopulationen wurden zur Erfassung der Stammzellverteilung zu diesem Zeitpunkt jeweils drei Tiere der vier verschiedenen Transplantationsgruppen MSC, MNSC, UBC und UNSC untersucht.
Dabei erfolgt hier die Auswertung der Zellverteilung nach den verschiedenen ZNS-Abschnitten bzw. nach den verschiedenen Liquorräumen geordnet.
Die für die einzelnen Versuchstiere verwendeten Bezeichnungen richten sich dabei nach der jeweils transplantierten Stammzellpopulation und die drei Tiere pro Transplantationsgruppe wurden noch nach zeitlicher Reihenfolge der Stammzelltransplantation bzw. der histologischen Untersuchung durchnummeriert. So handelt es sich beim Versuchstier „MNSC 2“ um das Tier, dem zehn Tage zuvor hMNSC in die Cisterna magna transplantiert worden sind und das als zweites Tier der MNSC-Transplantationgruppe ausgewertet wurde.
Zu beachten ist, dass die Anzahl der transplantierten, HOECHST 33342-markierten Zellen, die auf den mikroskopischen Bildern als „blaue Punkte“ zu sehen sind, gering erscheint, gegenüber den Zellzahlangaben, die in den Diagrammen angegeben werden. Dies liegt daran, dass nur jeder 15. Schnitt ausgewertet wurde. Verstärkt wird dieser Effekt dadurch, dass wegen der benötigten Vergrößerung zum Teil nur Ausschnitte der jeweiligen Hirnstruktur abgebildet werden können.

3.1.1.) Verteilung im inneren Liquorraum

Seitenventrikel & Foramina interventricularia

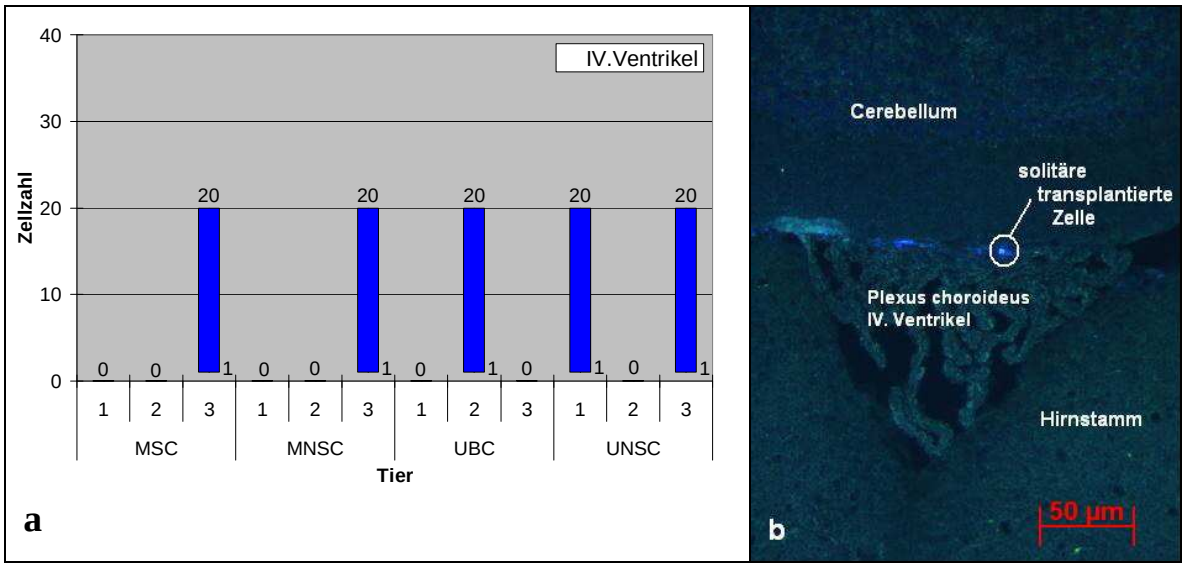
Unabhängig von der transplantierten Stammzellpopulation (hMSC, hMNSC, hUBC oder hUNSC) konnten in keinem der 12 untersuchten Tiere weder im I.Ventrikel (linker Seitenventrikel) noch im II.Ventrikel (rechter Seitenventrikel) Zellen nachgewiesen werden. Dasselbe gilt für die beiden Foramina interventricularia, die die Seitenventrikel mit dem III.Ventrikel verbinden (s. Tabelle 3).

III.Ventrikel & Aquaeductus cerebri

Es konnten in keinem der 12 Versuchstiere Zellen im III.Ventrikel oder in einem seiner Recessus (Rececessus opticus, Recessus infundibularis, Recessus mammilaris, Recessus habenularis, Recessus pinealis) gefunden werden.
Dieses Ergebnis zeigte sich auch im Aquaeductus cerebri, der den III.Ventrikel mit dem IV.Ventrikel verbindet (s. Tabelle 3).

IV.Ventrikel

In den Transplantationsgruppen MSC, MNSC und UBC konnten jeweils in einem der drei Tiere pro Transplantationsgruppe Zellen im IV.Ventrikel nachgewiesen werden. Dasselbe gelang in der Transplantationsgruppe UNSC in zwei von drei Tieren. Die Anzahl der gefundenen Zellen war aber jeweils sehr gering (s. Abbildung 17 / Tabelle 3)



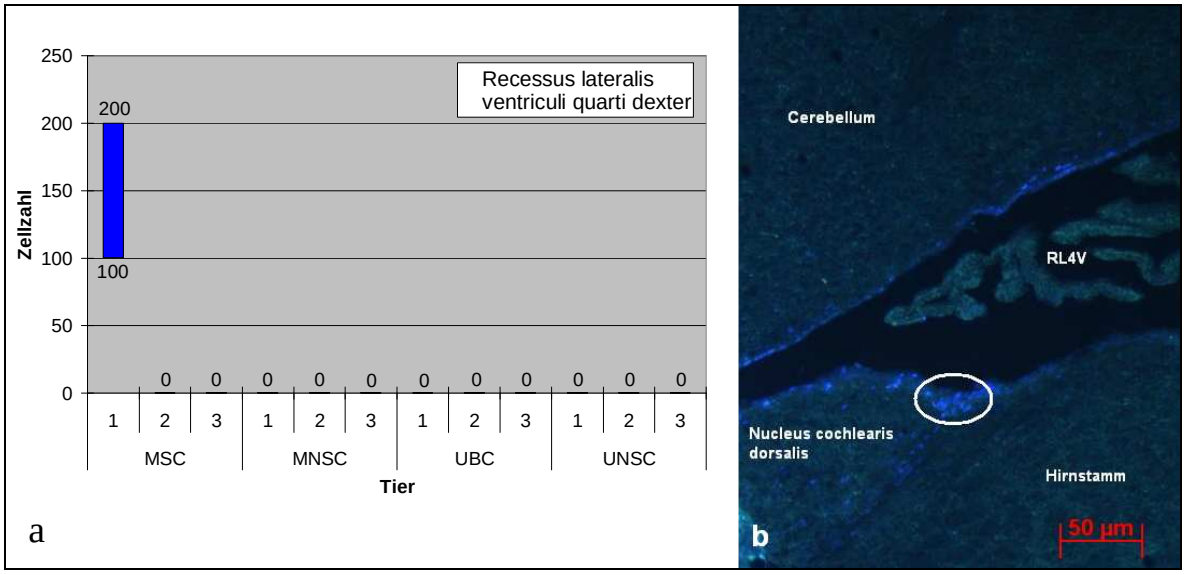
MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 17: (a) Anzahl transplantierter Zellen im IV.Ventrikel [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) IV.Ventrikel mit solitärer, HOECHST 33342-markierter hUNSC (humane proneural-konvertierte Nabelschnurblutzelle)

Recessus laterales ventriculi quarti (RL4V)

In diesem Abschnitt des inneren Liquorraums zeigt sich ein inhomogenes Verteilungsmuster, sowohl im Vergleich des rechten mit dem linken RL4V als auch unter den einzelnen Transplantationsgruppen.

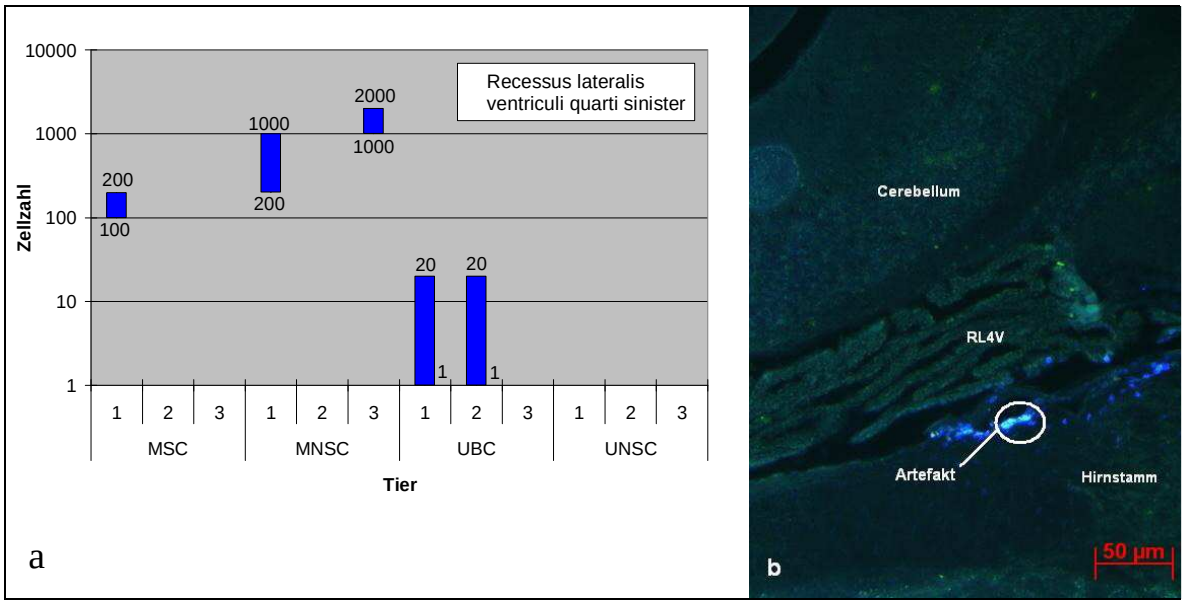
Im rechten RL4V wurden nur bei einem Tier der MSC-Transplantationsgruppe Zellen nachgewiesen. In den restlichen elf Tieren wurden hier keine Zellen entdeckt (s. Abbildung 18 / Tabelle 3).



MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.
RL4V: Recessus laterlis ventriculi quarti

Abbildung 18: (a) Anzahl transplantierter Zellen im Recessus lateralis ventriculi quarti dexter (RL4V re) [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Recessus lateralis ventriculi quarti dexter (RL4V re) mit HOECHST 33342-markierten hMSC (human mesenchymal stem cells)

Im linken RL4V wurden in den drei Tieren der UBC-Transplantationsgruppe keinerlei Zellen nachgewiesen. Bei der UNSC-Transplantationgruppe konnten in zwei von drei Versuchstieren eine sehr geringe Anzahl von Zellen entdeckt werden. Dafür waren in der MSC-Transplantationsgruppe in einer von drei Mäusen 100 bis 200 Zellen vorhanden, was in der MNSC-Transplantationsgruppe übertroffen wurde, indem in zwei von drei Tieren eine noch höhere Zellzahl entdeckt wurde (s. Abbildung 19 / Tabelle 3).



MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.
RL4V: Recessus laterlis ventriculi quarti

Abbildung 19: (a) Anzahl transplantierter Zellen im Recessus lateralis ventriculi quarti sinister (RL4V li) [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Recessus lateralis ventriculi quarti sinister mit HOECHST 33342-markierten humanen proneural-konvertierten Knochenmarkstromazellen

Canalis centralis (zervikales Rückenmark)

Es wurden in keinem Versuchstier der vier Transplantationsgruppen Zellen im zervikalen Abschnitt des Canalis centralis gefunden (s. Tabelle 3)

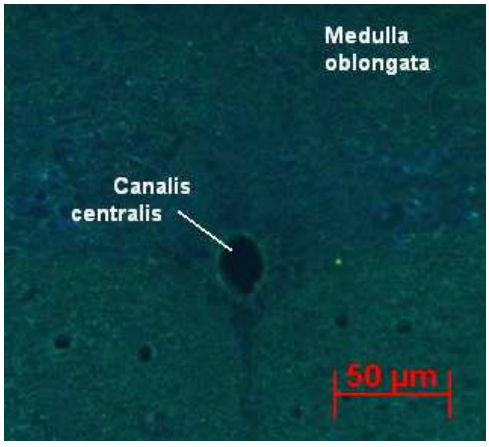


Abbildung 20: Canalis centralis, der keine transplantierten Zellen enthält

Tabelle 3: Verteilung der vier verschiedenen Stammzellpopulationen hMSC, hMNSC, hUBC und hUNSC im inneren Liquorraum zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion von 100 000 Zellen

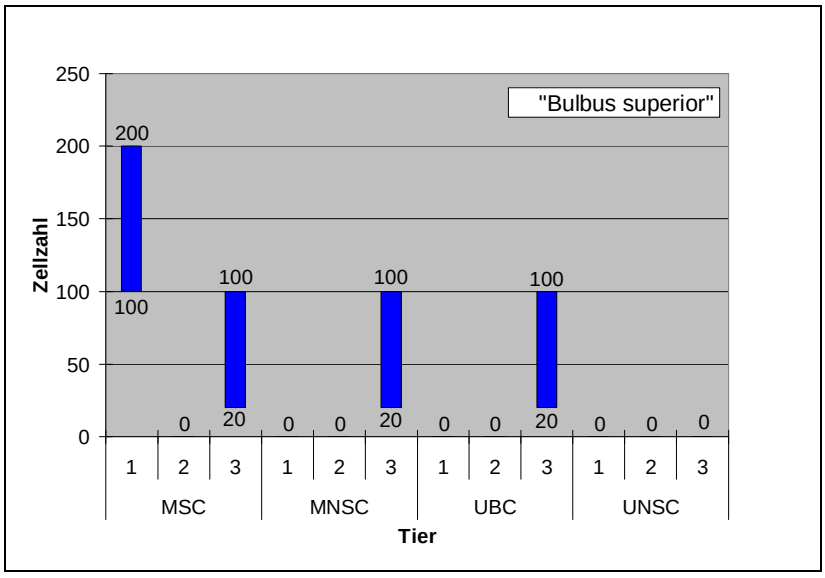
MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.
1.Spalte: Liquorraum; 2.Spalte: Transplantationsgruppe; 3.-10.Spalte: Zellzahl

		0	<20	<100	<200	<1000	<2000	<10000	<20000
I. Ventrikel	MSC	1 2 3							
	MNSC	1 2 3							
	UBC	1 2 3							
	UNSC	1 2 3							
II. Ventrikel	MSC	1 2 3							
	MNSC	1 2 3							
	UBC	1 2 3							
	UNSC	1 2 3							
Foramina interventricularia	MSC	1 2 3							
	MNSC	1 2 3							
	UBC	1 2 3							
	UNSC	1 2 3							
III. Ventrikel	MSC	1 2 3							
	MNSC	1 2 3							
	UBC	1 2 3							
	UNSC	1 2 3							
Aquaeductus cerebri	MSC	1 2 3							
	MNSC	1 2 3							
	UBC	1 2 3							
	UNSC	1 2 3							
Recessus colliculi posterioris	MSC	1 2 3							
	MNSC	1 2 3							
	UBC	1 2 3							
	UNSC	1 2 3							
IV.Ventrikel	MSC	1 2	3						
	MNSC	1 2	3						
	UBC	1 3	2						
	UNSC	2	1 3						
Recessus laterlis ventriculi quarti sinister	MSC	2 3			1				
	MNSC	2				1	3		
	UBC	3	1 2						
	UNSC	1 2 3							
Recessus laterlis ventriculi quarti dexter	MSC	2 3			1				
	MNSC	1 2 3							
	UBC	1 2 3							
	UNSC	1 2 3							
Canalis centralis	MSC	1 2 3							
	MNSC	1 2 3							
	UBC	1 2 3							
	UNSC	1 2 3							
		0	<20	<100	<200	<1000	<2000	<10000	<20000

3.1.2.) Verteilung im äußeren Liquorraum

„Bulbus superior“

„Bulbus superior“ ist die von uns gewählte Beschreibung für die Region, in der die Fissura longitudinalis cerebri in die superiore Konvexität der Bulbi olfactorii übergeht.
Hier konnten in der UNSC-Transplantationsgruppe keine Zellen, jedoch in den Transplantationsgruppen UBC und MNSC jeweils bei einem der drei Versuchstiere bis zu 100 Zellen nachgewiesen werden. Die meisten Zellen in dieser Region konnten letzlich in der MSC-Transplantationsgruppe gefunden werden. So wurden hier in zwei von drei Tieren Zellen entdeckt (s. Abbildung 21 / Tabelle 4A).



MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 21: Anzahl transplantierter Zellen im Bereich „Bulbus superior“[Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]

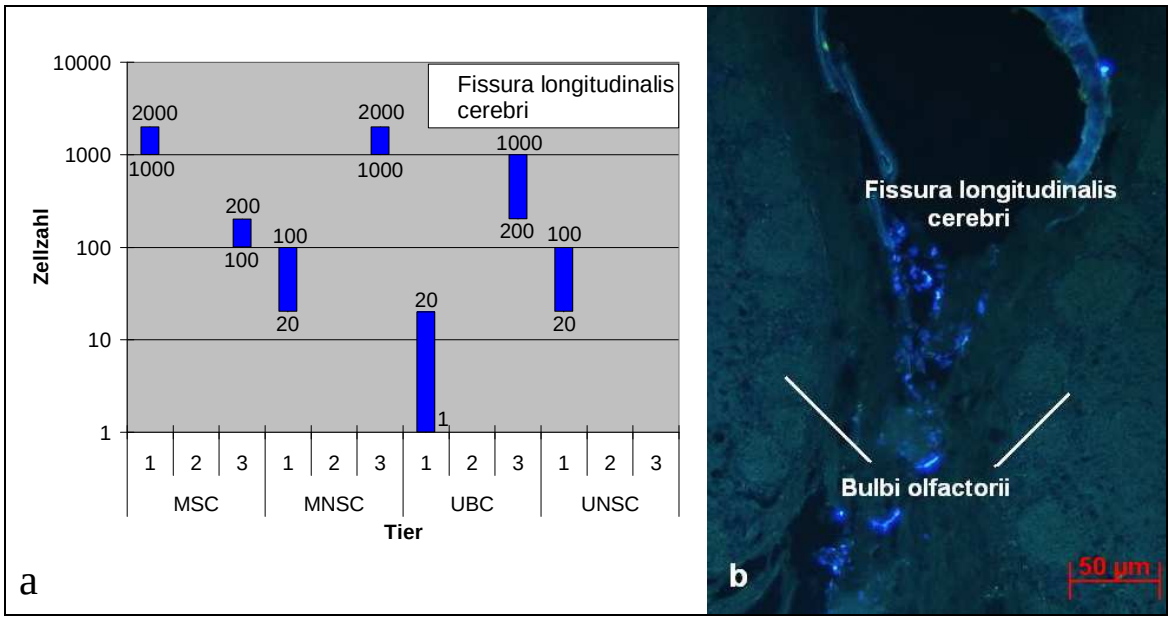
Leider musste an dieser Stelle auf die Abbildung einer mikroskopischen Aufnahme mit adäquater Bildqualität und transplantierter Zellzahl verzichtet werden, da im Bereich dieses Liquorabschnittes im Tier „MSC1“, das hier die meisten Zellen enthielt, erhebliche Schnittartefakte aufgetreten waren.

Fissura longitudinalis cerebri

Die Fissura longitudinalis cerebri trennt die beiden Großhirnhemisphären und bei der Maus auch die beiden Bulbi olfactorii voneinander.

Hier konnten in allen vier Transplantationsgruppen Zellen nachgewiesen werden, allerdings fast ausschließlich zwischen den beiden Bulbi.

So fand sich in der UNSC-Transplantationsgruppe in einer der drei Mäuse eine Zellzahl von 100 bis 200 Zellen. In den Transplantationsgruppen MSC, MNSC und UBC konnten jeweils Zellen in zwei der drei Tiere entdeckt werden. Außerdem waren die Zellzahlen nicht unerheblich. So konnten in einem Tier bis zu 1000 hUBC und in anderen sogar bis zu 2000 hMSC bzw. hMNSC nachgewiesen werden (s. Abbildung 22 / Tabelle 4A).



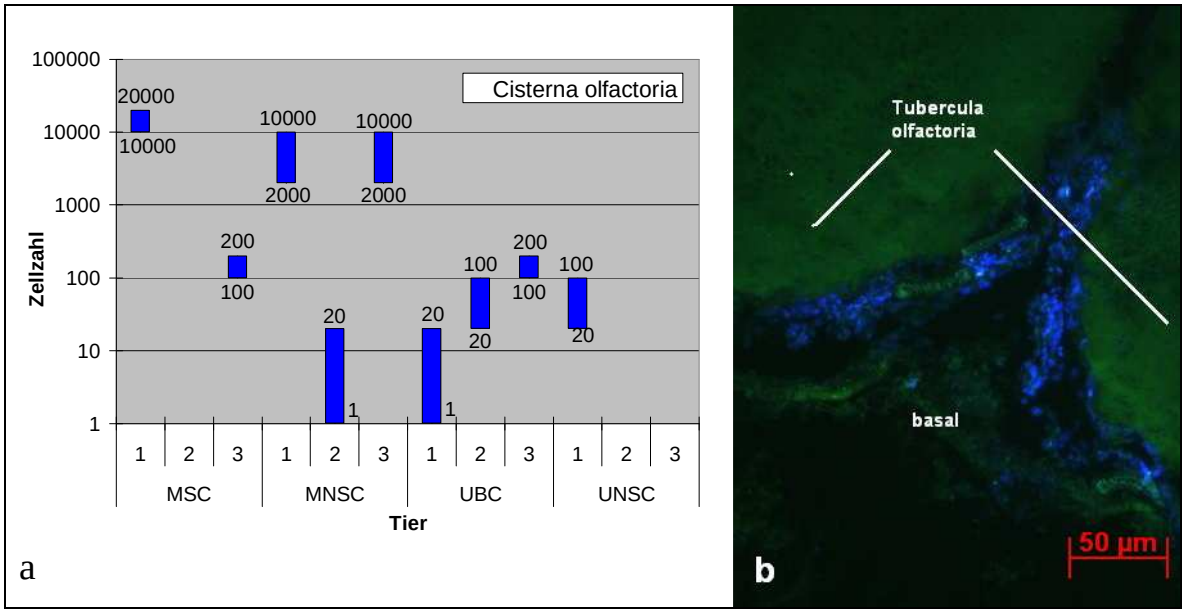
MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 22: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Fissura longitudinalis cerebri [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Fissura longitudinalis cerebri mit Hoechst 33342-markierten, transplantierten hUBC (human umbilical cord blood cells)

Cisterna olfactoria

Die Cisterna olfactoria gehört zu den basalen Zisternen des Subarachnoidalraums und reicht basal des Gehirns von den Bulbi olfactorii bis zum Chiasma opticum.

In der UNSC-Transplantationsgruppe wurde hier nur in einem von drei Versuchstieren eine geringe Zellzahl gefunden. Dafür wurden in der UBC-Transplantationsgruppe in allen drei Tieren Zellen nachgewiesen, wobei in keinem Tier mehr als 200 Zellen erfasst wurden. In der MNSC-Transplantationsgruppe konnten ebenfalls in allen drei Versuchstieren Zellen entdeckt werden, aber die Zellzahlen differieren hier stark. So wurde in einer Maus nur eine sehr geringe Anzahl hMNSC gefunden und in den anderen beiden jeweils eine enorme Zellzahl von mehreren Tausend Zellen. In der MSC-Transplantationsgruppe wurden hier in einem Tier sogar über 10 000 Zellen entdeckt, in einem zweiten nur 100 bis 200 Zellen und in der dritten wurden keinerlei Zellen gefunden (s. Abbildung 23 / Tabelle 4A).

