

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

**Quantitative Auswertung spinaler Motoneurone nach  
intracisternaler Transplantation  
von Stammzellen in ein Mausmodell  
der amyotrophen Lateralsklerose**

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

vorgelegt von  
**Alexandra Simone Widmann**  
aus Heidenheim a.d. Brenz

2007

**Amtierender Dekan:** Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin  
**1. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Ludolph  
**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. T. Böckers  
**Tag der Promotion:** 30.5.2008

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
-------------------------	---

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	III
-----------------------------	-----

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

1.1 Die amyotrophe Lateralsklerose.....	1
1.2 Die SOD1 und das SOD1-Mausmodell.....	3
1.3 Stammzellen .....	3
1.4 Fragestellung .....	5

<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>6</b>
-------------------------------------	----------

2.1 Material.....	6
2.2 Versuchstiere .....	7
2.3 Transplantation .....	8
2.3.1 Vorbereitung.....	8
2.3.2 Durchführung.....	9
2.4 Histologie .....	10
2.4.1 Perfusion.....	10
2.4.2 Präparation.....	11
2.4.3 Herstellung der Schnitte .....	11
2.4.4 Färbungen.....	12
2.5 Auswertung.....	14
2.5.1 NeuN .....	15
2.5.2 Nissl .....	15
2.5.3 Hoechst .....	16
2.5.4 Statistische Verfahren .....	16

<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>17</b>
--------------------------	-----------

3.1 Bilder .....	17
3.1.1 NeuN .....	17
3.1.2 Nissl .....	18
3.2 Diagramme .....	20
3.2.1 NeuN .....	20
3.2.2 Nissl .....	27
3.2.3 Sonstiges .....	29

3.3	Transplantierte Zellen.....	30
3.4	Lumbales Rückenmark.....	33
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	34
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>35</b>
4.1	Fragestellung .....	35
4.2	Methodik.....	35
4.2.1	<i>Histologie</i> .....	35
4.2.2	<i>Auswertung</i> .....	38
4.3	Ergebnisse.....	39
4.3.1	<i>Versuchstiere</i> .....	39
4.3.2	<i>Immunsuppression</i> .....	42
4.3.3	<i>Zellen</i> .....	42
4.3.4	<i>Transplantation</i> .....	46
4.4	Schlussfolgerung .....	48
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>50</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>61</b>

## **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
BSA	Bovine serum albumine
CsA	Cyclosporin A
DNA	Desoxyribonucleic Acid
f	Female
fALS	Familiäre Form der ALS
G93A	Mutation an Position 93, führt zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Alanin
hNT-Neurone	Human neuroteratocarcinoma neurons
HL	hinten (dorsal) links
HR	hinten (dorsal) rechts
i.p.	Intraperitoneal
L	Lumbal
m	Male
MHC	Major histocompatibility complex
MNSC	MSC-derived neural stem cell-like cells
MSC	Mesenchymal stem cells
NaCl	Natriumchlorid
NeuN	Neuronal Nuclei
NSC	Neural stem cells
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
sALS	Sporadische Form der ALS
SOD1	Kuper-Zink-Superoxiddismutase 1
T	Thorakal
UBC	Umbilical cord blood cells
UNSC	UBC-derived neural stem cell-like cells
VL	vorne (ventral) links
VR	vorne (ventral) rechts
ZNS	Zentralnervensystem

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die amyotrophe Lateralsklerose**

Die von dem Pariser Neurologen Charcot 1874 erstmals beschriebene amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist die häufigste Form der Motoneuronerkrankung [49]. Bei dieser neurodegenerativen Erkrankung ist sowohl das im motorischen Kortex gelegene erste Motoneuron als auch das im Rückenmark gelegene zweite Motoneuron betroffen [6].

Es werden zwei verschiedene Verlaufsformen bei der klinisch-neurologischen Untersuchung unterschieden, wobei je nach Stadium beim klinischen Bild Affektionen des ersten oder des zweiten Motoneurons überwiegen sowie motorische Hirnnervenkerne betroffen sein können [51]. Die spinale Form beginnt entweder an der oberen oder der unteren Extremität (je 40% der Fälle), die bulbäre Form beginnt mit dem Befall der Hirnnervenkerne (20%) [51]. Bei der spinalen Form sind initial häufig nur die kleinen Handmuskeln betroffen, wobei sich die Symptomatik im Verlauf der Krankheit auf benachbarte Muskelregionen ausbreitet bis in der Regel alle Extremitäten betroffen sind. Es kommt zur Spastik bis hin zur Parese. Daneben sind asymmetrische Muskelschwächen, Muskelatrophie, Hyperreflexie und Faszikulationen sowie Muskelkrämpfe typische Symptome der ALS. Zumeist tritt die bulbäre Symptomatik zuletzt ein [6, 18, 51]. Bei der bulbärparalytischen Form der Krankheit dominieren bulbäre Dysarthrie, Salivation, Sialorrhoe, Dysphonie, pseudobulbäre Affekte wie pathologisches Lachen und Weinen [46], sowie motorische Paresen des Nervus facialis und des Nervus trigeminus [6, 51]. Eine sehr selten auftretende Unterform der ALS ist die primäre Lateralsklerose, bei der zumeist nur das erste Motoneuron betroffen ist und somit die Spastik als Hauptsymptom auftritt.

Der Prozess der nicht einfach zu stellenden Diagnose wird von der klinisch-neurologischen Untersuchung, der Elektromyographie und dem Ausschließen anderer bzw. ALS-ähnlicher Motoneuronerkrankungen geprägt [6, 35].

Nach Diagnosestellung beträgt die Überlebenszeit im Mittel 3 bis 5 Jahre, dabei können Extremwerte von 6 Monaten bis zu 20 Jahren möglich sein [49]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei circa 60 Jahren, wobei die familiäre Form der ALS (fALS) durchschnittlich etwa 10 Jahre früher auftritt als die sporadische Form der ALS (sALS) [18, 46].

Eine Vorhersage der im Einzelnen auftretenden Beschwerden oder des zeitlichen Auftretens der Symptome ist nicht möglich.

Gegen Ende der Krankheit kommt es zum Untergang von pathologisch vergrößerten motorischen Einheiten, so dass es, da sich deren Ausfall funktionell besonders stark auswirkt, zu einem rascheren Verlauf kommt [46]. Die Patienten sterben entweder durch Atemmuskulaturbeteiligung an den Folgen einer Atemlähmung oder an Sekundärkomplikationen wie z.B. einer Aspirationspneumonie [6, 51].

Die Prävalenz liegt bei 5/100.000 Einwohner pro Jahr, die jährliche Inzidenz beträgt 2/100.000 Einwohner [1, 35]. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (1,5:1) [51].

Bei der Therapie der ALS steht die symptomatische Behandlung im Vordergrund, da trotz aller Bemühungen bis heute kein kurativer Ansatz bekannt ist [6]. Neben physikalischen Maßnahmen liegen zahlreiche Medikamente zur symptomatischen Therapie vor [35], am Mensch ist jedoch nur Riluzol (Rilutek<sup>®</sup>) zur neuroprotektiven Therapie zugelassen. Riluzol, das präsynaptisch die Freisetzung von Glutamat hemmt und somit dessen Toxizität verringert, senkt die Mortalität und verlangsamt die Abnahme der Muskelkraft bei ALS-Patienten [64]. Außerdem konnte durch den Einsatz von antioxidativ wirkendem Vitamin E eine Verzögerung des Fortschreitens der Krankheit, jedoch keine Verlängerung der Lebenszeit, erreicht werden [3]. Die Möglichkeiten der angewandten Kombinationstherapie aus Riluzol und Vitamin E sind begrenzt. Da auch kürzliche Untersuchungen im Tiermodell nur mäßigen Erfolg zeigten [68] ist es unerlässlich, neue therapeutische Strategien gegen ALS zu entwickeln.