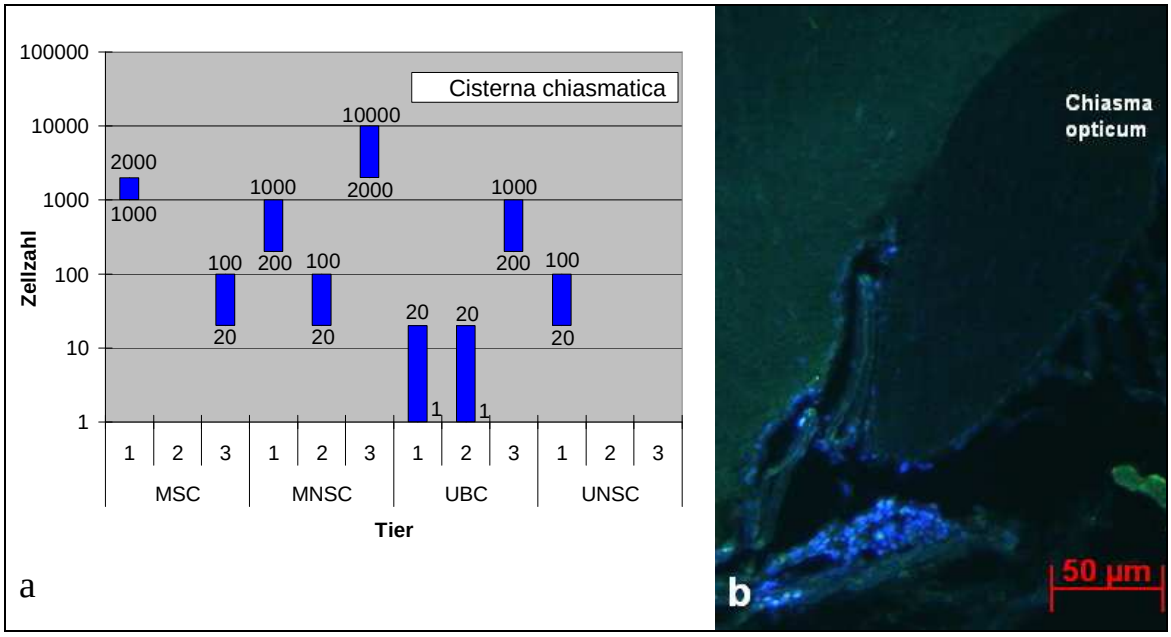


MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 23: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna olfactoria [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Cisterna olfactoria mit Cluster transplantierter, Hoechst 33342-markierter hMSC (human mesenchymal stem cells)

Cisterna chiasmatica

In der Cisterna chiasmatica, die das Chiasma opticum umgibt, wurden in den Transplantationsgruppen MNSC und UBC in jeweils allen drei Versuchstieren Zellen nachgewiesen. In zwei Tieren wurden nur sehr wenige hUBC gefunden und im dritten Tier zwischen 200 und 1000 Zellen, wohingegen die Anzahl nachgewiesener Zellen in der MNSC-Transplantationsgruppe wesentlich größer war; so wurden in einem Tier sogar mehrere Tausend Zellen gefunden. In der UNSC-Transplantationsgruppe konnten nur in einem der drei Tiere Zellen erfasst werden und dies auch nur in einer geringen Anzahl. Dafür fanden sich in zwei von drei Tieren der MSC-Behandlungsgruppe Zellen, wobei nur in einem Tier eine höhere Zellzahl von bis zu 2000 Zellen gefunden wurde.
(s. Abbildung 24 / Tabelle 4A).

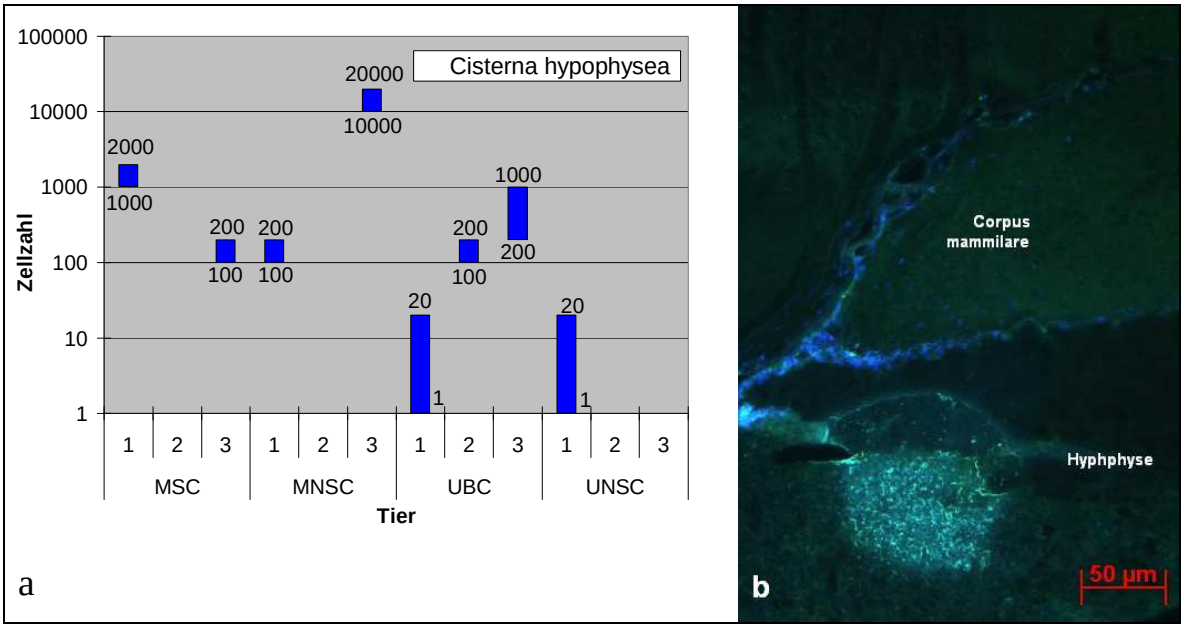


MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 24: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna chiasmatica [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Chiasma opticum mit Cluster transplantierter, Hoechst 33342-markierter hMNSC (humane proneural-konvertierte Knochenmark-stromazelle)

Cisterna hypophysea

In der Cisterna hypophysea, die sich zwischen Diaphragma sellae und Hypophyse befindet, wurden in der UBC-Transplantationsgruppe in allen drei Tieren Zellen nachgewiesen, wobei in keinem der Tiere die Zellzahl größer als 1000 war. In der UNSC-Transplantationsgruppe wurde nur in einem Versuchstier eine sehr geringe Zellzahl und in den anderen beiden Tieren wurden keinerlei Zellen gefunden. In den beiden Transplantationsgruppen MSC und MNSC konnten jeweils in zwei von drei Versuchstieren Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde in einem Tier der MNSC-Transplantationsgruppe eine hohe Zellzahl von über 10 000 hMNSC gefunden. In der MSC-Transplantationsgruppe war die maximal in einem Tier nachgewiesene Zellzahl um den Faktor 10 geringer. (Abbildung 25 / Tabelle 4A)

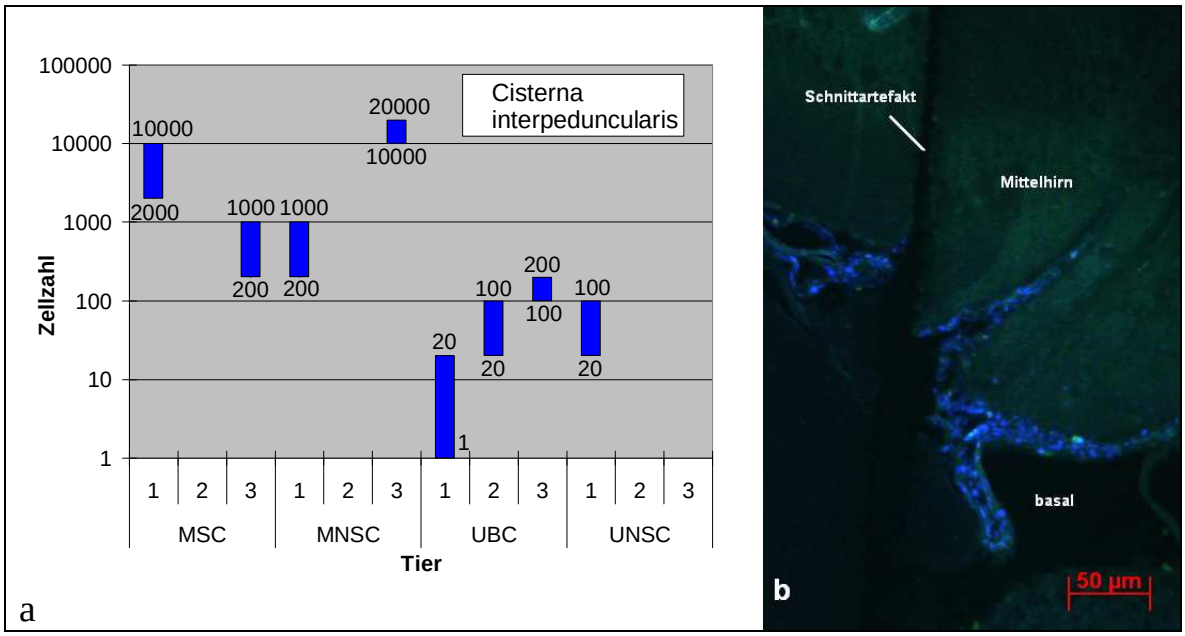


MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 25: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna hypophysea [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Cisterna hypophysea mit transplantierten, Hoechst 33342-markierten hMNSC (humane proneural-konvertierte Knochenmark-stromazellen)

Cisterna interpeduncularis

In der Cisterna interpeduncularis, welche basal des Mittelhirns liegt, wurden in der UNSC-Transplantationsgruppe nur in einem der drei Versuchstiere Zellen entdeckt, wobei die Zellzahl gering war. Dafür wurden in der UBC-Transplantationsgruppe in allen drei Versuchstieren Zellen gefunden, aber in keinem der Tiere überstieg die Zellzahl 1000. In der MNSC-Behandlungsgruppe wurden hingegen in einem Tier über 10000 Zellen gefunden, in einem zweiten noch etwa 1000 und im dritten Tier keine. Ähnlich stellt es sich auch in der MSC-Transplantationsgruppe dar, bei der ebenfalls in zwei von drei Tieren Zellen nachgewiesen wurden. In einem dieser beiden Tiere wurden sogar mehrere Tausend Zellen entdeckt (s. Abbildung 26 / Tabelle 4A).



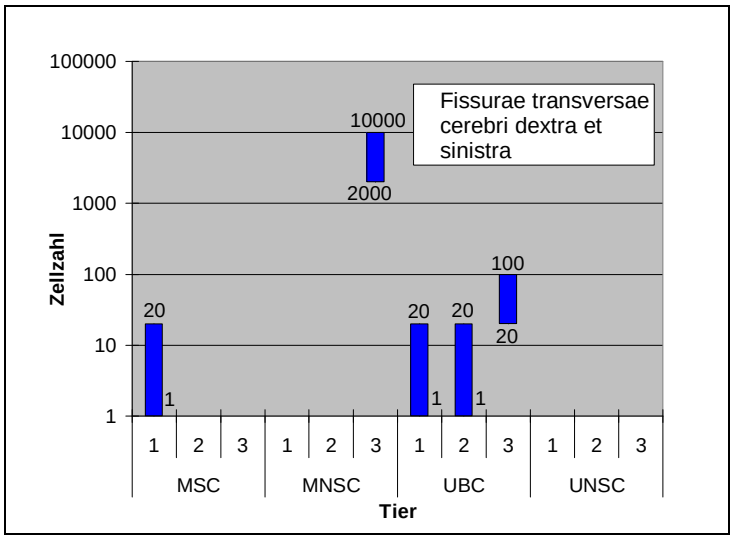
MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 26: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna interpeduncularis [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Cisterna interpeduncularis mit transplantierten, Hoechst 33342-markierten hMNSC (humane proneural-konvertierte Knochenmark-stromazellen)

Fissura transversa cerebri

Die Fissura transversa cerebri ist eine paarig angelegte Struktur. Hier erfolgt aber aufgrund der geringen Zellzahlen die Auswertung nicht seitengetrennt, sondern zusammen und somit in nur einer Abbildung.

In dieser Region konnte nur in einem der zwölf Versuchstiere eine größere Anzahl an Zellen registriert werden. Dabei handelt es sich um ein Tier der MNSC-Transplantationsgruppe, das auch in anderen Regionen ein starkes Vorkommen an transplantierten Zellen zeigt. In den übrigen beiden Tieren dieser Transplantationsgruppe konnten ebenso wie in den drei Tieren der UNSC-Transplantationsgruppe keinerlei Zellen nachgewiesen werden. Auch in der MSC-Transplantationsgruppe konnten Zellen nur in einem der drei Tiere in sehr geringer Anzahl gefunden werden, ebenso wie in der UBC-Transplantationsgruppe in allen drei Tieren. (s. Abbildung 27 / Tabelle 4A). Leider muss hier auf eine mikroskopische Aufnahme aufgrund von Schnittartefakten in diesem ZNS-Bereich beim Tier „MNSC3“ verzichtet werden.

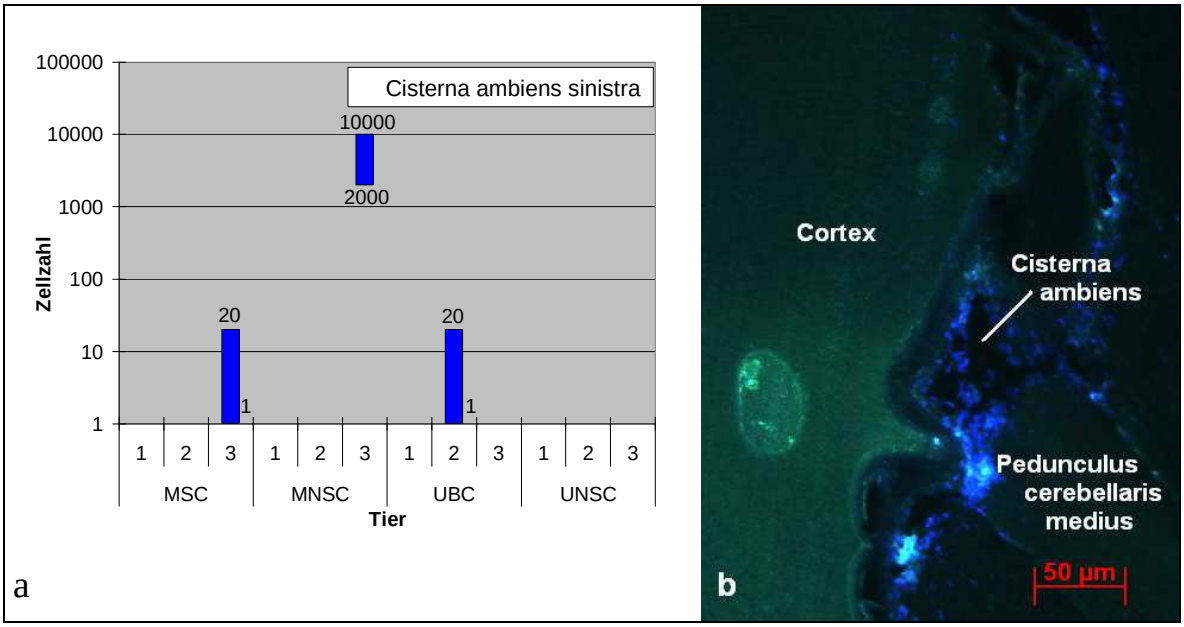


MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 27: Anzahl transplantierter Zellen in den Fissurae transversae cerebri dextra et sinisistra [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]

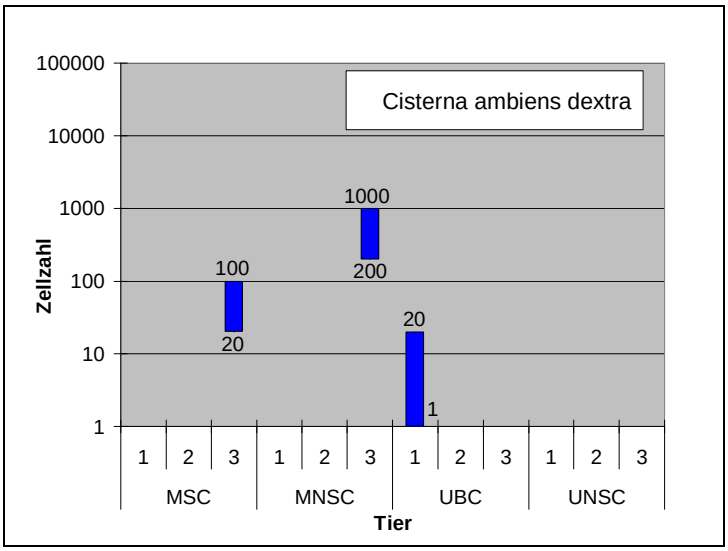
Cisterna ambiens

Die Cisterna ambiens, die das Mittelhirn auf beiden Seiten lateral umfasst, ist dem entsprechend eine paarig angelegte Zisterne. In der UNSC-Transplantationsgruppe konnten in keinem der Tiere -weder in der linken noch in der rechten Cisterna ambiens- Zellen gefunden werden. Aber in der UBC-Transplantationsgruppe wurden in zwei von drei Tieren Zellen nachgewiesen werden, wobei jedes Tier nur Zellen auf einer Seite enthielt und die Anzahl der hUBC sehr gering war. Ein etwas anderes Bild zeigte sich in den beiden Transplantationsgruppen MSC und MNSC. Hier konnten jeweils in einem von drei Versuchstieren Zellen entdeckt werden, aber die hMSC waren in einer leicht und die hMNSC in einer stark erhöhten Menge vertreten und fanden sich jeweils beidseits des Mittelhirns (s. Abbildungen 28 & 29 / Tabelle 4A).



MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 28: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna ambiens sinistra [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Cisterna ambiens sinistra mit transplantierten, Hoechst 33342-markierten hMNSC (humane proneural-konvertierte Knochenmark-stromazellen)



MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

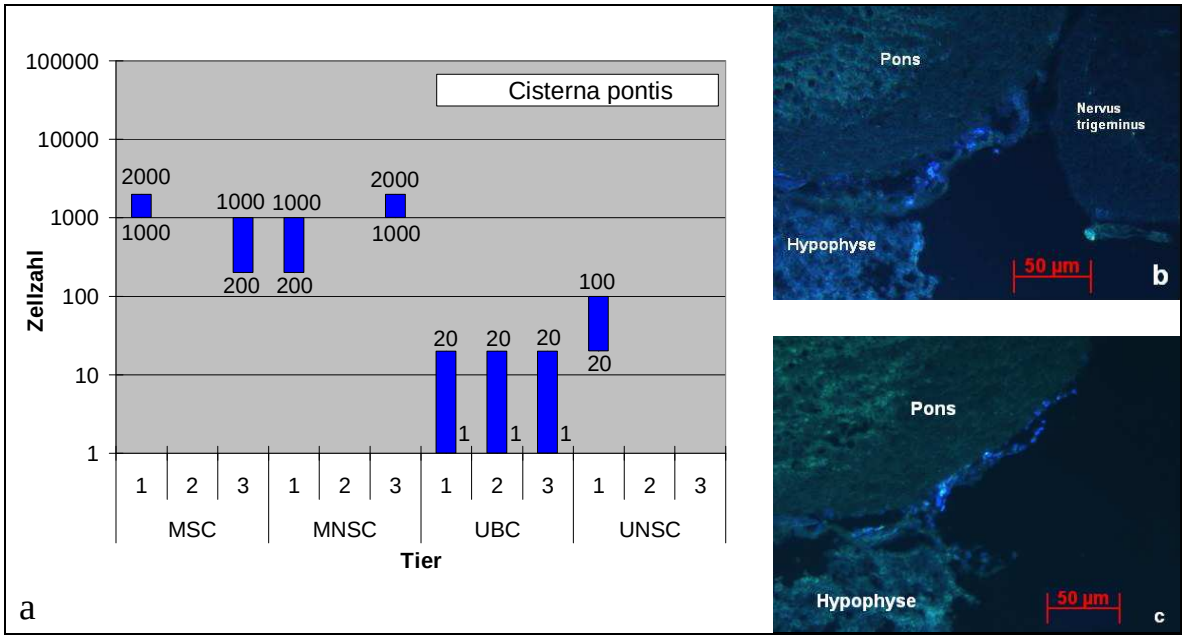
Abbildung 29: Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna ambiens dextra [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]

Cisterna pontocerebellaris

Die Cisterna pontocerebellaris liegt lateral der Pons im Kleinhirnbrückenwinkel, ist paarig angelegt und steht über die Foramina Luschkae mit dem IV.Ventrikel bzw. mit dessen Recessus laterales in Verbindung. In dieser Zisterne wurden in einem Tier der MNSC-Transplantationsgruppe Zellen gefunden. Dabei handelte es sich um eine sehr geringe Anzahl von unter 20 Zellen, die nur auf der rechten Seite der Pons lokalisiert waren. Ansonsten konnten in keinem der anderen elf Versuchstiere der Transplantationsgruppen MSC, MNSC, UBC und UNSC Zellen nachgewiesen werden (s. Tabelle 4B).

Cisterna pontis

Die Cisterna pontis, die basal der Pons bzw. zwischen Pons und Clivus liegt, enthält in der UBC-Transplantationsgruppe in allen drei Tieren eine sehr geringe Menge an Zellen. In der UNSC-Transplantationsgruppe wurden sogar nur in einer der drei Mäuse Zellen entdeckt, welche auch hier nur gering vertreten waren. In den Transplantationsgruppen MNSC und MSC zeigte sich in dieser Zisterne ein nahezu identisches Bild: es wurden in jeweils zwei der drei Tiere pro Gruppe Zellen gefunden, wobei jeweils in einem dieser Tiere mehrere Hundert Zellen und in dem anderen eine Zellzahl von bis zu 2000 erfasst wurde (s. Abbildung 30 / Tabelle 4B).

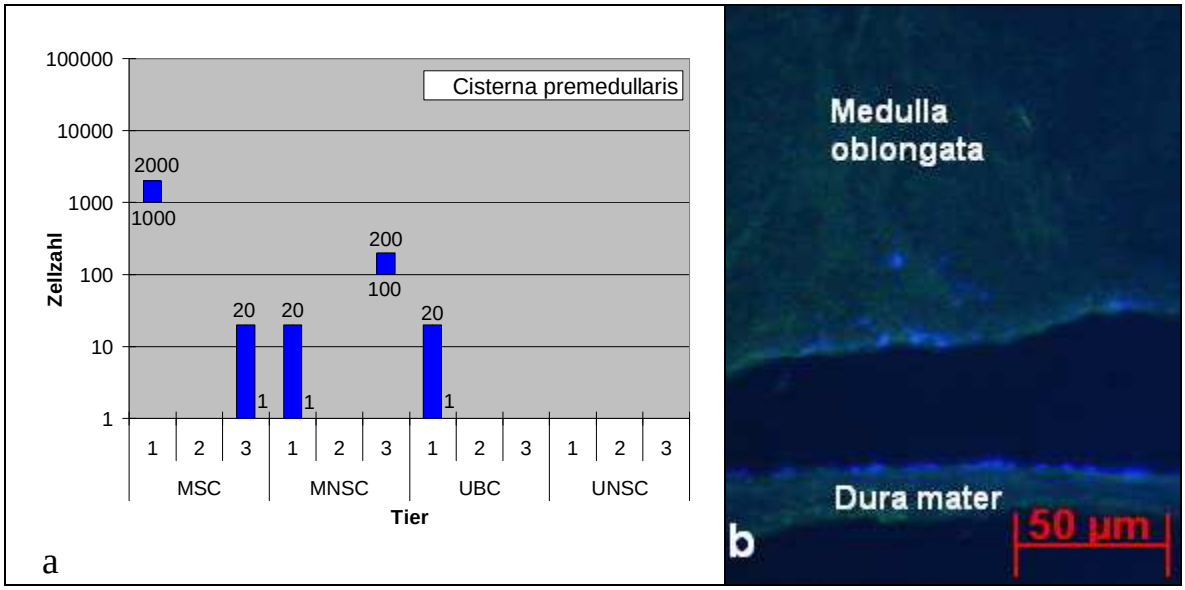


MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 30: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna pontis [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) & (c) Cisterna pontis, die transplantierte, Hoechst 33342-markierte hUNSC (humane proneural-konvertierte Nabelschnurblutzellen) enthält

Cisterna premedullaris

In den beiden Transplantationsgruppen MSC und MNSC konnten jeweils in zwei von drei Tieren in der Cisterna premedullaris, welche ventral der Medulla oblongata liegt, Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurden in der MSC-Transplantationsgruppe relativ wenig Zellen und in der MNSC-Transplantationsgruppe nur in einem dieser beiden Tiere eine höhere Zellzahl von bis zu 2000 MNSC gefunden. In der UBC-Transplantationsgruppe wurde in einem von drei Tieren eine sehr geringe Zellzahl entdeckt. In den beiden anderen Tieren dieser Gruppe sowie in den drei Tieren der UNSC-Transplantationsgruppe wurden keinelei Zellen nachgewiesen (s. Abbildung 31 / Tabelle 4B).



MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

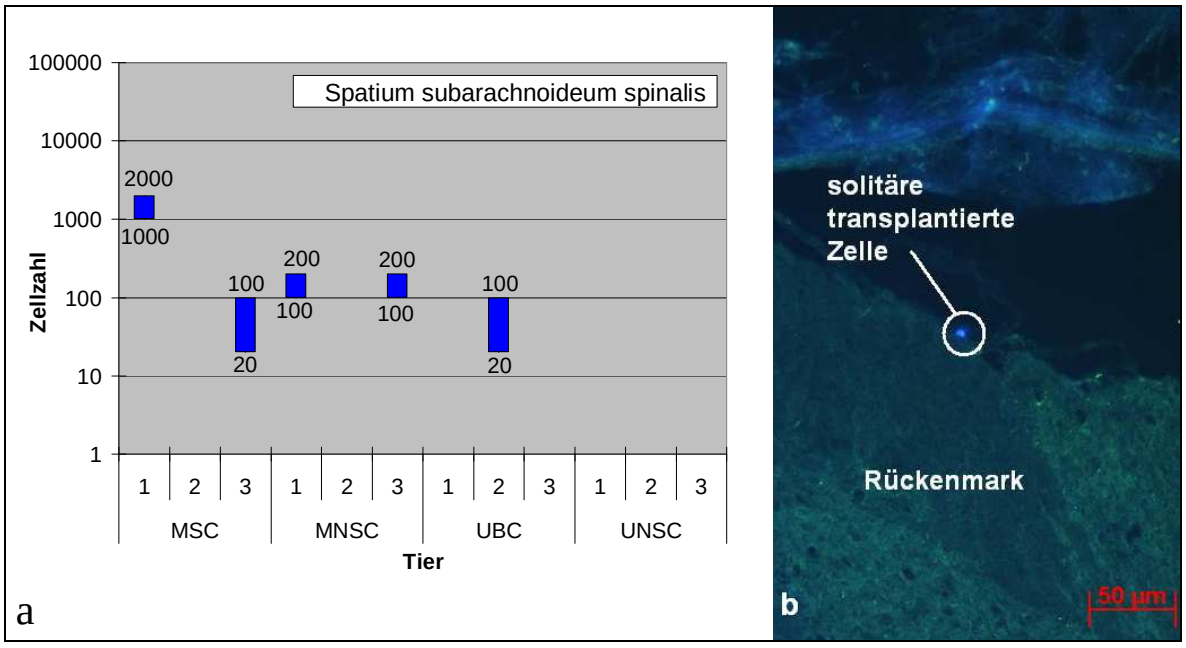
Abbildung 31: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna premedullaris [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Cisterna premedullaris mit umgebender Dura mater und transplantierten, Hoechst 33342 markierten hMNSC (humane proneural-konvertierte Knochenmarkstromazellen)

Spatium subarachnoideum spinalis (zervikal)

Das Spatium subarachnoideum spinalis umgibt das Rückenmark und ist ventral zur Cisterna spinalis anterior erweitert. In diese Daten ist nur die Auswertung des zervikalen Anteils des Spatium subarachnoideum spinalis eingeflossen.

In der UBC-Transplantationsgruppe wurde in einer von drei Mäusen eine geringe Anzahl Zellen gefunden. In den beiden anderen Tieren dieser Gruppe wurden jedoch wie in den drei Tieren der UNSC-Transplantationsgruppe keine Zellen entdeckt.

In der MNSC-Transplantationsgruppe wurden in zwei von drei Tieren MNSC nachgewiesen, wobei jeweils nur zwischen 100 und 200 Zellen gefunden wurden. Ähnliches zeigte sich bei der MSC-Transplantationsgruppe. Hier wurden ebenfalls in zwei von drei Tieren Zellen entdeckt, aber in einem dieser beiden Tiere wurden über 1000 MSC gezählt (s. Abbildung 32 / Tabelle 4B).



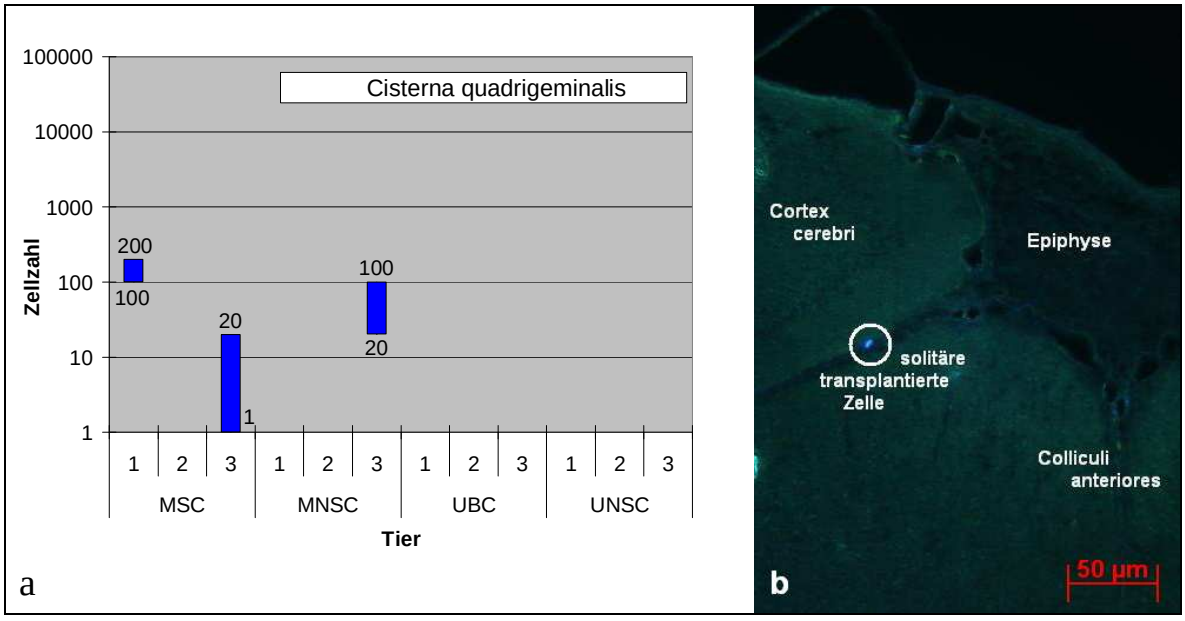
MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 32: (a) Anzahl transplantierter Zellen im Spatium subarachnoideum spinalis [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Spatium subarachnoideum spinalis mit solitärer, transplantierter, Hoechst 33342-markierter hUBC (humane Nabelschnurblutzelle)

Cisterna quadrigeminalis

Die Cisterna quadrigeminalis liegt im Bereich der Vierhügelplatte, von der sie auch ihren Namen hat und steht über die Cisterna ambiens mit der Cisterna basalis und über die Cisterna cerebelli superior mit der Cisterna magna in Verbindung.

Hier konnten in den Transplantationsgruppen UBC und UNSC keinerlei Zellen nachgewiesen werden. Auch in der MNSC-Transplantationsgruppe konnte nur in einem der drei Tiere Zellen gefunden werden und zwar in jenem Tier („MNSC 3“), bei dem in vielen verschiedenen Zisternen besonders viele Zellen gefunden wurden. In der MSC-Transplantationsgruppe hingegen konnten in zwei von drei Versuchstieren Zellen entdeckt werden (s. Abbildung 33 / Tabelle 4B).



MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 33: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna quadrigeminalis [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Cisterna quadrigeminalis mit Epiphyse und solitärer, transplantierter Hoechst 33342-markierter hMNSC (humane proneural-konvertierte Knochenmarkstromazelle)

Cisterna magna

Die Cisterna magna wird auch als Cisterna cerebellomedullaris posterior bezeichnet und wird durch Cerebellum, Medulla und Velum medullare inferius begrenzt. Sie steht über das Foramen Magendii mit dem IV.Ventrikel, über das Foramen magnum mit dem Spatium subarachnoideum spinalis, über die Cisterna cerebelli superior mit der Cisterna quadrigeminalis und über die Cisterna cerebellomedullaris lateralis mit der Cisterna basalis in Verbindung.

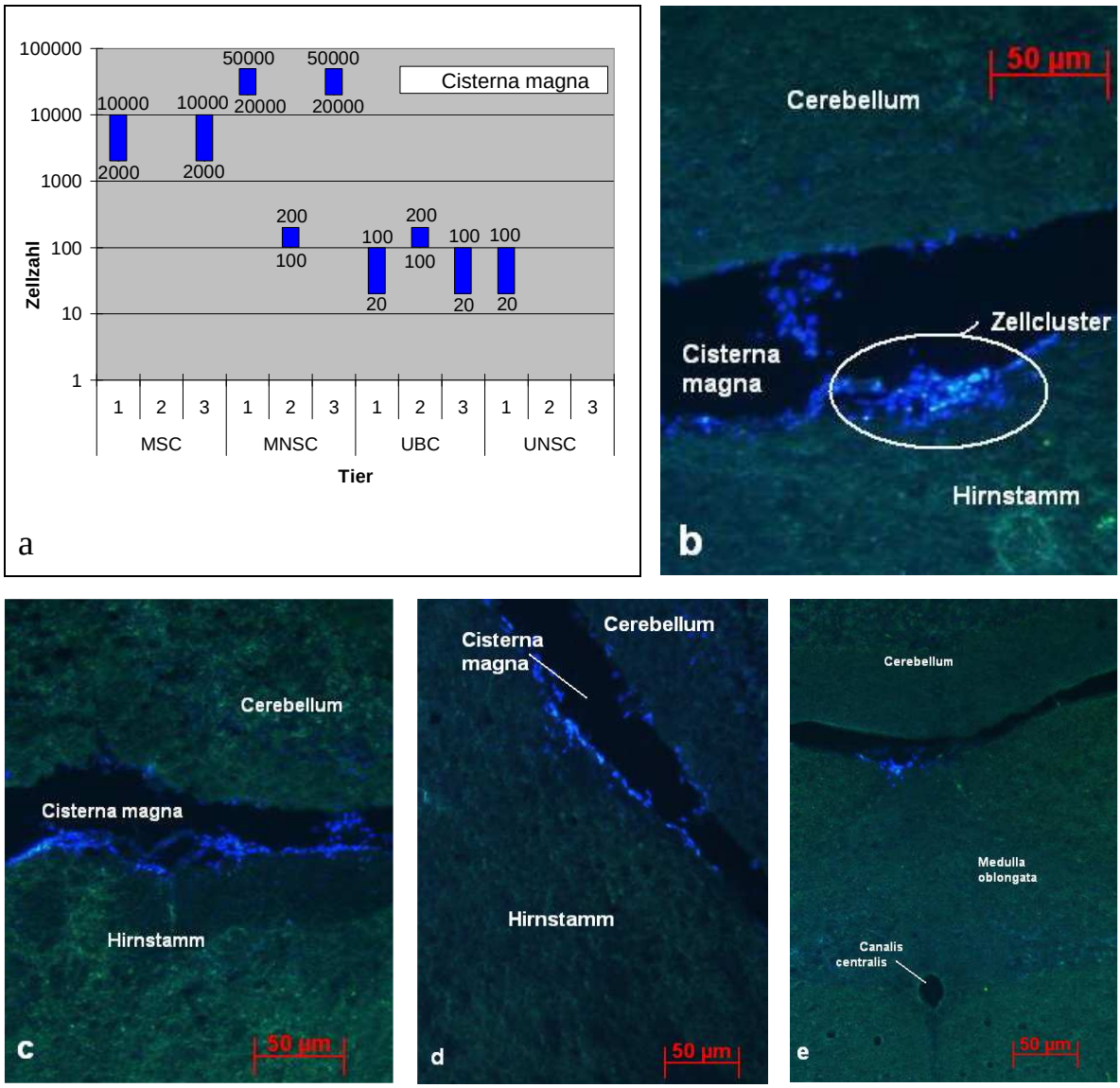
Außerdem diente sie in diese Transplantationsstudie als Injektionsort für die zu transplantierenden Stammzellen. Darum ist es auch nicht verwunderlich, dass hier bei allen Transplantationsgruppen eine besonders große Menge der unterschiedlichen Stammzellpopulationen gefunden wurde.

So wurde in allen drei Versuchstieren der MNSC-Transplantationsgruppe eine große Anzahl Zellen entdeckt, welche in zweien dieser Tiere sogar mehrere Zehntausend hMNSC betrug.

Auch in der UBC-Transplantationsgruppe wurden in allen drei Tieren Zellen nachgewiesen, allerdings in einem weit geringeren Ausmaß.

In der MSC-Transplantationsgruppe hingegen wurden in zwei der drei Tiere jeweils bis zu 10000 hMSC gefunden. In der dritten Maus dieser Gruppe konnten hier - wie in allen anderen Liquorräumen auch – keinerlei Zellen nachgewiesen werden.

In der UNSC-Transplantationsgruppe wurden nur in einem der drei Tiere hUNSC gefunden und dies nur in einem geringen Ausmaß (s. Abbildung 34 / Tabelle 4B).



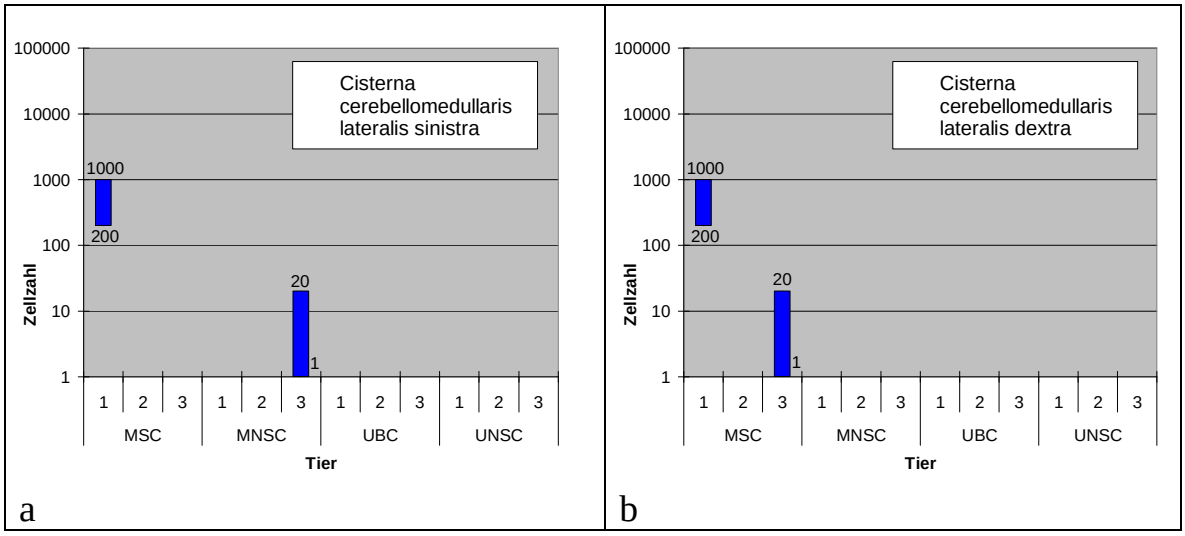
MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 34: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna magna [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b), (c), (d) & (e) Cisterna magna, die transplantierte, Hoechst 33342- markierte Stammzellen enthält [b & c: hMSC (human mesenchymal stem cells); d & e: hMNSC (humane proneural-konvertierte Knochenmarkstromazellen)]

Cisterna cerebellomedullaris lateralis

Diese Zisterne liegt ventrolateral der Medulla oblongata, zwischen Foramen magnum und unterem Rand der Pons und ist paarig angelegt.

In den Transplantationsgruppen UBC und UNSC wurden hier in keinem der Tiere Zellen entdeckt. Dafür wurden Zellen in der MSC-Transplantationsgruppe in zwei der drei Tiere nachgewiesen, wobei in einem Tier Zellen nur in der rechten Zisterne und im anderen Tier Zellen sowohl in der rechten als auch in der linken Zisterne gefunden wurden. In der MNSC-Transplantationsgruppe konnten Zellen nur in einem der drei Tiere nachgewiesen werden und das nur in der linken Zisterne sowie in äußerst geringer Menge (s. Abbildung 35 / Tabelle 4B).



MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 35: (a) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna cerebellomedullaris lateralis sinistra [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b) Anzahl transplantierter Zellen in der Cisterna cerebellomedullaris lateralis dextra [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]

Tabelle 4A: Verteilung der vier verschiedenen Stammzellpopulationen MSC, MNSC, UBC und UNSC im äußeren Liquorraum zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion von 100 000 Zellen

MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.
1.Spalte: Liquorraum; 2.Spalte: Transplantationsgruppe; 3.-11.Spalte: Zellzahl

		0	<20	<100	<200	<1000	<2000	<10000	<20000	<50000
„Bulbus superior“	MSC	2		3	1					
	MNSC	1 2		3						
	UBC	1 2		3						
	UNSC	1 2 3								
Fissura longitudinalis cerebri	MSC	2			3		1			
	MNSC	2		1			3			
	UBC	2	1			3				
	UNSC	2 3		1						
Cisterna olfactorii	MSC	2			3				1	
	MNSC		2					1 3		
	UBC		1	2	3					
	UNSC	2 3		1						
Cisterna chiasmatica	MSC	2		3			1			
	MNSC			2		1		3		
	UBC		1 2			3				
	UNSC	2 3		1						
Cisterna hypophysea	MSC	2			3		1			
	MNSC	2			1				3	
	UBC		1		2	3				
	UNSC	2 3	1							
Cisterna inter-pedulcularis	MSC	2				3		1		
	MNSC	2				1			3	
	UBC		1	2	3					
	UNSC	2 3		1						
Fissurae transversae cerebri (links & rechts)	MSC	2 3	1							
	MNSC	1 2						3		
	UBC		1 2	3						
	UNSC	1 2 3								
Cisterna ambiens sinistra	MSC	1 2	3							
	MNSC	1 2						3		
	UBC	1 3	2							
	UNSC	1 2 3								
Cisterna ambiens dextra	MSC	1 2		3						
	MNSC	1 2				3				
	UBC	2 3	1							
	UNSC	1 2 3								
		0	<20	<100	<200	<1000	<2000	<10000	<20000	<50000

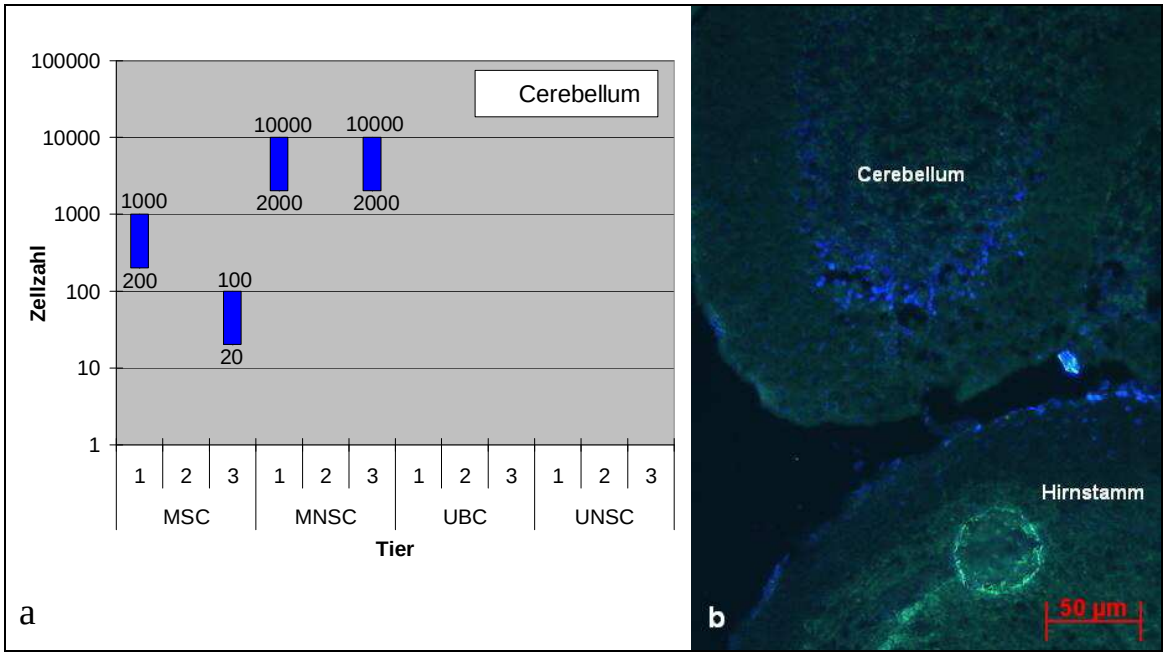
Tabelle 4B: Verteilung der vier verschiedenen Stammzellpopulationen MSC, MNSC, UBC und UNSC im äußeren Liquorraum zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion von 100 000 Zelle

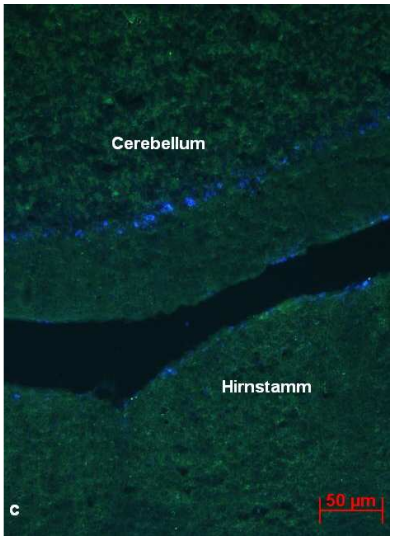
MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.
1.Spalte: Liquorraum; 2.Spalte: Transplantationsgruppe; 3.-11.Spalte: Zellzahl

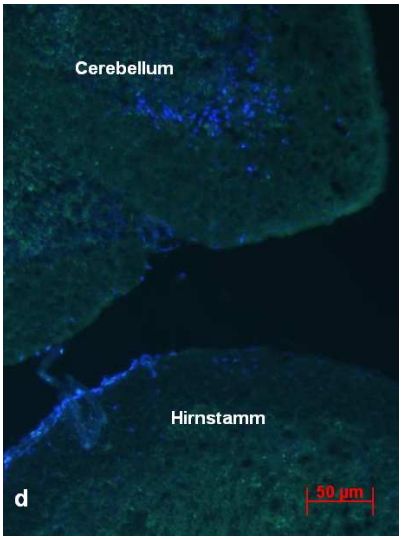
		0	<20	<100	<200	<1000	<2000	<10000	<20000	<50000
Cisterna pontis	MSC	2				3	1			
	MNSC	2				1	3			
	UBC		1 2 3							
	UNSC	2 3		1						
Cisterna premedullaris	MSC	2	3				1			
	MNSC	2	1		3					
	UBC	2 3	1							
	UNSC	1 2 3								
Spatium sub-arachnoideum spinalis	MSC	2		3			1			
	MNSC	2			1 3					
	UBC	1 3		2						
	UNSC	1 2 3								
Cisterna quadrigeminalis	MSC	2	3		1					
	MNSC	1 2		3						
	UBC	1 2 3								
	UNSC	1 2 3								
Cisterna magna	MSC	2						1 3		
	MNSC				2					1 3
	UBC			1 3	2					
	UNSC	2 3		1						
Cisterna cerebello-medullaris lateralis sinistra	MSC	2 3				1				
	MNSC	1 2	3							
	UBC	1 2 3								
	UNSC	1 2 3								
Cisterna cerebello-medullaris lateralis dextra	MSC	2	3			1				
	MNSC	1 2 3								
	UBC	1 2 3								
	UNSC	1 2 3								
Cisterna ponto-cerebellaris sinistra	MSC	1 2 3								
	MNSC	1 2 3								
	UBC	1 2 3								
	UNSC	1 2 3								
Cisterna ponto-cerebellaris dextra	MSC	1 2 3								
	MNSC	1 2	3							
	UBC	1 2 3								
	UNSC	1 2 3								
		0	<20	<100	<200	<1000	<2000	<10000	<20000	<50000

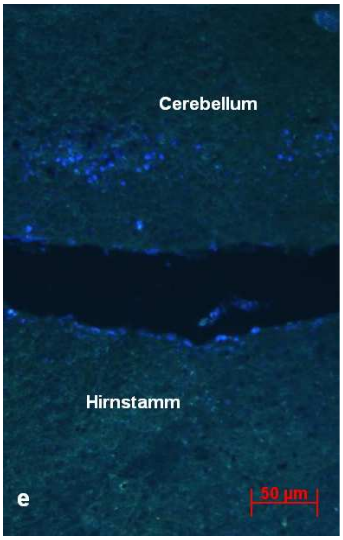
3.1.3.) Intraparenchymale Verteilung

Cerebellum









MSC: Transplantationsgruppe, in der hMSC (human mesenchymal stem cells) transplantiert wurden.
MNSC: Transplantationsgruppe, in der hMNSC (human MSC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
UBC: Transplantationsgruppe, in der hUBC (human umbilical cord blood cells) transplantiert wurden.
UNSC: Transplantationsgruppe, in der hUNSC (human UBC-derived neural stem cells) transplantiert wurden.
Die Zahlen 1,2 und 3 stehen für die jeweilige Versuchstiernummer innerhalb der jeweiligen Transplantationsgruppe.