Die Ätiologie der ALS ist bisher ungeklärt [6], etwa 90% der ALS-Fälle gelten als sporadisch (sALS). Als Ursachen werden Theorien wie epidemiologische Gründe, virale Infektionen, Prionenerkrankungen, Exposition von Schwermetallen, Autoimmunität und Paraneoplastizität diskutiert [49]. Bei ungefähr 5 bis 10% der ALS-Fälle konnte eine genetische Ursache nachgewiesen werden (fALS), wovon wiederum 15 bis 20% eine von über 100 verschiedenen Mutationen in der Kupfer-Zink-Superoxiddismutase 1 (SOD1) aufweisen [2, 4, 43]. Die verschiedenen SOD1-Mutationen führen zu unterschiedlichen Phänotypen in Bezug auf Krankheitsbeginn, Schweregrad und Überlebensdauer [18, 49].

## 1.2 Die SOD1 und das SOD1-Mausmodell

Die SOD1 ist ein ubiquitär vorkommendes zytoplasmatisches Enzym [18], das eine wesentliche Rolle als Radikalfänger hat [4] und somit die zelltoxischen Oxidationsvorgänge vermindert und die Reduktanten in der Zelle schützt [1].

Die menschliche SOD1-Mutation mit einem Aminosäureaustausch an Position 93 (G93A, Glycin zu Alanin) [4] verursacht einen toxischen Funktionsgewinn im SOD1-Protein („gain of function“-Theorie) und führt zu einem Untergang der Motoneurone [18]. Trotz intensiver Forschung und vielen diskutierten Hypothesen ist es bisher nicht gelungen den pathologischen Funktionsgewinn der SOD1-Mutation genau zu verstehen [1, 9, 60].

Diese G93A-SOD1-Mutation ist von großer Bedeutung, da es gelungen ist dieses human mutierte Gen in einem Mausmodell zu etablieren, das klinische und neuropathologische Charakteristika einer selektiven Vorderhorndegeneration, ähnlich der ALS, aufweist [1, 16, 24, 58]. An diesem Modell können die Pathogenese und Therapie der ALS untersucht bzw. Grundlagen- und Medikamentenstudien durchgeführt werden [4].

## 1.3 Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte, multipotente Zellen, die sich über einen längeren Zeitraum durch Zellteilung selbst erneuern und, unter bestimmten physiologischen oder experimentellen Bedingungen, ausdifferenzieren können, d.h. zu Zellen mit einer bestimmten Funktion werden können. Die Aufgabe von Stammzellen ist es, in sich entwickelndem Gewebe zu Organen heranzureifen oder zugrunde gegangenes Gewebe zu ersetzen. Des Weiteren wird vermutet, dass Stammzellen sowohl die Fähigkeit zur Transdifferenzierung (Differenzierung einer Stammzelle, die einem bestimmten embryonalen Keimblatt entstammt in eine Zelle eines anderen Keimblattes), als auch zur Dedifferenzierung (Zurückgehen auf ein weniger differenziertes Stadium) besitzen [15, 40, 53].

Je nach Herkunft der Stammzellen unterscheidet man embryonale und adulte Stammzellen. Embryonale Stammzellen differenzieren in alle Zelltypen des Körpers, da sie pluripotent sind. Dagegen sind adulte Stammzellen auf eine Differenzierung begrenzt, die sich auf die Zelltypen ihres Herkunftsgewebes beschränken, d.h. sie sind multi- bzw. oligopotent.



In dieser Studie soll die therapeutische Effizienz einer Stammzelltransplantation untersucht werden. Dieser Ansatz ist vor allem deshalb interessant, weil die ALS, ebenso wie z.B. Parkinson, bei dem bereits am Menschen erfolgreiche Transplantationen mit embryonalen Zellen durchgeführt wurden, eine bisher mit Medikamenten unheilbare Krankheit ist [32, 53].

Adulte humane Stammzellen eröffnen für neurodegenerative Erkrankungen die Möglichkeit einer regenerativen Therapie, da sie prinzipiell das Potential haben, Mikroglia, Astroglia und neurales Gewebe zu bilden [40]. Als Ausblick sei hier die Möglichkeit der autologen Transplantation erwähnt, bei der die dem Spender entnommenen Zellen außerhalb des Körpers vermehrt, gezielt manipuliert und anschließend wieder reimplantiert werden [42, 50]. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen können adulte Stammzellen aus autologem Knochenmark gewonnen werden und haben außerdem den Vorteil, dass bei Reimplantation keine Abstoßung durch MHC-Proteine (MHC: Major histocompatibility complex) erfolgen würde [40]. In einer Pilotstudie mit mehreren ALS-Patienten wurden bereits versuchsweise autologe Knochenmarkszellen injiziert, wobei keine Abstoßungsreaktion beobachtet wurde [34].

Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass sowohl adulte als auch embryonale Stammzellen nach ektopter Transplantation zum Krankheitsherd wandern (sog. Tropismus) und dort teilweise die Funktion des geschädigten Gewebes übernehmen können [19, 22, 50]. Ebenso können diese in vivo ausdifferenzieren sowie nachweislich Krankheitsverläufe, d.h. die Überlebenszeit und bzw. oder die motorische Aktivität, in Tiermodellen positiv beeinflussen [7, 11, 17, 21, 53]. So wurden bereits in einigen Studien mit transplantierten Zellen wie z.B. Nabelschnurblutzellen, Sertollizellen und hNT-Neurone (human neuroteratocarcinoma neurons) positive Effekte erzielt [14, 22, 29, 63].

Bei dieser Studie wurden vier verschiedene Zellarten in die Cisterna magna transgener SOD1-Mäuse injiziert.

Verwendet wurden zum einen humane Knochenmarkstammzellen (MSC: mesenchymal stem cell) und aus MSC gewonnene, so genannte proneural-konvertierte MSC (MNSC: MSC-derived NSC-like cells; NSC: neural stem cell). Verschiedene Studien zeigen, dass Knochenmarkstammzellen eine hohe Plastizität besitzen und unter geeigneten Bedingungen in alle drei für die Embryonalentwicklung charakteristischen Zelltypen (mesodermal, endodermal und ektodermal) differenziert werden können [19, 31, 33, 40].

Hierbei ist für unsere Versuche vor allem das neuroektodermale Differenzierungspotential von Interesse, d.h. die Differenzierung in Zellen wie Astrozyten, Oligodendrozyten oder Neurone [19, 31, 40, 50, 67]. Die proneural-konvertierten MSC wurden, im Unterschied zu Transplantationsstudien mit nativen MSC, von uns erstmals transplantiert [50].

Zum anderen wurden humane Nabelschnurblutzellen (UBC: umbilical cord blood cells) und daraus proneural-konvertierte UBC (UNSC: UBC-derived NSC-like cells) transplantiert. Auch hier deuten erste Untersuchungen auf ein neurales Differenzierungspotential dieser Zellen hin [10, 22]. In dem hier verwendeten Tiermodell wurde bereits in anderen Studien durch Gabe von menschlichen Nabelschnurblutzellen ein positiver Effekt auf den Symptombeginn und die Lebenszeit beobachtet [17, 22].

## **1.4 Fragestellung**

Diese Studie ist Teil eines größeren Projekts, bei dem einem Mausmodell der ALS Stammzellen in die Cisterna magna transplantiert wurden. Anschließend wurden Daten bezüglich Überlebenszeit und Laufradaktivität gesammelt sowie histologische Untersuchungen an den Tieren vorgenommen [25]. Im Rahmen einer anderen Dissertation wurde die Wanderung der Zellen, deren intrathekale und intraparenchymale Verteilung sowie ihr Differenzierungsgrad untersucht.