Abbildung 36: (a) Anzahl transplantierter Zellen mit intraparenchymaler Lage im Cerebellum [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]
(b), (c), (d) & (e) Transplantierte Zellen mit intraparenchymaler Lage im Cerebellum [b, d & e: hMNSC (humane proneural-konvertierte Knochenmarkstromazellen; c: hMSC (humane Knochenmarkstroma-zellen)]

Das Cerebellum ist der einzige ZNS-Abschnitt, in dem transplantierte Zellen intraparenchymal nachgewiesen werden konnten. Dieses Phänomen zeigte sich dabei ausschließlich in den Bereichen des Cerebellums, welche die Cisterna magna begrenzen und es war auf die Transplantationsgruppen MSC und MNSC beschränkt.
So wurden in der MNSC-Transplantationsgruppe in zwei der drei Tiere jeweils mehrere Tausend Zellen mit intraparenchymaler Lage erfasst. Beim dritten Tier dieser Gruppe konnte nichts Derartiges beobachtet werden, wobei erwähnt werden muss, dass bei diesem Tier im gesamten ZNS nur wenig hMNSC detektiert werden konnten.
In der MSC-Transplantationsgruppe wurden ebenfalls in zwei der drei Tiere transplantierte Zellen im Kleinhirngewebe entdeckt. Im ersten Tier war die Zellzahl nur gering, aber im zweiten konnten immerhin bis zu 1000 hMSC intraparenchymal gefunden werden. Beim dritten Tier dieser Gruppe wurde hingegen nichts Vergleichbares beobachtet, was nicht verwundert, da bei diesem Tier im gesamten ZNS bzw. Subarachnoidalraum keinerlei hMSC gefunden wurden (s. Abbildung 36a).

Lage der transplantierten Zellen mit intraparenchymaler Sitz im Cerebellum

In der nativen Immunfluoreszenz, d.h. ohne eine zusätzliche Färbung der Schnitte, nahm die Mehrheit der intraparenchymal liegenden hMNSC bzw. hMSC eine lineare Anordnung parallel zur Kleinhirnoberfläche an (s. Abbildung 36 b, c, d, e). Diese kettenförmige, perlschnurartige Aufreihung schien auf Höhe des Stratum ganglionare (Purkinje-Zellschicht) zu liegen (s. Abbildung 37). Diese Zellschicht trennt das oberflächlich gelegene, zellarme Stratum moleculare (Molekularschicht) vom stark zellreichen Stratum granulosum (Körnerschicht).

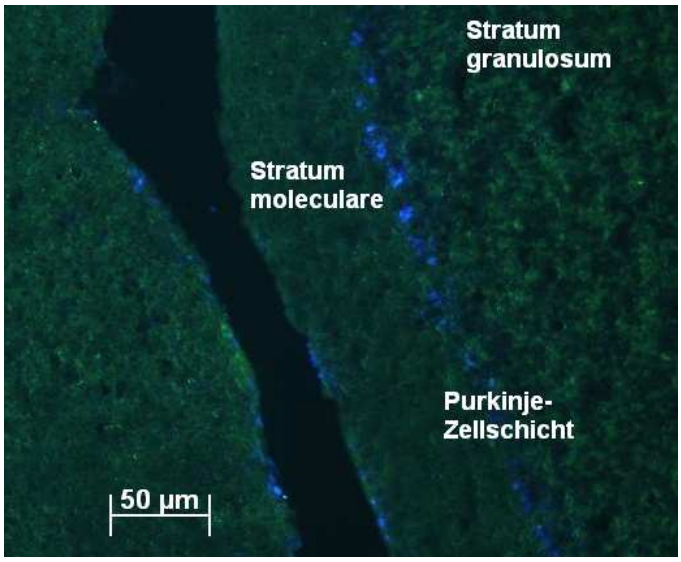


Abbildung 37: Darstellung der Cerebellum-Zellschichten

Diese charakteristische Anordnung warf die Frage auf, ob die hMSC bzw. hMNSC mit den Purkinje-Zellen, welche eine hohe endocytotische Aktivität besitzen, fusioniert waren wie dies schon früher diskutiert wurde **[2] [16] [166] [133] [86]**. Um dieser Frage nachzugehen, wurden β-Tubulin III-Färbungen durchgeführt, was eine bessere Beurteilung der Lagebeziehung zwischen den transplantierten, Hoechst 33342-markierten Stammzellen und den sehr großen Purkinje-Zellen mit ihrer typischen Morphologie ermöglicht hat (s. Abbildung 38).

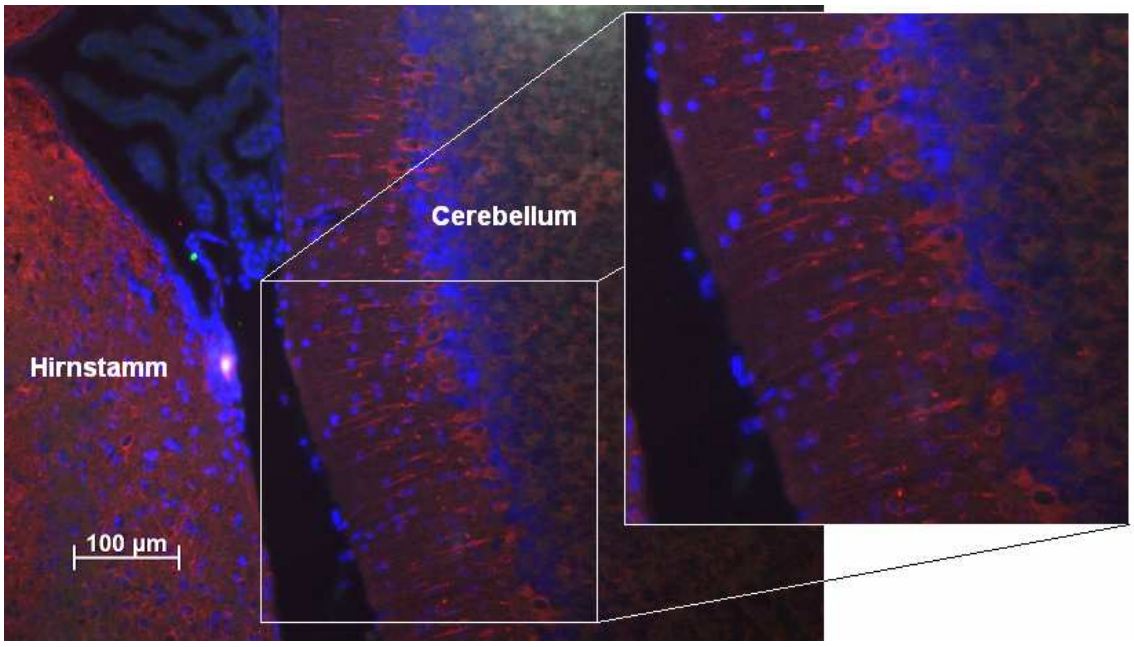


Abbildung 38: Frontalschnitt des Cerebellums nach immunhistologischer Färbung mit einem Antikörper gegen Klasse III ß-Tubulin (rot) und mit Abbildung von Hoechst 33342-markierten, transplantierten Stammzellen (blau) mit intraparenchymaler Lage im Cerebellum am Rande des Stratum granulare

Mit Hilfe dieser Färbungen konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit der transplantierten Zellen jenseits des Stratum ganglionare in Richtung Körnerzellschicht liegt; allerdings korrelieren einige Purkinje-Zellen mit HOECHST-markierten Stellen. Aufgrund der sehr dünnen Schnittdicke von 12µm ist eine durch Überlagerung verschiedener Zellschichten bedingte Korrelation unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen. Somit erscheint eine Fusion einzelner hMNSC bzw. hMSC mit Purkinje-Zellen möglich, kann hier aber letztendlich nicht bewiesen werden.

3.1.4.) Kurze Zusammenfassung der Ergebnisse nach Transplantationsgruppen geordnet

MSC-Transplantationsgruppe

Bei zwei von drei Tieren dieser Transplantationsgruppe konnten Zellen nachgewiesen werden. Dabei war die Verteilung zwischen innerem und äußerem Liquorraum sehr unausgewogen. Während im inneren Liquorraum eines Tieres nur vereinzelte Zellen im IV.Ventrikel und im anderen Tier insgesamt etwa 300 Zellen in den beiden Recessus laterales des IV. Ventrikels entdeckt werden konnten (s. Tabelle 3), wurden im äußeren Liquorraum dieser beiden Tiere Zellen in großer Anzahl gefunden. So wurde der Großteil der Zellen jeweils in der Cisterna magna und in den basalen Zisternen des äußeren Liquorraumes nachgewiesen (s. Tabelle 4A/B).
Hinzu kommt, dass in diesen beiden Tieren Zellen im Kleinhirngewebe in perlschnurartiger Aufreihung entlang des Stratum cellulare gefunden wurden.
Insgesamt wurden im ersten Tier dieser Transplantationsgruppe etwa 38.000 Zellen, im zweiten keinerlei Zellen und im dritten etwa 8.000 Zellen nachgewiesen.

MNSC-Transplantationsgruppe

In allen drei Tieren dieser Transplantationsgruppe konnten Zellen nachgewiesen werden. Allerdings konnten in einem dieser Tiere lediglich im äußeren Liquorraum Zellen entdeckt werden und dies nur in einer verhältnismäßig geringen Zahl. In den beiden anderen Tieren dieser Gruppe wurden im äußeren Liquorraum sehr viele hMNSC erfasst. Dabei wurden in der Cisterna magna und in den basalen Zisternen die meisten Zellen entdeckt. In diesen beiden Tieren wurden ebenfalls Zellen im inneren Liquorsystem gefunden. So ließen sich hier jeweils im linken Recessus lateralis des IV.Ventrikels so viele Zellen erfassen wie in keinen anderen Tier einer anderen Transplantationsgruppe.

Wiederum bei diesen beiden Tieren traten einige Tausend intraparenchymale hMNSC im Kleinhirn auf, die die gleiche charakteristische, lineare Anordnung entlang der Körnerzellschicht aufwiesen, wie sie schon in der MSC-Transplantationsgruppe gefunden wurde.
Insgesamt wurden im ersten Tier dieser Transplantationsgruppe etwa 50.000 Zellen, im zweiten ca. 220 Zellen und im dritten beinahe 100.000 Zellen nachgewiesen.

UBC-Transplantationsgruppe

In dieser Transplantationsgruppe wurden sowohl im inneren als auch im äußeren Liquorraum nur wenige Zellen entdeckt. So konnten im inneren Liquorraum nur in zwei der drei Tiere Zellen entdeckt werden, wobei es sich um einzelne Zellen im IV.Ventrikel und in dessen Recessus laterales handelt. Im äußeren Liquorraum konnten in allen drei Tieren Zellen, vor allem in der Cisterna magna sowie in den basalen Zisternen, nachgewiesen werden.
Transplanierte hUBC mit intraparenchymaler Lage konnten nicht entdeckt werden.
Insgesamt wurden im ersten Tier dieser Transplantationsgruppe etwa 160 Zellen, im zweiten ca. 550 Zellen und im dritten etwa 2.300 Zellen nachgewiesen.

UNSC-Transplantationsgruppe

Es konnten in dieser Transplantationsgruppe allgemein nur sehr wenige Zellen nachgewiesen werden. Im äußeren Liquorraum wurden nur bei einem der Tiere Zellen entdeckt. Dabei handelt es sich um zumeist vereinzelte Zellen in den basalen Zisternen und der Cisterna magna, deren Gesamtzahl nicht größer als 200 Zellen ist. Im inneren Liquorsystem konnten in zwei Tieren Zellen im IV.Ventikel entdeckt werden. Allerdings wurden jeweils nur etwa ein Dutzend Zellen nachgewiesen.
Insgesamt wurden im ersten Tier dieser Transplantationsgruppe ca. 370 Zellen, im zweiten keinerlei Zellen und im dritten etwa ein Dutzend Zellen nachgewiesen.

3.2.) Verteilung der vier verschiedenen Stammzellpopulationen MSC, MNSC, UBC und UNSC im ZNS-Gewebe und den Liquorräumen 65 Tage nach Cisterna magna-Injektion von 100 000 Zellen

65 Tage nach der Cisterna magna-Injektion der verschiedenen Stammzellpopulationen wurden zur Erfassung der Stammzellverteilung zu diesem Zeitpunkt jeweils drei Tiere der vier verschiedenen Transplantationsgruppen MSC, MNSC, UBC und UNSC untersucht.
Aus verschiedenen Gründen (s. Diskussion) wurden die vier Stammzellpopulationen hier vor ihrer Transplantation nicht mit Hoechst 33342 markiert. Vielmehr sollten die Zellen durch eine indirekte Immunhistochemie mit einem Antikörper gegen „human nuclear antigen“ nachgewiesen werden. Da dies –trotz unterschiedlichster Färbeprotokolle- nicht funktioniert hat, konnte die Verteilung der transplantierten Stammzellen 65 Tage nach Cisterna magna-Injektion nicht ermittelt werden.

3.3.) Ausblick: Verteilung von 750 000 transplantierten UBC zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion im ZNS-Gewebe und den Liquorräumen

Bei einem zusätzlichen Tier mit der Bezeichnung „UBC 189“ wurde eine sehr hohe Anzahl von 750 000 hUBC transplantiert. Dies dient dem Ausblick auf zukünftige Studien. Denn es interessiert die Frage, ob sich durch eine erhöhte transplantierte Zellzahl eine andere Verteilung der transplantierten Zellen im Gehirn bzw. den Liquorräumen ergibt. Des Weiteren interessiert dabei, ob sich durch eine Steigerung der transplantierten Zellzahl ein verändertes bzw. ein verbessertes „outcome“ gegenüber Tieren, denen weitaus weniger Zellen transplantiert wurden, bewirken lässt **[39].**

3.3.1.) Verteilung im inneren Liquorraum

In diesem Tier wurden in den beiden Seitenventrikeln (I. und II. Ventrikel) ganz vereinzelt Zellen in einer sehr geringen Zellzahl gefunden. Dies ist aus zweierlei Gründen

bemerkenswert: Zum einen wurden keinerlei Zellen in den Seitenventrikeln der zwölf Tiere, denen 100 000Zellen transplantiert wurden, entdeckt. Zum anderen wurden in dieser Maus weder im III.Ventrikel noch in den Foramina interventricularia Zellen entdeckt. Dies hätte man unter der Annahme vermutet, dass die Zellen über den direkten Weg des Liquorsystems vom Injektionsort zu den Seitenventrikeln gelangt sind. Eine alternative Möglichkeit ist, dass die Zellen in den Pacchionischen Granulationen oder an den Austrittsstellen der Hirn- und Spinalnerven mit dem Liquor resorbiert wurden und dann über Blut und Plexus choroideus erneut in das Liquorsystem gelangt sind.

Im Aquaeductus cerebri wurden überwiegend im kaudalen Abschnitt zahlreiche Zellen entdeckt, ebenso wie im Recessus colliculi posterioris, der v.a. vom Cerebellum und den Colliculi posteriores begrenzt wird und wo bis zu 1000 Zellen gezählt wurden.

Im IV.Ventrikel dieses Tieres fand sich eine riesige Anzahl transplantierter Zellen von über 50 000 Zellen, aber dafür war die Zellzahl in den beiden Recessus laterales ventriculi quarti mit jeweils zwischen 100 und 200 Zellen erstaunlich niedrig.

Im zervikalen Anteil des Rückenmarks wurden Zellen im Zentralkanal entdeckt (s. Abbildung 39).

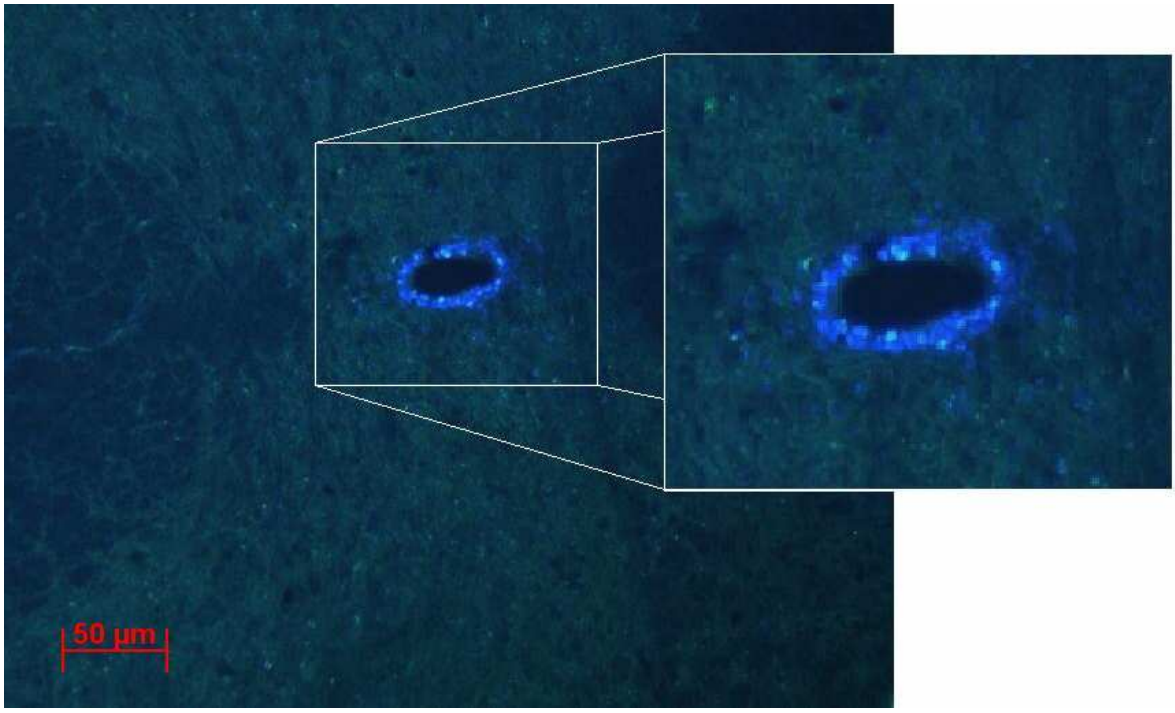
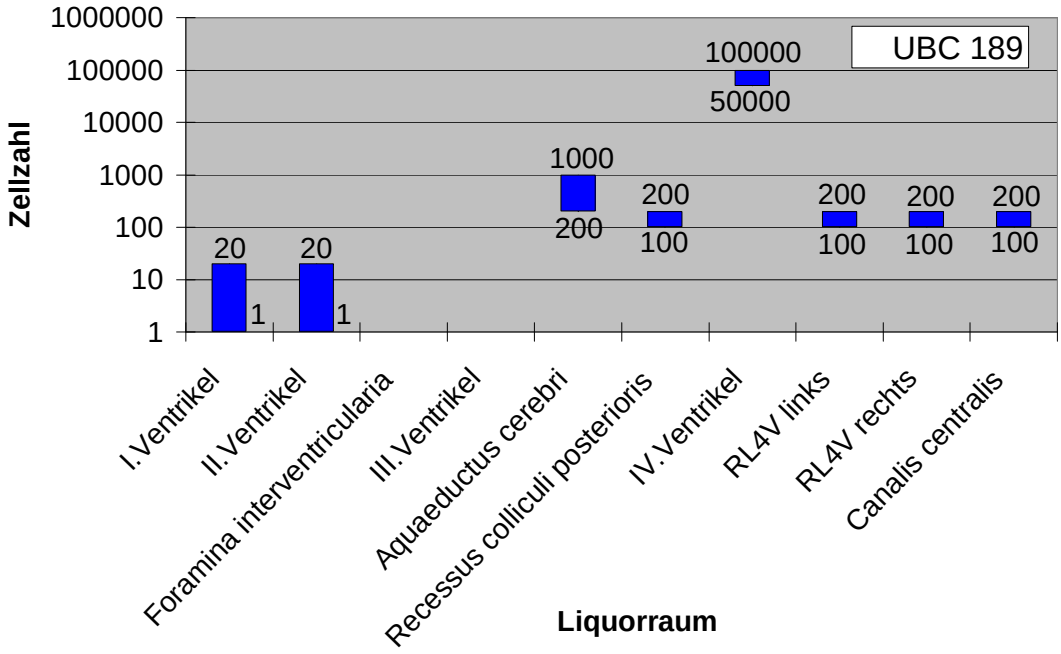


Abbildung 39: Transplantierte, Hoechst 33342-markierte Zellen im Canalis centralis des zervikalen Rückenmarks

Die ermittelte Zellzahl fällt dabei zwar gering aus (Abbildung 40), aber dies ist das einzige Tier, bei dem Zellen im Zentralkanal nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren war zu

beobachten, dass die Anzahl der im Zentralkanal nachgewiesenen Zellen nachließ je weiter kaudal die Schnitte angefertigt wurden.



UBC 189: Name des Versuchstieres RL4V: Recessus lateralis ventriculi quarti

Abbildung 40: Anzahl transplantierter Zellen in den verschiedenen Abschnitten des inneren Liquorraums zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion von 750000 UBC (Nabelschnurblutzellen) [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]

3.3.2.) Verteilung im äußeren Liquorraum

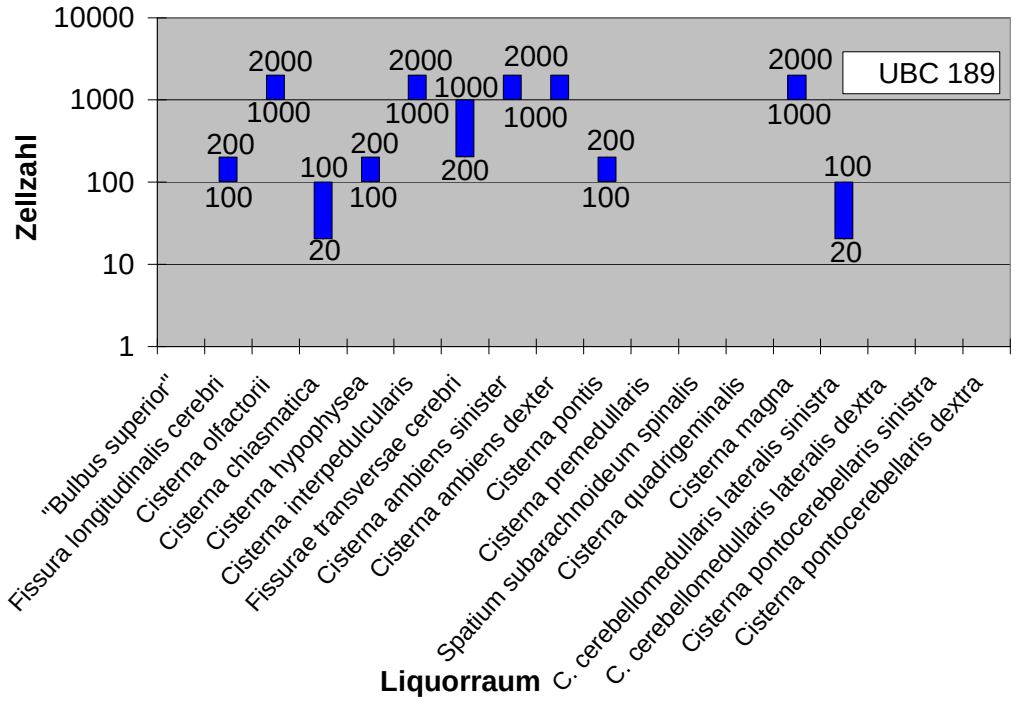
Bei diesem Tier „UBC 189“, dem 750 000 hUBC transplantiert worden sind, wurden keine Zellen in der Region „Bulbus superior“ gefunden, was bedeutet, dass weder auf der Konvexität der Bulbi noch des Cerebrums transplantierte Zellen nachgewiesen werden konnten. In der Fissura longitudinalis cerebri hingegen gelang dies vor allem zwischen den beiden Bulbi. Allerdings war hier die Zellzahl von unter 100 nicht so groß wie in den basal liegenden Zisternen. So bewegt sich die ermittelte Zellzahl in der Cisterna olfactorii, Cisterna hypophysea, Cisterna interpeduncularis und Cisterna pontis jeweils zwischen 100 und 2000. In der ebenfalls basal liegenden Cisterna chiasmatica wurden aber lediglich einige Dutzend Zellen gesichtet und in der Cisterna premedullaris wurden keinerlei Zellen

entdeckt. Dies verhielt sich auch im kaudal angrenzenden Spatium subarachnoideum spinalis des zervikalen Rückenmarks nicht anders.

In der Fissura transversa cerebri befanden sich einige Hundert Zellen und lateral des Mittelhirns in der paarigen Cisterna ambiens waren es beidseits jeweils bis zu 2000 Zellen. In den restlichen paarigen Zisternen befanden sich jedoch nur in der Cisterna cerebellomedullaris lateralis sinistra einige Dutzend hUBC.

Auffallend bei der Zellverteilung in diesem Tier ist auch, dass sich in der Cisterna quadrigeminalis hUBC befanden, wo doch in dieser Zisterne zuvor lediglich in den Transplantationsgruppen MNSC und MSC –wenn auch nur wenige- Zellen nachgewiesen werden konnten.

Ebenfalls erstaunlich ist die Tatsache, dass die Cisterna magna als Transplantationsort von 750 000 hUBC nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl von etwa 2000 Zellen aufwies. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass bei diesem Tier massiv Zellen im Hirnstamm-Parenchym gefunden wurden und ein potentieller Stichkanal entdeckt wurde. Dies lässt die Vermutung zu, dass hier die Zellen nicht vollständig oder gar nicht in die Cisterna magna injiziert wurden, was diese geringe Zellzahl erklären könnte.



UBC 189: Name des Versuchstieres C.: Cisterna

Abbildung 41: Anzahl transplantierter Zellen in den verschiedenen Abschnitten des äußeren Liquorraums zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion von 750000 UBC (Nabelschnurblutzellen) [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]

3.3.3.) Intraparenchymale Verteilung

Bei diesem Tier, dem 750.000 hUBC in die Cisterna magna transplantiert wurden, zeigte sich bei der intraparenchymalen Verteilung der transplantierten Stammzellen ein völlig anderes Bild als bei den Tieren der vier Transplantationsgruppen.

Im Cerebellum zeigte sich die lineare Aufreihung der hUBC am Rand des Stratum granulosum parallel zur Kleinhirnoberfläche, wie sie schon in den Transplantationsgruppen MSC und MNSC aufgefallen war (s. Kapitel 3.1.3). Dies ist erstaunlich, da hier hUBC transplantiert wurden, ein solcher Befund aber bisher bei keinem Tier gefunden wurde, dem 100.000 hUBC oder hUNSC transplantiert wurden. Dies spricht dafür, dass die Einwanderung von Zellen abhängig von der transplantierten Zellzahl ist.

Eine weitere Besonderheit ist, dass derselbe Effekt bei diesem Tier nicht nur in Kleinhirn-Regionen auftrat, die die Cisterna magna begrenzen, sondern auch in anderen Abschnitten des Cerebellums. So wurden mehrere Hundert hUBC mit der typischen linearen Anordnung in der Lingula cerebelli gefunden. Diese grenzt an den Recessus colliculi posterioris und den IV.Ventrikel, zwei Anteile des innerern Liquorraums, die in diesem Tier viele Zellen enthielten (s. Kapitel 3.3.1).

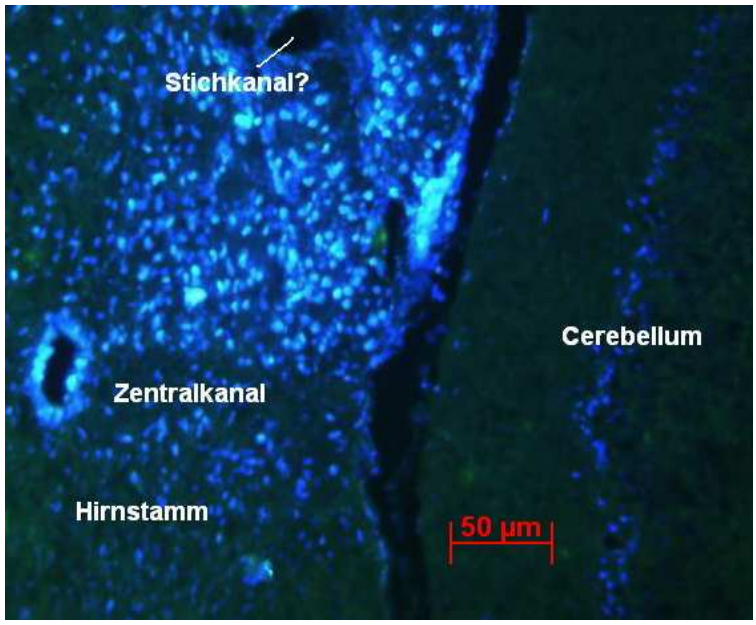
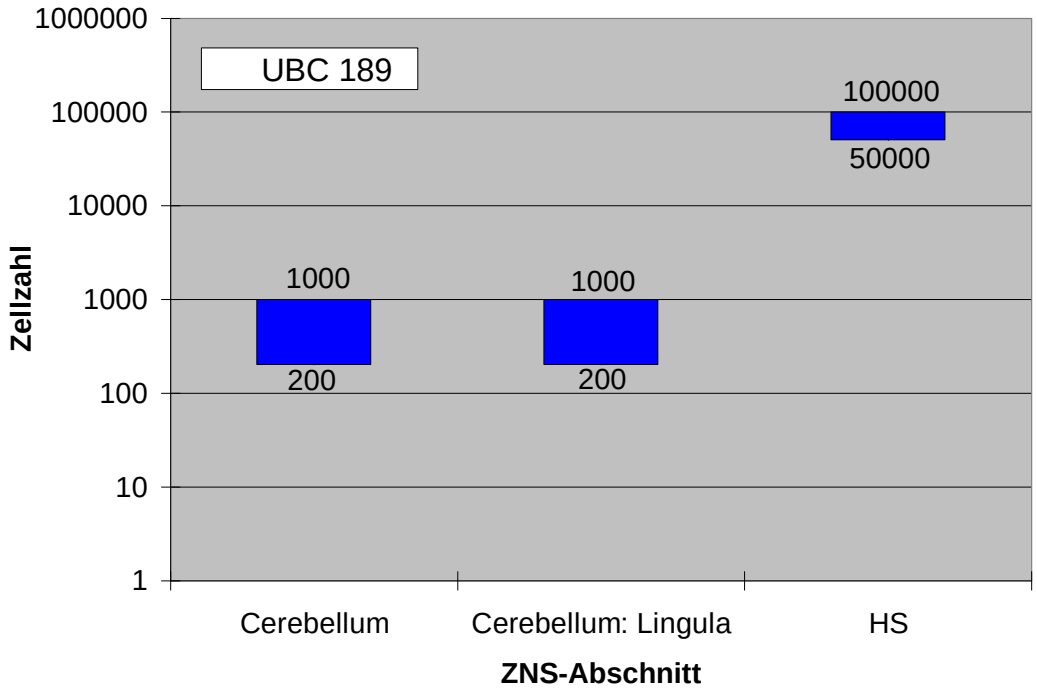


Abbildung 42: Hirnstamm mit transplantierten Hoechst 33342-markierten UBC (umbilical cord blood cells) im Zentralkanal und Gewebe sowie des Kleinhirns mit intraparenchymal perlschnurartig aufgereihten, transplantierten, Hoechst 33342-markierten UBC (Nabelschnurblutzellen)

Ebenfalls hervorzuheben ist die Tatsache, dass bei dem Tier „UBC 189“ auch Bereiche des Hirnstamms massenhaft Zellen mit intraparenchymaler Lage aufwiesen, obwohl dies bei keinem der zwölf Tiere auftrat, denen nur 100.000Zellen transplantiert wurden.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass in einer Serie aufeinander folgender Schnitte an nahezu gleicher Position ein Gewebsdefekt zu sehen ist, der auf einen Stichkanal hindeuten könnte. Dieser Verdacht wird durch die Zellverteilung im Hirnstamm erhärtet, da die Mehrheit der Zellen in naher Umgebung dieses Gewebsdefekts zu finden ist. Aber es besteht auch die Möglichkeit, dass es sich hierbei lediglich um ein Schnittartefakt handelt (s. Abbildung 42).



UBC 189: Name des Versuchstieres HS: Hirnstamm ZNS: Zentrales Nervensystem

Abbildung 43: Anzahl transplantierter Zellen mit intraparenchymaler Lage im Cerebellum zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion von 750.000 hUBC (humane Nabelschnurblutzellen) [Angabe in Form von Zellzahlbereichen, in welche die durch eine Hochrechnung (Faktor 15, da nur auf jedem 15.Schnitt die Zellzahl gezählt wurde) ermittelten Werte fallen]

4.) Diskussion

Zellmarkierung

Es gibt viele verschiedene Möglichkeiten, Zellen nach ihrer Transplantation im Empfänger- Organismus zu identifizieren.
Die wohl zuverlässigsten Systeme sind jene, die über den Nachweis endogener Marker der transplantierten Zellen (z.B. human nuclear antigen) funktionieren **[67]**. So können Zellen allogener oder xenogener Transplantate über art- bzw. geschlechts-spezifische Antigene **[68] [108] [47][174] [96] [175]** und männliche Spenderzellen in einem weiblichen Empfänger über bestimmte Sequenzen des Y-Chromosoms **[56] [119]** identifiziert werden. Eine weitere solche, häufig angewendete Möglichkeit (s.u) ist es, bestimmte „Reporter-Gene“ (z.B. green fluorescence protein) in eine zu transplantierende Zellpopulation einzubringen **[35] [44] [132].**
Es existiert aber auch die Möglichkeit, exogene Marker auf zu transplantierende Zellen zu übertragen. So kann sowohl das Zytoplasma (z.B. mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE) **[28] [122],** als auch die Zellmembran (z.B. mit dem Fluoreszenzfarbstoff PKH26) **[64]** sowie der Zellkern (BrdU, HOECHST 33342, HOECHST 33258) **[97] [20] [6] [43] [118]** markiert werden.
In jüngeren Studien wurde der Nachweis transplantierter Zellen meist über die Übertragung der Gene für ß-Galactosidase **[2]** bzw. „green fluorescence protein“ (GFP) **[19] [31] [63] [2] [133]** mittels bestimmter Vektoren auf Spenderzellen bzw. Spendertiere geführt oder es wurde den Spendertieren Bromodeoxyuridin (BrdU) **[65][86] [94] [136]** zur Zellmarkierung injiziert. Es ist aber schon von einem zunehmenden Verlust der BrdU-Markierung in proliferierenden MSC berichtet worden und die Technik eines Gentransfers ist ebenso aufwendig und schwierig wie ein Nachweis des Y-Chromosoms männlicher Spenderzellen mittels in situ Hybridisierung in einem weiblichen Empfänger-Organismus **[27] [38] [113] [114] [167]**.
Die wohl eleganteste Methode für den Nachweis transplantierter Zellen ist die Magnetresonanztomographie (MRT). Dazu werden die zu transplantierenden Zellen mittels ferromagnetischer Partikel markiert **[23][173]**. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die im MRT gemessene Verteilung der Zellen jener, die mittels herkömmlicher

Histologie ermittelt wurde, sehr gut entspricht **[115].** Der entscheidende Vorteil der MRT ist aber, dass bei dieser sensitiven Methode die Tiere für eine Messung nicht getötet werden müssen, und so mehrere Messungen an ein und demselben Tier im zeitlichen Verlauf durchgeführt werden können. Auf der anderen Seite ist das deutlich geringere Auflösungsvermögen der MRT im Vergleich zur Histologie limitierend. Trotzdem wäre dieses Verfahren für zukünftige Studien sehr interessant.

Wir haben uns dafür entschieden, bei jenen Tieren, die zehn Tage nach Transplantation getötet werden sollten, den Nachweis unserer vier zu transplantierenden Stammzellpopulationen über den exogenen Marker HOECHST 33342 durchzuführen.
HOECHST 33342 ist ein weit verbreiteter Marker **[6] [43] [118] [153] [154] [134]**, mit dessen Hilfe auf einfache Weise das Schicksal transplantierter Zellen nachvollzogen werden kann **[91] [92] [86]**.
Er kann zwar aberrante Mitosen verursachen und besitzt eine gewisse Zytotoxizität auf lebende Zellen **[62],** doch fällt diese schwach aus, so dass nur wenige der transplantierten Zellen an dieser zugrunde gehen dürften **[91]**. Entsprechend dieser Annahme wurde in Vorversuchen über einen Zeitraum von 2 Wochen nach HOECHST-Markierung nur eine geringe Zunahme der Apoptoserate von MNSC festgestellt.
Eine Hauptsorge bei exogenen Markern - wie HOECHST 33342 - ist, dass der Marker durch Zellteilung aus seiner Bindung gelöst werden könnte oder dass er aus der Zelle diffundieren und dann von einer anderen Zelle erneut aufgenommen werden könnte **[15] [57] [153]**. Die Folge wären falsch-positiv HOECHST 33342-gefärbte Zellen des Empfänger-Gewebes **[67].**
Sprick konnte jedoch 1991 zeigen, dass HOECHST 33342 für mindestens zwei Monate in markierten Zellen verweilt ohne an Gehirngewebe abgegeben zu werden **[153].**
Auch die Möglichkeit, dass dieser Marker von sterbenden, transplantierten Zellen abgegeben und von umliegenden Zellen aufgenommen wird, ist sehr gering. Erstens sterben aufgrund der geringen Zytotoxizität nur wenige der transplantierten Zellen **[91]** und zweitens ist eine erneute Verteilung des Stoffes von einer Zelle auf eine andere aus pharmakokinetischen Gründen unwahrscheinlich **[121]**.
Hinzu kommt, dass die HOECHST 33342-markierten Zellen klar voneinander und zu Zellen des Empfänger-Gewebes abgrenzbar sind. Würde HOECHST 33342 aus lebenden oder toten transplantierten Zellen abgegeben, wäre eine Markierung der umliegenden Zellen, bei intraparenchymaler wie subduraler Lage, zu erwarten. Dies konnte aber von uns

nicht beobachtet werden. Hinzu kommt, dass die MSC und die MNSC nach ihrer Markierung für 24 Stunden in einem neuen Medium ohne HOECHST 33342 inkubiert wurden, um eine übermäßige Abgabe des Stoffes nach der Transplantation der Zellen zu vermeiden.

Immunhistologie

Die Immunhistologie sollte zur Verifizierung der Verteilung der HOECHST 33342-markierten Zellen dienen. Dabei kam ein Antikörper gegen „human nuclear antigen“ (HuNu; Chemicon) zum Einsatz. Mit diesem Antikörper sollte auch die Zellverteilung bei jenen Tieren, die 65 Tage nach der Transplantation getötet wurden, dargestellt werden. Denn bei diesen Versuchstieren wurde bewusst auf eine Markierung der transplantierten Zellen mit HOECHST 33342 verzichtet, da eine eventuelle Abgabe dieses Stoffes aus markierten Zellen **[67]** und eine Summation des schwach zytotoxischen Effekts **[91]** über einen so langen Zeitraum nicht abzusehen sind.
Des Weiteren sollte die Immunhistologie die Frage klären, in welche Richtung und in wie weit sich die transplantierten Zellen *in vivo* differenziert haben. Denn wie beschrieben gibt es Hinweise darauf, dass sich MSC, UBC und die proneural konvertierten UNSC und MNSC *in vitro* wie auch *in vivo* ektodermal bzw. neural differenzieren können **[19] [38] [73] [86] [113] [141] [170] [47] [59] [83] [152] [174] [143] [175] [54] [143] [142] [13] [24]**.
Um dies zu klären, kamen Antikörper gegen Zelltyp-spezifische Antigene – wie GFAP für Astrozyten oder ß-Tubulin für Neurone- zur Anwendung.

Der wohl wichtigste Faktor für das Gelingen der Immunhistologie ist die Präparation und die Fixation des Gewebes, da diese zu einem Verlust der Antigenität des zu färbenden Gewebes führen kann **[8] [145] [168].**
Wir haben uns für die transkardiale Perfusion mittels Paraformaldehyd (PFA) und die anschließende Nachfixation der gesamten Maus über Nacht bei 4°C entschieden. Erstens weil dies eine Standardmethode vor Durchführung der Immunhistologie ist **[96] [49][91][92][14] [144][172] [157]** und zweitens weil eine gute Fixierung des Gewebes für die Durchführung der „Dura-Präp“ von essentieller Bedeutung ist.

Nachdem der immunhistologische Nachweis der transplantierten Zellen mit dem Antikörper gegen „human nuclear antigen“ trotz zahlreicher, unterschiedlicher Färbeprotokolle **[84] [140] [155] [49][174] [96] [175] [157]** und „antigen retrieval“-Techniken **[129]** nicht funktionierte, haben wir dies auf eine zu starke Fixierung zurückgeführt, zumal die Hintergrundfluoreszenz des Gewebes stark ausgeprägt war und alle verwendeten Antikörper *in vitro* gute Ergebnisse erbracht haben. Diese Vermutung wurde dadurch gestützt, dass wir bei *in vitro*-Färbungen von MNSC mit dem Antikörper gegen „human nuclear antigen“ zeigen konnten, dass die Färbung der Zellen mit zunehmender Fixationsdauer stark abnimmt. So war die Intenität der HuNu-Färbung nach 24-stündiger Fixierung mit 2% PFA nur sehr gering im Vergleich zu einer Färbung nach 15-minütiger Fixierung. Die Färbung des Gewebes z.B. mit Antikörpern gegen ß-Tubulin oder GFAP hat hingegen funktioniert.

Es ist bekannt, dass Formalaldehyd –insbesondere bei langer Fixation- die 3D-Struktur von Proteinen verändern und so die Epitope mancher Antigene verdecken kann **[111] [168].** So haben Zhao et al. 2003 vermutet, dass die von ihnen transplantierten, humanen Knochenmarkstammzellen ihre Antigentät verloren haben, weil die antigenen Epitope durch eine Formaldehyd-Perfusion verletzt worden seien **[174]**. Darum empfehlen sie, das Gewebe so rasch wie möglich zu entnehmen, ohne zuvor eine Fixierung bzw. Perfusion durchzuführen. Dies war uns nicht möglich, da die „Dura-Präp“ für unsere Studie zwingend erforderlich war und sich diese nicht in entsprechender Weise ohne eine vorhergehende, transkardiale Perfusion mit Formaldehyd durchführen lässt.

Selbst die Verwendung von 2% PFA - statt der üblichen 4% PFA - brachte keinen entscheidenden Vorteil, außer dass die HOECHST 33342-markierten Zellen dank der verminderten Hintergrundfluoreszenz besser zu identifizieren waren. So gelang auch hier nur die immunhistologische Färbung des Emfänger-Gewebes, nicht aber der Nachweis der transplantierten Zellen.

Auch nach der schwächeren Fixierung mit 2% PFA blieben sämtliche durchgeführten „antigen retrieval“-Techniken in puncto HuNu-Färbung wirkungslos. Selbst die Verwendung von EDTA statt des geläufigeren Citrats **[172]** im Wasserbad bzw. in der Mikrowelle brachte keinen Vorteil, obwohl EDTA bei nukleären Antigenen -wie dem „human nuclear antigen“- dem Citrat deutlich überlegen ist **[129]**.

So blieben unsere Versuche, die Differenzierung der transplantierten Zellen *in vivo* zu verfolgen, ohne Ergebnis und es konnte auch die Zellverteilung 65 Tage nach Transplantation nicht ermittelt werden.

Transplantationstechnik: Injektion in die Cisterna magna

Die Techniken zur Transplantation von Zellen bei traumatischen und neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS reichen von schwach invasiven (intrathekal lumbal) bis hin zu stark invasiven (intracerebral, intraspinal) Formen.