Ausgehend von oben aufgeführten Studien kann theoretisch von einem positiven Effekt der Zellen ausgegangen werden. Auf Grund dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die verwendeten Zellen einen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Krankheit haben können. Um dies zu überprüfen, wurden die Mäuse nach der Transplantation zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten histologisch untersucht und die Anzahl der noch vorhandenen spinalen Motoneurone ausgezählt, da diese mit dem Verlauf der Krankheit korreliert. Des Weiteren wurde untersucht, wo sich die in die Cisterna magna injizierten Zellen zehn Tage nach der Transplantation im Liquorsystem des Rückenmarks befanden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### Chemikalien

Alexa 488 goat anti-mouse IgG	Invitrogen, Karlsruhe
BSA	Sigma, USA
Ethanol	Sigma, USA
Eukit	Kindler, Freiburg
Gelatine	Sigma, USA
Hoechst 33342	Sigma, USA
Isopropanol	Sigma, USA
Kresylviolett	Sigma, USA
M-1 Embedding Matrix	Thermo Shandon, Frankfurt
2-Methyl-butan (Isopentan)	Sigma, USA
Mouse-Anti-NeuN	Chemicon, Hofheim
NaCl	Sigma, USA
PBS	Sigma, USA
PFA	Sigma, USA
Succrose	Sigma, USA
Triton X 100	Sigma, USA
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, München
Mounting Medium:	
- Vectashield H-1000 ohne Dapi	Vector Laboratories Inc, USA
- Vectashield H-1200 mit Dapi	Vector Laboratories Inc, USA
Xylol	Sigma, USA
Ziegenserum (goat serum)	DakoCytomation, Dänemark

#### Geräte und Programme

Axio Vision 3.1 und LE Rel. 4.2.	Zeiss, Jena
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Fluoreszenz-Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Kamera AxioCam	Zeiss, Jena
Kühlschrank -80°C	Herafreeze, Heraeus Instruments, Hanau

Kühlschränke:

- GS 1423 Index 24B/001 (-20°C)	Liebherr Premium, Ochsenhausen
- KTP 1730 Index 26/001 (+4°C)	Liebherr Premium, Ochsenhausen
Mikrotom-Kryostat (CM3050S)	Leica Microsystems, Bensheim
Objektträger (SuperFrost Plus)	Menzel Glaser, Braunschweig
Perfusor	Perfusor fm, Braun, Melsungen
Photoshop Software	Adobe Inc, USA

## 2.2 Versuchstiere

Die benötigten Tiere wurden bei Jackson Laboratories (Ben Harbor, USA) erworben und unter Standardbedingungen in der Ulmer Tierversuchsanlage den entsprechenden Richtlinien gemäß gehalten und gefüttert. Die Verwendung der Tiere ist von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums in Tübingen, Referat 35, genehmigt worden (Registriernummer 816).

Transgene B6SJL-Mäuse, die die humane Kupfer-Zink-Superoxiddismutase-G93A-Mutation trugen, wurden mit nicht transgenen B6SJL-Mäusen gekreuzt. Die transgene Mauslinie wurde bereits früher etabliert und detailliert charakterisiert [24]. Die Genotypisierung der transgenen Mäuse wurde mittels Polymerasekettenreaktion von Mauschwanz-DNA (DNA: Desoxyribonukleinsäure) durchgeführt [24].

Der Krankheitsverlauf der Tiere wird in zwei Stadien eingeteilt [24]. Das Frühstadium beginnt um den 55. Lebenstag und ist durch klinisch sich nicht auswirkende histopathologische Läsionen, die auch bei der sALS zu finden sind, gekennzeichnet. Es kommt zu Fragmentierung des Golgi-Apparates, dendritischen Vakuolen, Axonschwellung, Astroglie, Ubiquitin- und Lewy-ähnlichen Einschlüssen, dystrophischen Axonen und Aggregation von mutierten Proteinen und Intermediärfilamenten [16, 23, 58].

Erste klinische Symptome wie Reflexsteigerung und feiner Hinterlauffremor sind, ebenso wie ein Fortschreiten der Vakuolisierung, ab Tag 80 bis 90 zu beobachten [2, 12, 23]. Zu diesem Zeitpunkt sind bereits etwa 50% der Motoneurone atrophiert [22, 23], d.h. im Verlauf der Krankheit kommt es zu einem progredienten Verlust der cholinergen  $\alpha$ -Motoneurone.

Das Spätstadium beginnt etwa ab dem 120. Lebenstag und zeigt zunehmende Muskelparesen, hervorgerufen durch die weitere selektive Degeneration der Motoneurone,

vor allem in den Vorderhörnern des Rückenmarks [2, 16]. Eine rapide Verschlechterung führt innerhalb von etwa 2 Wochen zu einer Lähmung in einer oder in mehreren Extremitäten [17, 57]. Wenn die Mäuse sich nicht mehr innerhalb von 30 Sekunden selbst aufrichten können nachdem sie auf die Seite gelegt wurden, wurden sie, um ihnen ein langsames Sterben durch Ateminsuffizienz zu ersparen, getötet. Die Überlebenszeit der Tiere schwankt zwischen 115 und 150 Tagen und beträgt im Mittel etwa 130 Tage [22, 24, 28].

Insgesamt wurden 36 Mäuse für histologische Untersuchungen verwendet. Dabei bestand jede der 6 Gruppen (Kontrolle, CsA, MSC, MNSC, UBC, UNSC) aus 6 Tieren.

## **2.3 Transplantation**

### *2.3.1 Vorbereitung*

#### 2.3.1.1 Vorbereitung der Tiere

Mit Ausnahme der Kontrollgruppe wurden alle Tiere ab ihrem 44. Lebenstag, beginnend einen Tag vor der xenogenen Transplantation, bis zu ihrem Todestag täglich mit Cyclosporin A (CsA) immunsuppressiv behandelt, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern [8]. Die optimale Dosierung mit 40 mg/kg Körpergewicht pro Tag per os wurde in einem Vorversuch, basierend auf der üblicherweise verwendeten intraperitonealen Dosis (i.p.: intraperitoneal) von 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag, ermittelt [22].

Normalerweise erfolgt die Gabe aufgrund der lipophilen Eigenschaften von CsA mittels i.p.-Injektion oder Schlundsonde. Aus Gründen des Tierschutzes und einer erhöhten Infektionsgefahr über einen Zeitraum von bis zu 100 Tagen war dies jedoch nicht zu vertreten. Deshalb wurde CsA verwendet, das oral, in mit Wasser verdünntem Apfelsaft, verabreicht wurde.

Der Kontrollgruppe wurde, ohne Gabe von CsA, nur PBS (PBS: Phosphate buffered saline) intrathekal transplantiert. Die CsA-Gruppe erhielt, zusätzlich zur Transplantation von PBS, CsA oral. Mit dieser Gruppe sollte, da CsA bei durchgängiger Blut-Hirn-Schranke neuroprotektiv wirkt, ein möglicher Effekt von CsA überprüft werden [37, 39].

### 2.3.1.2 Vorbereitung der Zellen

Das Knochenmark enthält verschiedene Arten von Stammzellen, darunter hämatopoetische Stammzellen und Knochenmarkstromazellen. Bei den verwendeten MSC handelt es sich um mesenchymale Stammzellen, die bereits früher ausführlich beschrieben und jenem Protokoll entsprechend gezüchtet und kultiviert wurden [31].

Außerdem wurden MNSC transplantiert, deren Eigenschaften bereits in der Einleitung beschrieben und die, wie die MSC, der angeführten Literatur entsprechend gezüchtet und kultiviert wurden [31].

Als drittes wurden UBC verwendet. Diese Zellen werden durch Punktion der Nabelschnurvenen nach der Plazentalösung bei der Geburt gewonnen. Humane Nabelschnurblutzellen bestehen aus einer gemischten Zellpopulation, die reich an hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen ist [22, 36, 50].