Eine Möglichkeit zur Zelltransplantation ist es, die Zellen direkt in das betroffene Gewebe zu injizieren. Dies ist auch in beinahe jedem Bereich des ZNS möglich. So wurden bereits Zellen direkt in den Cortex (intracerebral) **[174],** ins Striatum **[14] [91] [92]** oder ins Rückenmark (intraspinal) **[96] [81] [63]** transplantiert. Diese doch recht invasiven Techniken sind aber bei der ALS wenig sinnvoll, da bei der ALS Areale in Cortex, Hirnstamm und Rückenmark befallen sind und somit zahlreiche Injektionen durchgeführt werden müssten. Trotzdem wurden bereits 2003 *in vitro* gezüchtete Knochenmarkzellen bei sieben ALS-Patienten in die chirurgisch freigelegten thorakalen Rückenmarksegmente T7-9 injiziert **[109].**

Eine weitere, häufig angewandte Technik der Zelltransplantation in Tiermodellen ist die intravenöse Applikation von Zellen wie UBC oder MSC. Dabei ist die Punktion der Schwanzvene bei Mäusen **[133] [73] [38] [19] [144]** wesentlich häufiger anzutreffen als die der Jugularvene **[49].** Beinahe ebenso häufig wie die intravenöse Applikation wird die intraperitoneale Injektion von Stammzellen angewendet **[113] [31] [2]**. Die intraarterielle Applikation spielt hingegen eine untergeordnete Rolle **[102].**

Die Problematik bei diesen Transplantationstechniken (i.p., i.v., i.a.) ist, dass die transplantierten Zellen erst die Blut-Hirn-Schranke überwinden müssen, um in das zentrale Nervensystem gelangen zu können. Auf diesen Sachverhalt haben Jiang et al. das Fehlen einer ZNS-Ansiedlung ihrer intravenös applizierten Knochenmarkstammzellen zurückgeführt **[73].**

Dennoch konnte in einigen Studien eine Ansiedlung intraperitoneal oder intravenös applizierter Zellen im ZNS beobachtet werden. Allerdings sind dies zumeist Studien, bei denen die Zellen in neugeborene Tiere oder in zuvor bestrahlte Tiere transplantiert wurden **[113] [19] [2] [31] [38] [133]**, so dass hier kaum eine intakte Blut-Hirn-Schranke vorgelegen haben dürfte **[73].**

Aufgrund dieser Problematik scheint eine intrathekale Applikation von Zellen bei neurodegenerativen Erkrankungen -wie der ALS- die bessere Wahl zu sein, zumal vermutet wurde, dass über den Liquorfluss eine weite Verbreitung der Zellen möglich sei.

So ist eine gängige Möglichkeit zur intrathekalen Transplantation von Zellen deren intracerebroventrikuläre Injektion in die Seitenventrikel **[86] [23] [136] [157] [172].** Ein Nachteil dieser Technik ist deren Invasivität, denn bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen wie der ALS könnte eine wiederholte Injektion von Zellen erforderlich sein. Hinzu kommt, dass man die Seitenventrikel nicht unter Sicht punktieren kann und somit auf stereotaktische oder bildgebende Hilfen angewiesen ist. Mit diesen im Tierversuch standardisiert zu arbeiten, kann aufgrund einer unterschiedlichen Kopfgröße, Kopfform oder aufgrund unterschiedlicher genetischer Zuchtlinien der Tiere schwierig sein.
Eine weitere Möglichkeit zur intrathekalen Applikation wäre die Zellinjektion mittels Lumbalpunktion. Diese Technik scheint aber anderen unterlegen zu sein, obwohl sie zu den wenig invasiven Techniken zählt, da der Injektionsort eher „am kaudalen Ende der CSF- Zirkulation“ steht. Hinzu kommt, dass eine Lumbalpunktion zumindest im Tiermodell, insbesondere bei der Maus, technisch schwierig durchzuführen ist.

Für unsere Studie schien die Transplantation der Zellen in die Cisterna magna am besten geeignet zu sein, da sie unsere Forderungen gut erfüllt.
Zum einen ist es möglich, die Cisterna magna wiederholt durch die Membrana atlantooccipitalis zu punktieren **[112]**, was –wie oben erwähnt- bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen vermutlich erforderlich ist. Zum anderen nimmt die Cisterna magna im Liquorsystem eine zentrale Lage ein, da sie am Übergang vom Subarachnoidalraum des Gehirns zu dem des Rückenmarks liegt sowie über das Foramen Magendii direkten Kontakt zum inneren Liquorraum besitzt. So scheint eine ausgedehnte Verteilung der transplantierten Zellen im ZNS über den Liquor möglich zu sein, was zur Entfaltung ihrer neuroprotektiven Wirkung erforderlich ist. Weitere Vorteile der Cisterna magna-Punktion sind, dass kein Nervengewebe verletzt wird - sie also wenig invasiv ist- und dass sie sowohl am Menschen (Subokzipitalpunktion) wie auch an Primaten **[74],** Ratten **[65] [173] [71] [165]** oder Mäusen **[161] [159]** durchgeführt werden kann. So konnten über diesen Zugangsweg in der Vergangenheit schon mehrfach erfolgreich Zellen in Tiermodelle für traumatische Gehirnverletzungen **[65]**, für Rückenmarkverletzungen **[171]** oder für Schlaganfälle **[173]** transplantiert werden.
Die Cisterna magna-Punktion kann dabei prinzipiell perkutan durchgeführt werden, um den Gewebeschaden so gering wie möglich zu halten **[173] [159]**. Da wir absolut sicher sein wollten, dass die Zellen ausschließlich in die Cisterna magna appliziert werden, wurde die Membrana atlantooccipitale chirurgisch frei präpariert und unter Sicht punktiert **[161]**.

Außerdem war es so möglich, die Lage der Nadelspitze in der Cisterna magna durch die durchsichtige Membran hindurch zu kontrollieren, um eine Verletzung des ZNS-Gewebes, insbesondere des Hirnstamms, zu verhindern.

Ein großer Nachteil dieser Injektionstechnik ist, dass es zu einem schwer zu kontrollierenden Ausströmen von transplantierten Zellen aus der Cisterna magna kommen kann. Aufgrund dieser Problematik musste bereits eine Arbeitsgruppe **[120]** die Applikationsweise auf eine intracerebroventrikuläre Injektion der Zellen umstellen. Und eben dieses Problem trat bei unseren Probetransplantationen auf, als wir die Cisterna magna-Punktion so durchgeführt haben wie sie schon in der Vergangenheit zur Gewinnung von Liquorproben bei Mäusen angewandt wurde. **[161]**.

Den Ausstrom an Liquor, der zahlreiche soeben transplantierte Zellen enthielt, haben wir dabei auf die beiden folgenden Punkte zurückgeführt.

Erstens ist zu vermuten, dass das bei der Transplantation zusätzlich ins Liquorsystem applizierte Volumen einen Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) bewirkt. Schließlich wurden 10µl Zellsuspension in 10 Minuten appliziert, was bei einem Gesamt-CSF-Volumen der Maus von etwa 35µl sehr viel ist **[125]**. Um dies zu kompensieren, hätte die übliche CSF-Resorptionsquote schlagartig um ein Vielfaches ansteigen müssen, um den ICP trotz dieses zusätzlichen Volumens konstant zu halten.

Zweitens wurde dieser Effekt wohl noch durch die Schwerkraft verstärkt, da die Einstichstelle in die Cisterna magna nicht die am höchsten gelegene Stelle des Schädels darstellte, sondern eine eher tief liegende Position einnahm. Eine solche Schädelposition eignet sich sehr gut dazu Liquor zu gewinnen, da man die Schwerkraft als treibende Kraft für den Liquorefflux ausnutzen kann. Für eine Applikation von Zellen in die Cistern magna ist sie aber ungeeignet, da hier ein Efflux unbedingt zu vermeiden ist. Man muss also in puncto Schädelposition - entgegen sonstiger Angaben **[71] [165]** -sehr wohl unterscheiden, ob man die Cisterna magna punktiert, um Liquor zu gewinnen **[161]** oder um Zellen zu transplantieren **[65] [173] [171]**.

Darum haben wir uns auf Anraten des polnischen Neurochirurgen Miroslaw Janowski dazu entschieden, bei den Transplantationen den Mausschädel so zu positionieren, dass die Cisterna magna die höchst gelegene Stelle des Schädels einnimmt. Dies stellt eine Analogie zur humanen Neurochirugie dar, denn hier ist es üblich, dass das Operationsfeld ebenfalls die höchste Position einnimmt.

Aus dieser Maßnahme resultierte eine „Concorde-artige Haltung“ des Mausschädels gegenüber der Körperlängsachse (s. Abbildung 8), die den Einfluß der Schwerkraft auf ein Minimum reduziert und so ein Ausströmen von Zellen in hohem Maße unterbindet **[69].**
Dem Anstieg des Liquordruckes wurde durch diese „Concorde-artige Haltung“ zwar nicht entgegen gewirkt, aber durch die folgenden beiden Maßnahmen konnte dieser minimiert werden.
Erstens führte die besondere Punktionstechnik (s. Abbildung 9/Kapitel 2.5.2), bei der es einer geringen Menge Liquor erlaubt wird, über den Nadelschliff bzw. die Nadelspitze abzufließen, vor der Stammzell-Injektion zu einer Volumenentlastung.
Zweitens befand sich durch die neue Schädelposition die atlanto-okzipitale Membran in der Horizontalen, so dass es möglich war, einen großen Tropfen PBS über der Cisterna magna und somit über der Einstichstelle zu platzieren. Dieser große Tropfen PBS übte während und nach der Transplantation der Zellen genügend Druck auf die Injektionsstelle aus, so dass er einem Efflux von Liqour mitsamt soeben transplantierter Zellen entgegenwirken konnte. So enthielten Proben, die nach erfolgter Transplantation aus diesem großen Tropfen entnommen wurden, nur vereinzelt markierte Zellen, was aufzeigt, dass die Diffusion zwischen dem Liquor und dem PBS-Tropfen und somit der Zellverlust sehr gering war.

Immunsuppression mit Cyclosporin A bei xenogener Transplantation

Da in unserer Studie humane Stammzellen in SOD1-Mäuse intrathekal transplantiert wurden, hätte dies vermutlich zu einer Abstoßungsreaktion gegen das Transplantat geführt. Darum haben wir alle Versuchstiere ab ihrem 44.Lebenstag –also ab einem Tag vor der Transplantation- mit Cyclosporin A (CsA) behandelt, das sowohl bei allogenen als auch bei xenogenen Transplantationen als Immunsuppressivum zum Einsatz kommt **[2] [50] [49][14] [96][144]**.
Aus Gründen des Tierschutzes, der Infektionsgefahr und der Handhabung haben wir uns dazu entschlossen, das CsA über das Trinkwasser **[17]** -statt wie üblich mittels intraperitonealer bzw. subkutaner Injektion **[49] [14] [96]** oder mittels Schlundsonde **[88]**- zu verabreichen. Denn die CsA-Gabe sollte täglich bis zum Tod der Tiere erfolgen und es war zu vermuten, dass in der Gesamtstudie der Großteil der Tiere nach der Transplantation noch weitere 80 bis 90 Tage (Lebenszeit-Studien) leben würde.

Um die geeignete orale Dosis pro Tag (40mg CsA/kg KG/Tag) zu ermitteln, hatten wir zunächst in einem Vorversuch den CsA-Blutspiegel der üblichen i.p.-Dosis von 10mg/kg KG/Tag **[49]** und die Wirkstoffspiegel verschiedener oraler CsA-Dosen im zeitlichen Verlauf bestimmt und anschließend verglichen **[55]**.

In der gesamten Studie wurde das Produkt „Sandimmun Optoral Lösung“ der Firma Novartis eingesetzt. Dabei handelt es sich um in Liposomen eingebettetes CsA, welches wir in einer Apfelsaft-Wasser-Mischung gelöst hatten und den Tieren über Trinkflaschen angeboten haben. Der Vorteil dieses Produktes gegenüber der reinen Substanz ist, dass es eine erhöhte Bioverfügbarkeit, ein gleichmäßigeres Resorptionsprofil sowie eine geringere Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme und dem biologischen Tagesrhythmus besitzt **[40].**

Von entscheidender Bedeutung bei der oralen Applikationsweise ist auch die Kenntnis, dass die Trinkmenge der SOD1-Tiere über den gesamten Krankheitsverlauf konstant bei etwa 6ml/Tag liegt (bekannt aus eigenen, früheren Studien). Denn eine konstante, tägliche CsA-Einnahme ist Voraussetzung für einen konstanten Wirkstoffspiegel. Mit diesem Wissen ließ sich die benötigte CsA-Konzentration in der Apfelsaft-Wasser-Mischung berechnen.

Je nachdem was in einer Studie untersucht wird (Lebenszeiten, Laufradaktivität oder Histologie), kann es sinnvoll sein, eine CsA-Kontrollgruppe einzuführen, denn CsA kann bei einer geschädigten Blut-Hirn-Schranke selbst neuroprotektiv wirken **[79] [22] [89] [158].**

So haben auch wir in unserer Gesamtstudie eine CsA-Kontrollgruppe mit untersucht, auf die aber in dieser Disseration nicht eingegangen wurde, da den Tieren dieser Kontrollgruppe keine Zellen injiziert wurden.

Verteilung der transplantierten Stammzellen im ZNS und in seinen Liquorräumen zehn Tage nach Cisterna magna-Transplantation

In den vier Transplantationsgruppen sollte die Verteilung der transplantierten Stammzellen im ZNS und in seinen Liquorräumen untersucht werden. Um dabei den zeitlichen Verlauf beurteilen zu können, wurden 10 und 65 Tage nach der Cisterna magna-Transplantation der Zellen jeweils drei Tiere pro Transplantationsgruppe zur histologischen Untersuchung getötet.

Um die Zellen im Wirts-Organismus detektieren zu können, wurden den Tieren, die 10 Tage nach der Transplantation getötet wurden –wie oben beschrieben- HOECHST 33342-markierte Zellen transplantiert.
Bei jenen Tieren, die 65 Tage nach der Transplantation getötet wurden, wurde auf eine Markierung der transplantierten Zellen mit HOECHST 33342 aus den oben beschriebenen Gründen verzichtet. Hier sollte der Nachweis der Zellen über eine immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen „human nuclear antigen“ (HuNu) erfolgen.

Zehn Tage nach der Transplantation zeigte sich in den vier Transplantationsgruppen MSC, MNSC, UBC und UNSC ein ähnliches Verteilungsmuster der transplantierten Zellen. Im Subarachnoidalraum des Gehirns wurden transplantierte Zellen auf der ventralen und z.T. auch auf der dorsalen Oberfläche der Bulbi olfactorii gefunden, sowie in der Fissura longitudinalis cerebri zwischen den beiden Bulbi. Die Mehrzahl der Zellen wurde aber in den basalen Zisternen des Subarachnoidalraum gefunden, die sich vom Bulbus olfactorius ventral des Gehirns nach kaudal erstrecken. Sie stehen um den Hirnstamm herum mit der Cisterna magna in Verbindung, wobei diese insgesamt am meisten Zellen enthielt. Auf der Konvexität des Großhirns konnten hingegen in keinem der zwölf Tiere transplantierte Zellen nachgewiesen werden. Dieser Sachverhalt wurde schon in anderen Studien über Cisterna magna-Zelltransplantationen beobachtet **[65]**.
Im Subarachnoidalraum des zervikalen Rückenmarks fanden sich nur vereinzelt Zellen und je kaudaler die Schnitte angefertigt wurden, desto seltener wurden Zellen gefunden. Dies spricht dafür, dass auch in den hier nicht untersuchten, weiter kaudal gelegenen thorakalen, lumbalen und sakralen Rückenmarkabschnitten kaum transplantierte Zellen anzutreffen sind.
Im IV. Ventrikel und seinen Recessus laterales konnten in allen vier Gruppen relativ wenig Zellen nachgewiesen werden, obwohl sie über das Foramen Magendii und die Foramina Luschkae in engem Kontakt mit der Cisterna magna stehen **[11] [78] [51] [123] [163] [87].**
Ansonsten wurden in keinem anderen Abschnitt des inneren Liquorsystems -also auch nicht im Zentralkanal- Zellen entdeckt. Diese Verteilung im inneren Liquorraum lässt sich vermutlich durch den Liquorfluß erklären, der einer Verbreitung der transplantierten Zellen im inneren Liquorraum entgegenwirkt (s. Abbildung 5). Dass einige Zellen in den IV.Ventrikel gelangt sind, ist am ehesten auf die Strömung, die bei der Injektion der Zellen entstanden ist, zurückzuführen.

Insgesamt spricht dieses Verteilungmuster im Liquorsystem zehn Tage nach der Transplantation für eine passive Ausbreitung der Zellen, die durch den injektionsbedingten Liquorstom und durch das Einwirken des natürlichen Liquorflusses sowie der Schwerkraft nach erfolgter Cisterna magna-Injektion, beeinflusst wird. Gegen eine aktive Ausbreitung der Zellen spricht vor allem die Tatsache, dass kaum eine Ausbreitung der Zellen entgegen des Liquorstroms in den inneren Liquorraum hinein stattgefunden hat.

Obwohl sich das eben geschilderte Verteilungsmuster der transplantierten Zellen im Liquorraum in den vier verschiedenen Transplantationsgruppen stark ähnelt (s.o.), unterscheiden sich die Ergebnisse der vier Gruppen in zwei Punkten deutlich voneinander.

Zum einen waren die gefundenen Zellzahlen in den Transplantationsgruppen MSC und MNSC 10 Tage postoperativ wesentlich höher als in den Gruppen UBC und UNSC. Worauf diese Unterschiede zurückzuführen sind ist unklar. So könnten die UBC und die aus ihnen entwickelten UNSC empfindlicher gegenüber dem relativ geringen Nährstoffangebot des Liquors **[149]** oder gegenüber einer Abstoßungsreaktion sein. So wurde bereits berichtet, dass ins ZNS transplantierte Zellen trotz Immunsuppression einem apoptotischen Zelltod unterliegen können **[96]**. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die UBC und UNSC z.B. aufgrund ihrer geringeren Größe oder aufgrund einer geringeren Expression von Adhäsionsmolekülen besser mit dem Liquor resorbiert werden könnten.

Zum anderen fiel auf, dass keine UBC und UNSC mit intraparenchymaler Lage gefunden wurden. In den beiden Transplantationsgruppen MSC und MNSC wurden jedoch jeweils bei zwei Tieren transplantierte Zellen im Kleinhirn nachgewiesen (100-1000 MSC bzw. >2000 MNSC pro Tier), die sich anscheinend entlang der Purkinje-Zellschicht aufgereiht hatten. Dies war aber stets auf jene Kleinhirnbereiche beschränkt, die unmittelbar an die Cisterna magna angegrenzten und ist bei keinem der Tiere aufgetreten, die in Vorversuchen bereits einen Tag nach der Transplantation zur histologischen Untersuchung getötet worden waren (Daten nicht gezeigt). Als Erklärung dieses Phänomens sind in der Literatur sowohl eine de novo-Bildung von Purkinje-Zellen aus transplantierten Zellen **[133]** wie auch eine Fusion von Purkinje-Zellen mit zuvor transplantierten Zellen beschrieben worden **[2][167] [31]**. Eine de novo-Bildung der sehr großen und komplexen Purkinje-Zellen innerhalb von 10 Tagen ist hier allerdings höchst unwahrscheinlich. Dagegen ist eine Fusion von Stammzellen schon mit verschiedenen Zelltypen beschrieben worden **[16] [156]**, wobei das Potential

zur *in vivo*-Fusion transplantierter Stammzellen mit Purkinje-Zellen aufgrund der enormen Fähigkeit der Purkinje-Zellen zur Endozytose als besonders hoch eingeschätzt wird **[27]**. Allerdings ergab eine Studie, dass nur ein sehr geringer Anteil (0,1%) transplantierter Knochenmarksstromazellen mit Purkinje-Zellen fusioniert **[167]**.

Um die Frage der Zellfusion zu klären, haben wir mittels immunhistologischer Färbung (ß-Tubulin) die Lagebeziehung der transplantierten Zellen zur Purkinje-Zellschicht untersucht. So konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der HOECHST 33342-markierten Zellen schon die Purkinje-Zellschicht durchwandert hat und am Rande der Körnerzellschicht (Stratum granulosum) -d.h. in unmittelbarer Nähe der Purkinje-Neurone- linear aufgereiht zum Liegen gekommen war (s. Abbildung 36 b-e).

Diese intraparenchymale Verteilung der MSC und MNSC im Cerebellum und die Tatsache, dass diese erst zehn Tage - und nicht schon einen Tag - nach der Transplantation aufgetreten ist, spricht für eine aktive intraparenchymale Migration der MSC und MNSC. So wurde schon in früheren Studien beobachtet, dass transplantierte MSC und andere Stammzelltypen die Fähigkeit zur Migration ins ZNS-Gewebe besitzen **[4] [86] [65] [106].** Es wird angenommen, dass die multipotenten Zellen dabei auf bestimmte, lokale Signale reagieren und je nach Signal bzw. umgebendem Gewebe auf eine bestimmte Weise proliferieren, differenzieren oder auch migrieren **[73][167][157][19]**. Eine Migration transplantierter Stammzellen wurde bisher vor allem entlang etablierter Routen im ZNS **[136]** und in Regionen geschädigten Gewebes beobachtet **[93] [82] [103].** Letzteres wird bei Knochenmarkstromazellen v.a. auf einen lokal gesteigerten Spiegel chemotaktischer Faktoren zurückgeführt **[164].**

Die lineare Anordnung der transplantierten Zellen kommt vermutlich dadurch zustande, dass die MSC und MNSC die zellarme Molekularschicht des Kleinhirns gut durchwandern können und dann auf die zellreiche, dicht gepackte Körnerzellschicht **[76]** treffen, die als mechanische Barriere wirkt.

Eine solche Verteilung in den Kleinhirn-Zellschichten wurde für intraventrikulär transplantierte MSC bereits beschrieben **[86].** Damals konnte keine Co-Lokalisation von transplantierten MSC mit Purkinje-Neuronen beobachtet werden, die als Hinweis für eine Fusion dienen konnte.

In unseren Färbungen kam es jedoch sehr vereinzelt zu einer Korrelation von Purkinje-Zellen mit HOECHST 33342-markierten Stellen. Zwar ist aufgrund der sehr dünnen Schnittdicke von 12µm eine durch Überlagerung verschiedener Zellschichten bedingte Korrelation unwahrscheinlich, aber nicht auszuschließen. Somit konnten wir keinen

eindeutigen Beweis für eine Fusion zwischen den prominenten Purkinje-Zellen und den transplantierten MSC bzw. MNSC erhalten. Jedoch kann es auch nicht ausgeschlossen werden, dass solche Fusionen vereinzelt stattgefunden haben.

Darüber hinaus wurden in keinem anderen Abschnitt des ZNS transplantierte Zellen mit intraparenchymaler Lage entdeckt, auch nicht im Hirnstamm, der ebenfalls wie das Kleinhirn an die Cisterna magna angrenzt.

Insgesamt unterscheidet sich die Zellverteilung zehn Tage nach Cisterna magna-Injektion auch maßgeblich von jenen Zellverteilungen, die bei anderen Transplantationstechniken beschrieben worden sind.

So konnten nach intraperitonealer bzw. intravenöser Injektion von Knochenmarkzellen in beinahe allen Bereichen des ZNS -einschließlich des Cortex und des Rückenmarks- transplantierte Zellen nachgewiesen werden **[31] [113][19][38]**. Dabei haben Mezey und Eglitis berichtet, dass die Dichte der transplantierten Zellen im Gewebe mit der Kapillardichte der jeweiligen Hirnregion korreliert **[38]**. Auffällig ist bei diesen beiden Transplantationsweisen auch, dass die im ZNS nachweisbare Anzahl transplantierter Zellen mit zunehmender Zeit ansteigt, was vermutlich damit zu tun hat, dass diese erst noch die Blut-Hirn-Schranke überwinden müssen **[133] [38]**. Bei einer intrathekalen Injektion von Zellen ist hingegen mit einer Abnahme der Zellzahl im ZNS im Laufe der Zeit zu rechnen. Dies könnte sowohl auf eine Resorption der Zellen mit dem Liquor **[146] [151] [116] [123] [80] [74] [75]** als auch auf einen zunehmenden Zelltod im nährstoffarmen Liquor **[149]** zurückgeführt werden.