Als letztes wurden aus UBC proneural-konvertierte Zellen (UNSC) transplantiert. Diese Zellen wurden gemäß dem von Buzanska L et al. 2002 veröffentlichten Protokoll gezüchtet und kultiviert [10, 32].

Um die transplantierten Stammzellen 10 Tage nach der Transplantation nachweisen zu können, wurden diese vorher mit Hoechst markiert.

Die Zellen wurden gezählt, in PBS, mit einer Dichte von 10.000 Zellen/ $\mu$ l, suspendiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.3.2 *Durchführung*

Die Stammzellen wurden den Tieren an ihrem 45. Lebenstag mittels stereotaktischer Operation in die Cisterna magna, einer Erweiterung des Subarachnoidalraumes, injiziert.

Nach Narkotisierung wurden die Köpfe der Mäuse in einem stereotaktischen Apparat so fixiert, dass sich die Cisterna magna am höchsten Punkt der Maus befand („concorde-like positioning“). Nach Freipräparierung der atlanto-occipitalen Membran, die sich zwischen Os occipitale und dem Arcus posterior des Atlas entspannt, wurden 10  $\mu$ l Zellsuspension mit insgesamt 100.000 Zellen in eine Spritze aufgezogen. Die Injektions-

spritze wurde an eine Pumpe angeschlossen und anschließend wurde die Nadel in der Mittellinie der atlanto-occipitalen Membran positioniert. Mit einer schnellen Bewegung wurde die gespannte Membran, in den Spalt zwischen Medulla und Cerebellum hinein, durchstoßen, bis die Mitte der Membran auf der Mitte des Nadelschliffs stand. Dies erlaubte den Ausfluss von Liquor über die Nadelspitze, wodurch es möglich war, die Zellsuspension ohne wesentliche Steigerung des Hirndruckes zu verabreichen. Nach Platzierung der Nadel wurde ein großer Tropfen Kochsalzlösung auf das Operationsfeld gegeben, um ein Wiederaustreten der Zellen, das durch Liquordruck und Gravitationskraft verursacht werden kann, zu überprüfen. Über eine Zeitspanne von 10 Minuten wurden die Zellen in die Cisterna magna injiziert. Nach einer Wartezeit von weiteren 10 Minuten, in der die Nadel an Ort und Stelle belassen wurde, wurde die Nadel zurückgezogen und entfernt. Zuletzt wurde die Wunde verschlossen.

## **2.4 Histologie**

### *2.4.1 Perfusion*

Die Mäuse wurden entweder am 55. Lebenstag, d.h. 10 Tage postoperativ, bzw. am 110. Lebenstag, d.h. 65 Tage postoperativ, getötet (siehe unten). Der Zeitpunkt des 55. Lebenstages markiert in etwa den Beginn des asymptomatischen Frühstadiums, der Zeitpunkt mit 110 Lebenstagen in etwa den des Endstadiums.

Der kritische technische Aspekt für die Auswertung der Zellverteilung war, das Zentralnervensystem (ZNS) mit der umgebenden Dura mater zu erhalten und herauszulösen. Da bei einer frischen Präparation das Gewebe dazu zu weich ist, wurden die Tiere in Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit 150 bis 200 µl Chloralhydrat (25%) i.p. (Dosis: 0,36 mg/kg Körpergewicht). Nach 1 bis 3 Minuten wurde wiederholt am Auge der Kornealreflex getestet sowie zwischen den Zehen ein Schmerzreiz gesetzt, um zu überprüfen, ob die Narkose bereits ausreichend wirkte. War dies der Fall, wurde das Tier in eine Halteapparatur eingespannt und das Fell mit 70% Isopropanol befeuchtet. Nun wurde das Fell von Thorax und Abdomen gelöst, der Brustkorb eröffnet und im rechten Herzohr ein Schnitt gesetzt. Nach Kanülierung des linken Ventrikels mit einer Butterfly-Kanüle wurde, zur Entfernung des Blutes aus den Gefäßen, zuerst transkardial mit einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung) vorgespült, bis die aus