Aus therapeutischer Sicht sind an der von uns 10 Tage nach der Transplantation beobachteten Zellverteilung noch einige Punkte besonders interessant:

Erstens wurde zwar eine weite Verteilung der transplantierten Zellen im Subarachnoidalraum des Gehirns erreicht, doch wurden kaum Zellen in Bereichen wie dem motorischen Cortex und dem Rückenmark gefunden, die bei der ALS vorwiegend betroffen sind. Eine gezielte Migration der verschiedenen Stammzellpopulationen in geschädigte ZNS-Areale scheint in unserer Transplantationsstudie also nicht aufgetreten zu sein. Eine solche Migration konnte in einem ALS-Mausmodell zwar schon für systemisch applizierte UBC nachgewiesen werden **[49]**, allerdings zeigte sich diese Fähigkeit transplantierter Stammzellen überwiegend in Tiermodellen akuter ZNS-

Schädigungen wie Schlaganfall oder traumatische Gehirn- bzw. Rückenmarkverletzung **[160] [93].**

Diese Diskrepanz lässt sich auf das spezifische Homing-Verhaltens der transplantierten Zellen zurückführen:

Zum einen gehen akute Parenchymschädigungen auch mit einer Verletzung bzw. Schädigung der lokalen Blutgefäße einher, so dass es hierdurch zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke kommt. Dies könnte es systemisch applizierten Stammzellen erleichtern, in das ZNS-Gewebe lokalisiert einzudringen **[73],** was die spezifische Ansiedlung dieser Zellen im geschädigten Gewebe erklären würde **[49]**.

Zum anderen wurde beschreiben, dass Stammzellen die Fähigkeit besitzen, auf bestimmte Reize zu reagieren und zum Ort einer Gewebeschädigung zu migrieren, was als ‚Tropismus' bezeichnet wird. Dabei werden chemotaktischen Faktoren bzw. Cytokinen wie Interleukin-1ß oder -1α als ‚Signalstoffe' des geschädigten Gewebes besondere Bedeutung zugeordnet **[107] [164].**

Zwar werden solche ‚Signalstoffe' auch im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen gebildet **[58],** doch es ist nahe liegend, dass bei akuten ZNS-Schäden eine ungleich höhere Konzentration dieser Stoffe auftritt **[144]**. Dies könnte ebenfalls erklären, warum das spezifische Homing transplantierter Stammzellen in geschädigtem ZNS-Gewebe überwiegend in Tiermodellen für Schlaganfall oder traumatische Rückenmark-/Gehirnläsion beobachtet wurde. Dass dieser Mechanismus hierbei tatsächlich eine Rolle spielt, wird dadurch erhärtet, dass Stammzellen nicht nur nach systemischer, sondern auch nach intracerebraler, intraspinaler oder intracisternaler Injektion eine selektive Migration in geschädigtes Gewebe aufweisen **[63] [65] [173]**, was nicht durch eine Ansiedlung der transplantierten Zellen über geschädigte Gefäßwände erklärt werden kann.

Dass dieses Phänomen einer gezielten Migration von Stammzellen in unserer Studie nicht aufgetreten ist, könnte sich als Hürde auf dem Weg zur kurativen Stammzelltherapie der ALS erweisen. Denn eine solche Migration wäre bei der Stammzelltherapie der ALS, bei der Cortex, Hirnstamm und Rückenmark betroffen sind, von entscheidender Bedeutung, da so multiple, intracerebrale und intraspinale Injektionen vermieden werden könnten.

Hinzu kommt, dass sich in diesen ZNS-Arealen auch keine Zellen mit intraparenchymaler Lage, sondern nur in den umgebenden Liquorräumen fanden.

Zweitens kam es aber durch die weite Verteilung der transplantierten Stammzellen zehn Tage nach ihrer Transplantation auch zwangsweise zu einer Abnahme der lokalen Zelldichte pro ZNS-Abschnitt bzw. pro Liquorraum. Dies ist aus therapeutischer Sicht

problematisch, da vermutet wird, dass in einem geschädigten Gewebe eine gewisse Mindestzahl transplantierter Zellen erforderlich ist, um z.B. über eine Abgabe neurotropher Faktoren eine symptomatische Verbesserung zu ermöglichen **[26] [144]**.
Um lokal eine möglichst hohe Zelldichte zu erreichen, ist eine Injektion der zu transplantierenden Zellen direkt ins Gewebe Mittel der Wahl **[4]**. Allerdings findet hier nur wenig Migration statt, so dass die meisten Zellen am Injektionsort und im Stichkanal gefunden werden **[4] [91] [92]**. Darum - und aus bereits oben genannten Gründen - scheint ein Einsatz dieser Transplantationsart bei der Therapie der ALS wenig vorteilhaft zu sein.

Verteilung der transplantierten Stammzellen im ZNS und in seinen Liquorräumen 65 Tage nach Cisterna magna-Transplantation

Bulte und Kollegen haben 2001 beschrieben, dass die Migration von hNSC und hMSC in den ersten beiden Wochen nach Transplantation am stärksten ist **[23]**. Dennoch wollten wir die Verteilung der transplantierten Zellen auch 65Tage nach Transplantation bestimmen, zumal gleichzeitig eine mögliche Differenzierung der transplantierten Stammzellen zu diesem Zeitpunkt erfasst werden sollte.
Leider gelang es uns nicht, die Verteilung der transplantierten Zellen 65Tage nach Transplantation zu ermitteln, da hier die transplantierten Zellen - aus den oben genannten Gründen - nicht mit HOECHST 33342 markiert waren und ein Nachweis mit dem Antikörper gegen „human nuclear antigen“ (HuNu) nicht funktionierte (s. Diskussion-Immunhistologie).

Verteilung der transplantierten Stammzellen im ZNS und in seinen Liquorräumen zehn Tage nach Cisterna magna-Transplantation von 750 000 UBC

Als Aussicht auf eine weiterführende Transplantationsstudie haben wir einer transgenen SOD1-Maus 750 000 Hoechst 33342-markierte UBC in die Cisterna magna injiziert und nach 10 Tagen histologisch untersucht. Denn es interessiert die Frage, ob sich durch eine erhöhte Anzahl intrathekal transplantierter Zellen eine andere Verteilung der transplantierten Zellen im Gehirn bzw. in den Liquorräumen ergibt. Hinzu kommt, dass Ende und Kollegen bereits eine zunehmende Lebenszeitverlängerung im SOD1-

Mausmodell beobachtet haben, wenn die Anzahl i.v.-transplantierter UBC gesteigert wurde **[39]**.

Und tatsächlich ergab sich durch die Steigerung der transplantierten Zellzahl nicht nur eine Veränderung in der Zelldichte transplantierter Zellen, sondern auch in deren Verteilungsmuster.

So wurden in den beiden Seitenventikeln vereinzelt transplantierte Zellen entdeckt. Dies war nach zehn Tagen bei keinem anderen Tier aufgetreten. Dass die Zellen über das Liquorsystem dorthin gelangt sind ist fraglich, da weder im III.Ventrikel noch in den Foramina interventricularia markierte Zellen entdeckt worden sind. Alternativ könnten diese Zellen nach ihrer Transplantation mit dem Liquor resorbiert worden sein und könnten über den Blutkreislauf und den Plexus choroideus erneut in das Liquorsystem bzw. in die Seitenventrikel gelangt sein.

Neu war auch, dass bis zu 1.000 transplantierte Zellen im kaudalen Bereich des Aquaeductus cerebri und im Recessus colliculi posterioris gefunden wurden.

Dass auch Zellen im IV.Ventrikel gefunden wurden ist hingegen nichts Besonderes, doch die enorme Zelldichte bzw. Zellzahl (>50.000) ist bemerkenswert.

Als weiteres Zeichen dafür, dass hier eine weitaus stärkere Verteilung der transplantierten Zellen im inneren Liquorraum stattgefunden hat, muss noch erwähnt werden, dass sogar im zervikalen Anteil des Rückenmarks einige Zellen im Zentralkanal entdeckt wurden (s. Abbildung 42). Allerdings sank hier die gefundene Zellzahl pro Schnitt, je weiter kaudal der Schnitt angefertigt wurde.

Im Gegensatz zum inneren Liquorraum zeigte sich im Subarachnoidalraum weitgehend das bekannte Verteilungsmuster; nur die Zellzahlen wichen stark von jenen der UBC-Transplantationsgruppe (100 000 transplantierte Zellen) ab. Verwunderlich war jedoch hier, dass die Cisterna magna als Transplantationsort nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl von etwa 2000 Zellen aufwies.

Auffallend war ebenso, dass sich die Verteilung der transplantierten Zellen im Gewebe von der bisher beobachteten unterschied. So zeigte sich erstaunlicherweise eine lineare Aufreihung der UBC am Rand des Stratum granulosum parallel zur Kleinhirnoberfläche, wie sie schon in den Transplantationsgruppen MSC und MNSC, aber nicht in den Gruppen UBC und UNSC aufgetreten war. Dies spricht dafür, dass eine aktive Einwanderung von UBC ins Kleinhirn abhängig von der transplantierten Zellzahl bzw. von der Zelldichte ist. Diese Besonderheit war hier aber nicht auf jene Kleinhirnabschnitte begrenzt, die der Cisterna magna unmittelbar anliegen, sondern sie trat auch in der Lingula cerebelli auf.

Diese Lingula cerebelli grenzt an den Recessus colliculi posterioris und den IV.Ventrikel, zwei Anteile des innerern Liquorraums, die in diesem Tier z.T. viele Zellen enthielten. Erstaunlich war ebenfalls, dass Bereiche des Hirnstamms massenhaft Zellen (>100 000) mit intraparenchymaler Lage aufwiesen, obwohl dies von uns nie zuvor beobachtet wurde. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass in einer Serie aufeinander folgender Schnitte an nahezu gleicher Position ein rundlicher Gewebedefekt zu sehen ist, der auf einen Stichkanal hindeuten könnte. Dieser Verdacht wird durch die Zellverteilung im Hirnstamm erhärtet, da die Mehrheit der transplantierten Zellen in naher Umgebung dieses Gewebsdefekts zu finden waren. Dies würde auch erklären, warum verhältnismäßig wenig Zellen in der Cisterna magna gefunden wurden (s.o.) Aber es besteht ebenso die –wenn auch geringe- Möglichkeit, dass es sich hierbei um ein Schnittartefakt handelt.

Da nur einem Tier („UBC189“) eine erhöhte Zellzahl appliziert wurde und die Injektion der Zellen wohl nur zum Teil in die Cisterna magna erfolgt ist, sind mögliche Rückschlüsse mit Vorsicht zu genießen. Dennoch liefert diese zusätzliche Transplantation wichtige Hinweise, die bei einer neuen Versuchsreihe mit einer erhöhten Anzahl intrathekal transplantierter Zellen von Nutzen sein könnten.

Schlussfolgerung

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass mittels Cisterna magna-Injektion eine weite Verteilung transplantierter Stammzellen im Liquorraum des transgenen SOD1-Mausmodells der ALS möglich ist.

Durch diese weite Verteilung der transplantierten Zellen kam es aber auch automatisch zu einer Abnahme der lokalen Zellzahlen bzw. der lokalen Zelldichte. Verstärkt wurde dieser „Verdünnungseffekt“ noch dadurch, dass die Überlebensrate intrathekal applizierter Zellen, besonders aber der transplantierten hUBC und hUNSC, besonders niedrig ist. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass hUBC/hUNSC noch empfindlicher auf den niedrigen Nährstoffgehalt des Liquors reagieren als hMSC/hMNSC.

Problematisch ist dabei vor allem, dass hiervon auch jene Liquorräume betroffen waren, die den Cortex, den Hirnstamm und das Rückenmark umgeben. Doch es wird vermutet, dass gerade in diesen ZNS-Bereichen, die bei der ALS befallen sind, eine enorme Anzahl transplantierter Zellen für einen therapeutischen Effekt benötigt wird.

Um diese Voraussetzung gewährleisten zu können, wird in Zukunft die Erforschung folgender Ansätze notwendig sein:
Erstens kann man die Anzahl der transplantierten Zellen erhöhen. Doch selbst Ohta et al. haben 2004 drei Wochen nach der Transplantation von 5 Millionen MSC in den IV.Ventrikel von Ratten keine Zellen in den verletzten Rückenmarksegmenten nachweisen können **[120]**. Zweitens besteht die Möglichkeit, eine Transplantationmethode mit einer erhöhten Überlebensrate der transplantierten Zellen zu verwenden. In diesem Punkt scheint die intraparenchymale Transplantation der intraventrikulären überlegen zu sein **[115]**. Doch diese Technik ist bei der ALS nicht effektiv anwendbar, da von der ALS ja verschiedenste ZNS-Bereiche betroffen sind. Eine dritte Möglichkeit, die Überlebensrate der transplantierten Zellen zu erhöhen, ist, diese zusammen mit einem Cocktail verschiedener zellprotektiver Wachstumsfaktoren zu injizieren.
Wir hatten uns bewusst für die intrathekale Injektion der Stammzellen in die Cisterna magna entschieden, um durch die Umgehung der Blut-Hirn-Schranke eine besonders starke Konzentrierung und Ansiedlung transplantierter Zellen im ZNS zu ermöglichen. Jedoch wurden lediglich in den Transplantationsgruppen MSC und MNSC Zellen mit intraparenchymaler Ansiedlung beobachtet. Leider zeigte sich hierbei weder eine gezielte Ansiedlung der transplantierten Stammzellen im Sinne eines „Tropismus“ noch eine unspezische Ansiedlung der Zellen in den geschädigten ZNS-Arealen. So war die intraparenchymale Ansiedlung der hMSC/hMNSC letztlich auf jene Abschnitte des Cerebellums beschränkt, die zur Cisterna magna hinzeigen. Zudem war der Anteil dieser Zellen zur gesamten transplantierten Zellzahl mit <1% bei den hMSC und etwa 2% bei den hMNSC durchaus gering und damit vergleichbar mit den Ansiedlungsraten von UBC im ZNS nach systemischer Applikation **[49]**.

Zwar wurde mit unserer Transplantationstechnik eine weite Verteilung der transplantierten Zellen im Liquorraum erreicht, dennoch scheint eine Orientierung bzw. Migration der transplantierten Stammzellen im Sinne eines „Tropismus“ nicht stattgefunden zu haben.
Damit ist es eine Hauptaufgabe zukünftiger Transplantationsstudien zur Therapie der ALS, Wege zu finden, die ZNS-Areale, die bei der ALS betroffen sind, mit einer ausreichend hohen Anzahl transplantierter Stammzellen zu versorgen, um so für eine günstige Beeinflussung des Krankheitsverlaufes zu sorgen.

5.) Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Zellverteilung verschiedener Stammzellpopulationen im Gewebe und in den Liquorräumen des zentralen Nervensystems beim transgenen Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) nach Cisterna magna-Transplantation erfasst werden. Dabei interessiert besonders, ob eine aktive Migration der transplantierten Zellen im Sinne eines „Tropismus“ in jene Areale stattgefunden hat, die bei der ALS einer Neurodegeneration unterliegen

Dazu wurden einem Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose am 45. Lebenstag mesenchymale Stammzellen (MSC) und proneural konvertierte mesenchymale Stammzellen (MNSC) sowie Nabelschnurblutzellen (UBC) und proneural konvertierte Nabelschnurblutzellen (UNSC) mittels stereotaktischer Operation in die Cisterna magna injiziert. Nach erfolgter Perfusion 10 bzw. 65 Tage nach Transplantation und Durchführung der „Dura-Präparation“ wurden am Mikrotom coronale Schnitte des zentralen Nervensystems (ZNS) und des zervikalen Rückenmarks angefertigt.

Bei jenen Tieren, die 65 Tage nach der Transplantation untersucht wurden, sollte der Nachweis der transplantierten Stammzellen mittels immunhistochemischer Färbung erfolgen. Doch die Färbung mit dem Antikörper gegen das „human nuclear antigen“ gelang aufgrund der starken Gewebefixierung, die für die Durchführung der „Dura-Präparation unerlässllich ist, nicht.

Bei den Tieren, die bereits 10 Tage postoperativ untersucht wurden, waren die Stammzellen vor ihrer Transplantation mit dem Farbstoff HOECHST 33342 markiert worden. Es fand sich bei ihnen folgende Zellverteilung: Die Mehrheit der Zellen zeigte sich in den basalen Zisternen des Gehirns und in der Cisterna magna und nur wenige wurden im Subarachnoidalraum des Rückenmarks oder im inneren Liquorraum gefunden. Dies spricht für eine passive Verteilung der Zellen im Subarachnoidalraum des Gehirns, die durch Liquorfluss und Schwerkraft beeinflusst wird. Bemerkenswert ist auch, dass dieses beschriebene Verteilungsmuster im Liquorraum für alle vier transplantierten Zellpopulationen annähernd dasselbe war.

Dennoch traten zwischen den Transplantationsgruppen zwei Unterschiede deutlich hervor:

Zum einen wurden in den Gruppen mit Transfer von MSC und MNSC wesentlich mehr transplantierte Zellen nachgewiesen als in den Gruppen mit Transfer von UBC und UNSC.

Zum anderen wurden transplantierte Zellen mit intraparenchymaler Lage nur bei Tieren mit transplantierten MSC oder MNSC und lediglich in Kleinhirnabschnitten beobachtet, die unmittelbar der Cisterna magna angrenzen. Diese Zellen nahmen dabei eine charakteristische, perlschnurartige Anordnung entlang des Stratum granulosum des Cerebellums ein. Dies spricht für eine aktive, möglicherweise chemotaktisch gesteuerte Migration der MSC und MNSC durch das zellarme Stratum moleculare des Kleinhirns hindurch, bis sie schließlich durch das zellreiche, dicht gepackte Stratum granulosum gestoppt wurde.

Trotz dieser Beobachtung gab es jedoch kein Anzeichen eines „Tropismus“, d.h. einer gezielten Migration der transplantierten Stammzellen, in Areale neurodegenerativer Prozesse. So konnten in den Bereichen des motorischen Cortex, des Hirnstamms und des Rückenmarks, die bei der ALS besonders betroffen sind, keine nennenswerten Zellzahlen mit intraparenchymaler oder subarachnoidaler Lage nachgewiesen werden.

Darum werden es zukünftige Untersuchungen zum Ziel haben, über die systemische oder intracisternale Transplantation einer höheren Zelldosis diesen ZNS-Arealen eine möglichst hohe Anzahl transplantierter Zellen zur Verfügung zu stellen, um so eine neuroprotektive Wirkung erzielen zu können.

6.) Literaturverzeichnis

[1] Almer G: Amyotrophe Lateralsklerose: Überlegungen zu Ursprung und Pathophysiologie der Erkrankung. J Neurol Neurochir Psychiatr 4: 6-12 (2003)

[2] Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A: Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. Nature 425: 968-973 (2003)

[3] Ascherio A, Weisskopf MG, O'Reilly EJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Calle EE, Cudkowicz M, Thun MJ: Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 57: 104-110 (2005)

[4] Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockop DJ: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats – similarities to astrocyte grafts. Proc Natl Acad Sci USA. 95: 3908-3913 (1998)

[5] Bachus R, Claus A, Meyer T, Riepe M, Ludolph AC: Molecular biology findings in amyotrophic lateral sclerosis. Nervenarzt 68: 785-791 (1997)

[6] Baron-Van Evercooren A, Gansmüller A, Clerin E, Gumpel M: Hoechst 33342 a suitable fluorescent marker for Schwann cells after transplantation in the mouse spinal cord Neurosci Lett 131: 241-244 (1991)

[7] Baron-Van Evercooren A, Clerin-Duhamel E, Lapie P, Gansmüller A, Lachapelle F, Gumpel M: The fate of Schwann cells transplanted in the brain during development. Dev Neurosci 14: 73-84 (1992)

[8] Battifora, H: Assessment of antigen damage in immunogistochemistry. The vimentin internal control. Am J Clin Pathol 96: 669-671 (1991)

[9] Belsh JM: Diagnostic challenges in ALS. Neurology 53: 26-30; discussion 35-36 (1999)

[10] Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME: Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. J Cell Sci 102: 341-351 (1992)

[11] Bergerhoff W: Über den Einfluß der hydrozephalen intrakraniellen Drucksteigerung auf Bauplan und Wachstum des kindlichen Schädels. Fortschr Röntgenstr Röfo 116: 199-204 (1972)

[12] Berlit P (Hrsg): Klinische Neurologie; Kapitel 9.4.2.: Amyotrophe Lateralsklerose, S.258-260. Springer, Berlin New York (1999)

[13] Bicknese AR, Goodwin HS, Quinn CO, Henderson VC, Chien SN, Wall DA: Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. Cell Transplant 11: 261-264 (2002)

[14] Björklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Yin Ching Chen I, McNaught KStP, Brownell A-L, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim K-S, Isacson O: Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. Proc Natl Acad Sci USA 99: 2344-2349 (2002)

[15] Blakemore WF, Crang AJ. Transplantation of glial cells into areas of demyelination in the adult rat spinal cord. S.105-122 In: Dunnet SB, Björklund A (Hrsg). Neural Transplantation: A Practical Approach. Oxford University Press, Oxford New York (1992)

[16] Blau HM: A twist of fate. Nature 419: 437(Artikel) (2002)

[17] Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stähelin H: Effects of the new anti lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. Immunology 32: 1017-1025 (1977)

[18] Bowling AC, Barkowski EE, McKenna-Yasek D, Sapp P, Horvitz HR, Beal MF, Brown RH Jr.: Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 64: 2366-2369 (1995)

[19] Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HM: From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science 290: 1775-1779 (2000)

[20] Brown DB, Stanfield BB: The use of bromodeoxyuridine-immunohistochemistry to identify transplanted fetal brain tissue. J Neural Transplant 1: 135-139 (1989)

[21] Brown RH Jr.: SOD1 aggregates in ALS: cause, correlate or consequence? Nat Med 4: 1362-1364 (1998)

[22] Buki A, Okonkwo DO, Povlishock JT: Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury. J Neurotrauma 16: 511-521 (1999)

[23] Bulte JWM, Douglas T, Witwer B, Zhang S-C, Strable E, Lewis BK, Zywicke H, Miller B, van Gelderen P, Moskowitz BM, Duncan ID, Frank JA: Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. NatBiotechnol 19: 1141-1147 (2001)

[24] Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K: Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. J Cell Sci 115: 2131-2138 (2002)

[25] Chen R, Ende N: 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 (2000)

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

[27] Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard JR, Steindler DA, Scott EW: Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. Lancet 363: 1432-1437 (2004)

[28] Colombo JA, Almeida JI, Molina S: In vitro culture and labeling of neural cell aggregates followed by transplantation. Exp Neurol 98: 606-615 (1987)

[29] Cook MJ (Hrsg): The anatomy of the laboratory mouse. S.23. Acad. Press, London (1965)

[30] Cook MJ: Anatomy. In: Foster HL, Small JD, Fox JG (Hrsg): The mouse in biomedical research. Kapitel 7, S.104-108. Acad. Press, New York London Paris (1983)

[31] Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M, Papadimitriou D, Strazzer S, Del Bo R, Comi GP: Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. Brain 127: 2518-2532 (2004)

[32] Cova L, Ratti A, Volta M, Fogh I, Cardin V, Corbo M, Silani V. Stem cell therapy for neurodegenerative diseases: The issue of transdifferentiation. Stem Cells Dev 13: 121-131 (2004)

[33] Dal Canto MC, Gurney ME: Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. Am J Pathol 145: 1271-1279 (1994)

[34] Dennis JE, Haynesworth SE, Young RG, Caplan AI: Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. Cell Transplant 1: 23-32 (1992)

[35] Du J, Gouras P, Kjeldbye H, Kwun R, Lopez R: Monitoring photoreceptor transplants with nuclear and cytoplasmic markers. Exp Neurol 115: 79-86 (1992)

[36] v.Düring M, Dermietzel R, Drenckhahn D: Nervensystem: Hirnhäute, Ventrikelauskleidung, Liquor cerebrospinalis. In: Benninghoff, Drenckhahn (Hrsg). Anatomie. Bd 2, Kapitel 12.3, S.270-271. 16.Auflage. Urban & Fischer. (2004)

[37] v.Düring M, Dermietzel R, Drenckhahn D: Nervensystem:Hirnhäute, Ventrikelauskleidung, Liquor cerebrospinalis. In: Benninghoff, Drenckhahn (Hrsg). Anatomie. Bd 2, Kapitel 12.3, S.282-283. 16.Auflage. Urban & Fischer. (2004)

[38] Eglitis MA, Mezey E: Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4080-4085 (1997)

[39] Ende N, Weinstein F, Chen R, Ende M: Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). Life Sci 67: 53-9 (2000)

[40] Fachinformation Sandimmun Optoral Lösung, Novartis Pharma (2004)

[41] Fiedler J, Roderer G, Gunther KP, Brenner RE: BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. J Cell Biochem 87: 305-312 (2002)

[42] Finsterer J: Genetische Heterogenität der familiären Amyotrophen Lateralsklerose. J Neurol Neurochir Psychiatr 5: 7-13 (2004)

[43] Franklin RJ, Blakemore WF: Reconstruction of the glia limitans by sub-arachnoid transplantation of astrocyte-enriched cultures. Microsc Res Tech 32: 295-301 (1995)

[44] Franklin RJ, Bayley SA, Blakemore WF: Transplanted CG4 cells (an oligodendrocyte progenitor cell line) survive, migrate, and contribute to repair of areas of demyelination in X-irradiated and damaged spinal cord but not in normal spinal cord. Exp Neurol 137: 263-276 (1996)

[45] Fridovich I: Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem 64: 97-112 (1995)

[46] Fridovich I: An overview of oxyradicals in medical biology. Adv Mol Cell Biol 25: 1–14 (1998)

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

[48] Garbuzova-Davis S, Willing AE, Milliken M, Saporta S, Zigova T, Cahill DW, Sanberg PR: Positive effevt of transplantationof hNT neurons in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Exp Neurol 174: 169-180 (2002)

[49] Grabuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, Hudson JE, Chen N, Davis CD, Sanber PR: Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. J Hematotherapy Stem Cell Res 12: 255-70 (2003)

[50] Goto M, Maeda A, Elfman L, Suling KM, Wood JC, Patience C, Groth CG, Wennberg L: No transmission of porcine endogenous retrovirus after transplantation of adult porcine islets into diabetic nude mice and immunosuppressed rats. Xenotransplantation 11: 340-346 (2004)

[51] Grant L: Hydrocephalus: An overview und update. J Neurosurg 16: 313-318 (1984)

[52] Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al.: Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science 264: 1772-1775 (1994)

[53] Gurney ME: The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. J Neurol Sci 151: 67-73 (1997)

[54] Ha Y, JU Choi, DII Yoon , DS Yeon, JJ Lee, HO Kim, YE Cho: Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells in vitro. Neuroreport 12: 3523-3527 (2001)

[55] Habisch HJ, Janowski M, Binder D, Kuzma-Kozakiewicz M , Widmann A, Habich A, Schwalenstöcker B, Hermann A, Brenner R, Lukomska B, Domanska-Janik K, Ludolph AC, Storch A: Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: Limited intraparenchymal migration narrows therapeutic effects. J Neural Transm 114:1395-406 (2007)

[56] Harvey AR, Fan Y, Beilharz MW, Grounds MD: Survival and migration of transplanted male glia in adult female mouse brains monitored by a Y-chromosome-specific probe. Brain Res Mol Brain Res 12: 339-343 (1992)

[57] Harvey AR: Labeling and identifying grafted cells. In: Dunnet SB, Voulton AA, Baker GB (Hrsg). Neural Transplantation Methods. S.319-361. Humana Press, Totowa New Jersey. (2000)

[58] Hensley K, Floyd RA, Gordon B, Mou S, Pye QN, Stewart C, West M, Williamson K: Temporal patterns of cytokine and apoptosis-related gene expression in spinal cords of the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 82: 365-374 (2002)

[59] Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A: Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci 117: 4411-4422 (2004)

[60] Hermann A, Gerlach M, Schwartz J, Storch A: Neurorestoration in Parkinson's disease by cell replacement and endogenous regeneration. Expert Opin Biol. Ther. 4: 1-13 (2004)

[61] Hermann A, Liebau S, Gastl R, Fickert S, Habisch HJ, Schwarz J, Brenner R, Storch A: Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols. J Neurosci Res 83: 1502-1514 (2006)

[62] Hilwig I: Behavior of animal cells in tissue culture in response to a basic substituted benzimidazol derivative with fluorochromic properties. Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie 104: 127-37 (1970)

[63] Hofstetter CP, Holmström NAV, Lilja JA, Schweinhardt P, Hao J, Spenger C, Wiesenfeld-Hallin Z, Kurpad SN, Frisén J, Olson L: Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. Nat Neurosci 8: 346-353 (2005)

[64] Honig MG, Hume RI: Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. J Cell Biol 103: 171-187 (1986)

[65] Hu DZ, Zhou LF, Zhu JH: Marrow stromal cells administrated intracisternally to rats after traumatic brain injury migrate into the brain and improve neurological function. Chin Med J 117: 1576-1578 (2004)

[66] Ive-Schappelwein H: Der Hydrozephalus des Erwachsenen-ein Mysterium. J Neurol Neurochir Psychiatr 5: 17-23 (2004)

[67] Iwashita Y, Crang AJ, Blakemore WF: Redistribution of bisbenzimide Hoechst 33342 from transplanted cells to host cells. Neuroreport 11: 1013-1016 (2000)

[68] Jacque CM, Suard IM, Collins VP, Raoul M: Interspecies identification of astrocytes after intracerebral transplantation. Dev Neurosci 8: 142-149 (1986)

[69] Janowski, M, Kuzma-Kozakiewicz M, Habich A, Habisch HJ, Binder D, Lukomska B, Ludolph AC, Storch A: (Publikation in Vorbereitung)

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

[71] Jeffers WA, Griffith JQ Jr.: The Central Nervous System. In: Farris ED, Griffith JQ (Hrsg): The rat in laboratory investigation. S.196-197. Hafner Publishing Company (1967)

[72] Jerusalem F, Zierz S (Hrsg): Muskelerkrankungen. Klinik, Therapie, Pathologie. Kapitel 10: Spinale Muskelatrophie (SMA), amyotrophe Lateralsklerose (ALS), Bulbärparalyse (BP) und andere neurogene Krankheitsprozesse. S.221-229. Thieme, Stuttgart. (1991)

[73] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418: 41-49 (2002)

[74] Johnston M, Zakhorov A, Armstrong D: Subarachnoid injection of Microfil reveals connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatics in non-human primate. Neuropathol Appl Neurobiol 31: 632-640 (2005)

[75] Johnston M, Zakhorov A, Papaiconomou C, Salmasi G, Armstrong D: Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species. Cerebrospinal Fluid Res 1:2 (2004)

[76] Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Gratzl M (Hrsg). Histologie. Kapitel 8.4, S.128-129. 5.Auflage. Springer, Berlin Heidelberg (2002)

[77] Jurga M, Markiewicz I, Sarnowska A, Habich A, Kozlowska H, Lukomska B, Buzanska L, Domanska-Janik K: Neurogenic potential of human umbilical cord blood: Neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. J Neurosci Res 83: 627-37 (2006)

[78] Kaiser G: Hydrozephalus. In: Bettex M (Hrsg): Kinderchirurgie: Diagnostik, Indikation, Therapie, Prognose. S.252-270. 2.Auflage. Thieme, Stuttgart New York (1982)

[79] Keep M, Elmer E, Fong KS, Csiszar K: Intrathecal Cyclosporin Prolongs Survival of Late-stage ALS Mice. Brain Res 894: 327-331 (2001)

[80] Key A, Retzius G: Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes. Stockholm, Samson & Wallin (1875)

[81] Klein S, Svendsen CN: Stem cells in the injured spinal cord: reducing the pain and increasing the gain. Nat Neurosci 8: 259-260 (2005)

[82] Kim JJ, Saporta S, Willling AE., Fu ES, Colina LO, Sanberg PR: Behavioral recovery following intravenous administration of human umbilical cord blood cells in rats with spinal cord injury. Exp Neurol 175: 443 (2002)

[83] Körbling M, Estrov Z: Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? N Engl J Med 349: 570-582 (2003)

[84] Kohama I, Lankford KL, Preiningerova J, White FA, Vollmer TL, Kocsis JD: Transplantation of cryopreserved adult human Schwann cells enhances axonal conduction in demyelinated spinal cord. J Neurosci 21: 944-950 (2001)

[85] Koyhama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A: Brain from bone: efficient „meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. Differentiation 68: 235-244 (2001)

[86] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG: Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci USA 96: 10711-10716 (1999)

[87] Kugler P: Nervensystem: Grundzüge der Organisation. In: Benninghoff, Drenckhahn (Hrsg). Anatomie. Bd 2, Kapitel 12.1., S.242-243. 16.Auflage. Urban & Fischer (2004)

[88] Kung L, Batiuk TD, Palomo-Pinon S, Noujaim J, Helms LM, Halloran PF: Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine. Am J Transplant 1: 325-333 (2001)

[89] Kuroda S, Janelidze S, Siesjö BK: The immunosuppressants cyclosporine A and FK506 equally ameliorate brain damage due to 30-min middle cerebral artery occlusion in hyperglycemic rats. Brain Res 835: 148-153 (1999)

[90] Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosos. Lancet 347: 1425-1431 (1996)

[91] Lee JB, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, Tada M, Sawada K-I, Iwasaki Y: Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. Neuropathology 23: 169-180 (2003)

[92] Lee JB, Kuroda S, Shichinohe H, Kobayashi H, Hida K, Iwasaki Y: A pre-clinical assessment model of rat autogeneic bone marrow stromal cell transplantation into certral nervous system. Brain Res Brain Res Protoc 14: 37-44 (2004)

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

[94] Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M, Chopp M: Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. Neurosci Lett 316: 67-70 (2001)

[95] Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Katakowski M, Zhang LJ, Lu M, Janakiraman N, Chopp M: Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. Neurology 59: 514-523 (2002)

[96] Li P, Tessler A, Han S, Fischer I, Rao MS, Selzer ME: Fate of immortalized human neuronal progenitor cells transplanted in rat spinal cord. Arch Neurol 62: 223-229 (2005)

[97] Lindsay RM, Raisman G: An autoradiographic study of neuronal development, vascularization and glial cell migration from hippocampal transplants labelled in intermediate explant culture. Neuroscience 12: 513-530 (1984)

[98] Liochev SI, Fridovich I. Superoxide and iron: partners in crime. IUBMB Life 48: 157-161 (1999)

[99] Liu CY, Westerlund U, Svensson M, Moe MC, Varghese M, Berg-Johnsen J, Apuzzo ML, Tirrell DA, Langmoen IA: Artificial niches for human adult neural stem cells: possibility for autologous transplantation therapy. J Hematother Stem Cell Res 12: 689-699 (2003)

[100] Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brannstrom T, Gredal O, Wong PC, Williams DS, Cleveland DW: Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. Neuron 43: 5-17 (2004)

[101] Lindvall O, Kokaia Z, Martinaz-Serrano A: Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders - how to make it work. Nat Med 42-50 (2004)

[102] Lu D, Li Y, Wang L, et al. : Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. J Neurotrauma 18: 813-819 (2001)

[103] Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M: Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. Neuroreport 12: 559-563 (2001)

[104] Ludolph AC: Animal models for motor neuron diseases: research directions. Neurology 47: 228-232 (1996)

[105] Ludolph AC, Meyer T, Riepe MW: The role of excitotoxicity in ALS - what is the evidence? J Neurol 247: 7-16 (2000)

[106] Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M: Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. Neurosurgery 49:1196-1203; dissussion 1203-1204 (2002)

[107] Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M: Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. Neurosurgery, 53: 697-702; discussion 702-703 (2003)

[108] Mason DW, Charlton HM, Jones AJ, Lavy CB, Puklavec M, Simmonds SJ: The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. Neuroscience 19: 685-694 (1986)

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

[110] Meininger V., Scléroce latérale amyotrophique. Encyclopédie Orphanet. Septembre 1998; http://www.orpha.net/data/patho/FR/fr-sclerola.pdf

[111] Melan MA: Overview of cell fixation and permeabilization. Methods Mol Biol 34: 55-66 (1994)

[112] Meyding-Lamadé U, Ehrhardt K, de Ruiz HL, Kehm R, Lamadé W: A new technique: serial puncture of the cisterna magna for obtaining cerebrospinal fluid in the mouse application in a model of herpes simplex virus encephalitis. J Exp Anim Sci 38: 77-81 (1996)

[113] Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science 290: 1779-1782 (2000)

[114] Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B: Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. Proc Natl Acad Sci 100: 1364-1369 (2003)

[115] Modo M, Cash D, Mellodew K, Williams SC, Fraser SE, Meade TJ, Price J, Hodges H: Tracking transplanted stem cell migration using bifunctionol, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. Neuroimage 17: 803-811 (2002)

[116] Mori K: Hydrocephalus. Revision of its classification. In: Matsumoto S, Tamaki N (Hrsg): Hydrocephalus - Pathogenesis and treatment. S.362-368. Springer, Berlin Tokyo Heidelberg, (1991)

[117] Netter FH (Hrsg): Farbatlanten der Medizin - Nervensystem I. S.31. Thieme, Stuttgart New York (1987)

[118] Olby NJ, O'Leary MT, Targett MP, Blakemore WF: The effect of injection technique on the passive spread of cells immediately following transplantation into rat spinal cord white matter tracts. Rest. Neurol. Neurosci. 7: 171-174 (1995)

[119] O'Leary MT, Blakemore WF: Use of a rat Y chromosome probe to determine the long-term survival of glial cells transplanted into areas of CNS demyelination. J Neurocytol 26: 191-206 (1997)

[120] Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Katoka K et al: Bone marrow stromal cells infused into cerbral spinal fluid promote functinal recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. Exp Neurol 187: 266 – 278 (2004)

[121] Olive PL, Chaplin DJ, Durand RE: Pharmacokinetics, binding and distribution of Hoechst 33342 in spheroids and murine tumours. Br J Cancer 52: 739-746 (1985)

[122] Onifer SM, White LA, Whittemore SR, Holets VR: In vitro labeling strategies for identifying primary neural tissue and a neuronal cell line after transplantation in the CNS. Cell Transplant 2: 131-149 (1993)

[123] Paidas MJ, Cohen A: Disorders of the central nervous system. Semin Perinatol 18: 266-282 (1994)

[124] Pabst W: Immendorff ließ sich fötale Stammzellen ins Hirn implantieren. Spiegel Online, Wissenschaft. 10/2005.
http://www.spiegel.de/spiegel/vorab/0,1518,344817,00.html

[125] Pardridge WM (Hrsg): Peptide Drug Delivery to the Brain. Kapitel 4: Transnasal and intraventricular delivery of drugs. S.112. Raven Press, New York (1991)

[126] Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, Simon D, Livezey K, Prockop DJ: Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogeneses imperfecta. Proc Natl Acad Sci. USA 95: 1142-1147 (1998)

[127] Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ: Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. Proc Natl Acad Sci USA 92: 4857-4861 (1995)

[128] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 284: 1168-1170 (1999)

[129] Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Briskomatis A, Sabattini E, Ascani S, Santini D, Piccaluga PP, Leone O, Damiani S, Ercolessi C, Sandri F, Pieri F, Leoncini L, Falini B: Antigen retrieval techniques in immunochemistry: comparison of different methods. J Pathology 183: 116-123 (1997)

[130] Poeck K, Hacke W (Hrsg): Neurologie. 10.Auflage. Kapitel 33.3: Amyotrophe Lateralsklerose. S.665-668. Springer, Berlin Heidelberg New York (1996)

[131] Pollay M, Curl F: Secretion of cerebrospinal fluid by the ventricular ependymoma of the rabbit. Am J Physiol 213: 1031-1038 (1967)

[132] Price J, Turner D, Cepko C: Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 84: 156-160 (1987)

[133] Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U: Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. J Cell Biol 155: 733-738 (2001)

[134] Ramón-Cueto A, Plant GW, Avila J, Bunge MB: Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. J Neurosci 18: 3803-3815 (1998)

[135] Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH Jr, Scott RW, Snider WD: Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat Genet 13: 43-47 (1996)

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

[137] Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O`Regan JP, Deng HX, et al.: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362: 59-62 (1993)

[138] Rowland LP: Amyotrophic lateral sclerosis: theories and therapies. Ann Neurol 35: 129-130 (1994)

[139] Rowland LP, Shneider NA: Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J 344: 1688-700 (2001)

[140] Roy NS, Nakano T, Keyoung HM, Windrem M, Rashbaum WK, Alonso ML, Kang J, Peng W, Carpenter MK, Lin J, Nedergaard M, Goldman SA: Telomerase immortalization of neuronally restricted progenitor cell derived from the human fetal spinal cord. Nat Biotechnol 22: 297-305 (2004)

[141] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR : Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol 164: 247-256 (2000)

[142] Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR: Expression of neural markers in human umbilical cord blood. Exp Neurol 171: 109-115 (2001)

[143] Sanchez-Ramos JR. Neural Cells Derived From Adult Bone Marrow and Umbilical Cord Blood. J Neurosci res 69: 880-893 (2002)

[144] Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR: Human Umbilical Cord Blood Stem Cells Infusion in Spinal Cord Injury: Engraftment and Beneficial influence on Behavior. J Hematother Stem Cell Res 12: 271-278 (2003)

[145] Scanziani E: Immunohistochemical staining of fixed tissues. Methods Mol. Biol. 104: 133-140 (1998)

[146] Schumacher GH, Aumüller G (Hrsg): Topographische Anatomie des Menschen. S.15-16. 6.Auflage. Fischer, Stuttgart Jena (1994)

[147] Schwartz A (Hrsg): Neurologie systematisch. Kapitel 2.5.2.1: Amyotrophe Lateralsklerose. S.254-256. 2.Auflage; UNI-MED, Bremen (2000)

[148] Sidman RL, Angevine JB Jr., Pierce ET (Hrsg): Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts (1971)

[149] Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (Hrsg): Basic Neurochemistry. 6.Auflage. Kapitel 32, S.673. Lippicott Williams & Wilkins, US (1999)

[150] Silani V, Cova L, Corbo M, Ciammola A, Polli E: Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. Lancet 364: 200-202 (2004)

[151] Simon C, Geile G: Hydrozephalus. In: Simon C, Geile G (Hrsg): Pädiatrie: Lehrbuch der Kinderheilkunde. 6.Aufl. Schattauer, Stuttgart New York, S.:321-326 (1991)

[152] Song S, Sanchez-Ramos J: Brain as the Sea of Marrow. Exp Neurol 184: 54-60 (2003)

[153] Sprick U: Long-term tracing of vital neurons with Hoechst 33342 in transplantation studies. J Neurosci. Methods 36:229-238 (1991)

[154] Stichel CC, Lips K, Wunderlich G, Müller HW: Reconstruction of transected postcommissural fornix in adult rat by Schwann cell suspension grafts. Exp Neurol 140: 21-36 (1996)

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

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

[157] Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL: Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 97: 14720-14725 (2000)

[158] Uchino H, Elmér E, Uchino K, Li PA, He QP, Smith ML, Siesjö BK: Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. Brain Res 812: 216-226 (1998)

[159] Ueda H, Amano H, Shiomi H, Takagi H: Comparison of the analgesic effects of various opioid peptides by a newly devised intracisternal injection technique in conscious mice. European J Pharmacol. 56: 265-268 (1979)

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

[161] Vogelweid CM, Kier AB: A Technique for the Collection of Cerebrospinal Fluid from Mice. Lab Anim Sci 38: 91-92 (1988)

[162] Wakitani S, Saito T, Caplan AI: Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. Muscle Nerve 18: 1417-1426 (1995)

[163] Wallenfels PM: Stereologische Computertomographische Analyse des malresorptiven Hydrocephalus. Med Dissertation, Universität Bonn (1995)

[164] Wang L, Li Y, Chen J, Gautam SC, Zhang Z, Lu M, Chopp M: Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. Exp Hematol 30: 831-836 (2002)

[165] Waynforth HB (Hrsg): Experimental and surgical technique in the rat. Academic Press; London; S.59-61 (1980)

[166] Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM: Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. Proc Natl Acad Sci USA 92: 689-93 (1995)

[167] Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM. Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. Nat Cell Biol 5: 959-966 (2003)

[168] Werner M, Von Wasielewski R, Komminoth P. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. Histochem Cell Biol 105: 253-260 (1996)

[169] Wokke J: Riluzole. Lancet 348: 795-799 (1996)

[170] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentrate into neurons. J Neurosci Res 61: 364-370 (2000)

[171] Wu S, Suzuki Y, Kitada M, Kataoka K, Kitaura M, Chou H et al: New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat. Neurosci Lett 318: 81 – 84 (2002)

[172] Zhang S-C, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA: In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 19: 1129-1133 (2001)

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

[174] Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Verfaillie CM, Low WC: Immunohistochemical identification of multipotent adult progenitor cells from human bone marrow after transplantation into the rat brain. Brain Res Brain Res Protoc 11: 38-45 (2003)

[175] Zigova T, Song S, Willing AE, Hudson JE, Newman MB, Saporta S, Samchez-Ramos J, Sanberg PR : Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. Cell Transplant 11: 265-274 (2002)

Danksagung

Zuerst möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. A.C. Ludolph für die Überlassung des Dissertationsthemas und bei Herrn Dr. rer. nat. Hans-Jörg Habisch für die freundliche und unterstützende Betreuung bedanken.
Mein Dank gilt auch Birgit Schwalenstöcker, Nancy Meyer, Stephen Meier, Tanja Wibb, Alexandra Widmann, Martina Meisel, Miroslaw Janowski und Alexander Storch ebenso dem Bundesministerium für Bildung und Forschung sowie der Landesstiftung Baden-Württemberg - Förderprogramm ‚Adulte Stammzellen'.
Zuletzt möchte ich mich bei meiner Lebensgefährtin Miriam für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre Unterstützung bedanken.

LEBENSLAUF

Name:	Binder, Donat Roman
Anschrift:	Otto-Schwarz-Weg 2 71254 Ditzingen
Telefon:	0175/3760627
E-Mail:	donat.binder@gmx.de
Geburtsort:	Leonberg
Geburtsdatum:	24.09.1981

Werdegang

1988-1992	Grundschule Heimerdingen
1992 – 2001	Gymnasium in der Glemsaue, Ditzingen
Oktober 2001	Beginn des Medizinstudiums in Ulm
August 2003	Physikum / Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2006-April 2007	Praktisches Jahr im Karl-Olga-Krankenhaus; Tertial Innere Medizin und Tertial Chirurgie
April 2007-August 2007	Praktisches Jahr im RKU Ulm; Tertial Neurologie
Oktober/Dezember 2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dezember 2007	Approbation
Februar 2008	Promotionskolloquium

Publikationen:

Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects.
Habisch HJ, Janowski M, Binder D, Kuzma-Kozakiewicz M, Widmann A, Habich A, Schwalenstöcker B, Hermann A, Brenner R, Lukomska B, Domanska-Janik K, Ludolph AC, Storch A.
Journal of Neural Transmission, 114(11):1395-406 (2007). [Epub 18.5.2007].

Neurotransplantation in mice: The concorde-like position ensures minimal cell leakage and widespread distribution of cells transplanted into the cisterna magna.
Janowski M, Kuzma-Kozakiewicz M, Binder D, Habisch HJ, Habich A , Lukomska B, Domanska-Janik K, Ludolph AC, Storch A.
Neuroscience Letters [Epub ahead of print, 17.11.2007]