dem rechten Atrium herausfließende Flüssigkeit klar war. Daraufhin folgte die Perfusion mit 100 ml 2% PFA über die bereits liegende Kanüle mittels eines Perfusors, der einen konstanten Fluss von 200 ml/h gewährleistete. Zur Nachfixierung wurde die perfundierte Maus vollständig mit 2% PFA bedeckt und über Nacht bei 4°C gelagert.

#### 2.4.2 *Präparation*

Die perfundierten Mäuse wurden am nächsten Tag unter dem Mikroskop vorsichtig einer Präparation des ZNS mit intakter Dura mater („Dura-Präp“) unterzogen. Da die Stammzellen direkt in die Cisterna magna injiziert wurden, war es bei der Präparation nötig die Dura mater zu erhalten und möglichst, ohne etwas zu verletzen, das gesamte ZNS, d.h. Gehirn und Rückenmark in toto, zu entfernen. Wäre die Dura mater entfernt worden, wäre es zu einer Eröffnung des Subarachnoidalraumes gekommen und damit zu einem Verlust der sich dort befindlichen transplantierten Zellen.

Nach Entfernung der umgebenden Strukturen wurde zuerst das Rückenmark, beginnend am kaudalen Ende, frei präpariert und anschließend das Gehirn von den schützenden Knochenstrukturen befreit. Nun wurde das ZNS in 30% Succrose in PBS überführt und darin bei 4°C für 2 bis 3 Tage belassen, bis es zu Boden gesunken war. Durch die Succrose wird dem Gewebe Wasser entzogen, das sonst beim Gefrieren zu einer irreversiblen Zerstörung der Zellen führen würde. Anschließend wurde das ZNS in 2-Methyl-Butan bei -50°C für 2 Minuten gefroren und für mindestens eine Nacht bzw. bis zum Schneiden bei -80°C gelagert.

#### 2.4.3 *Herstellung der Schnitte*

Als erster Schritt wurde das ZNS in zwei Teile geteilt. Die Schnittlinie verlief am Übergang von zervikalem zu thorakalem Rückenmark. Gehirn und zervikales Rückenmark wurden bei einem anderen Teil der Studie verwendet.

Das Rückenmark wurde nun auf Höhe des thorako-lumbalen Übergangs durchschnitten und die beiden restlichen Rückenmarksanteile (zervikal und sakral) wieder eingefroren. Bei den benötigten thorakalen und lumbalen Stücken wurden, jeweils in Richtung des thorako-lumbalen Übergangs gelegen, etwa 1 bis 2 mm entfernt. Die verbleibenden Stücke des Rückenmarks wurden, mit dieser Schnittfläche zu oberst, in M-1 Embedding Matrix auf Trockeneis eingebettet, so dass diese orthogonal und gestreckt auf



der Stempelfläche (dem Probenhalter des Mikrotoms) standen. Bei -20°C wurden mit dem Mikrotom-Kryostat 10 µm dicke horizontale Schnitte in Serien zu je 10 Objektträgern angefertigt, die direkt auf die Objektträger gezogen wurden. Die mit Schnitten beladenen Objektträger wurden bis zu ihrem Gebrauch lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

#### 2.4.4 Färbungen

Um Nervengewebe anzufärben und darzustellen, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten. Es wurde eine immunhistochemische Färbung mit NeuN (NeuN: Neuronal Nuclei) und eine histologische Färbung mit Kresylviolett (Nissl-Färbung) durchgeführt.

##### 2.4.4.1 NeuN-Färbung

Die verwendete NeuN-Färbung wurde bereits 1992 von Mullen RJ et al. beschrieben [44]. Bei NeuN handelt es sich um einen neuronenspezifischen monoklonalen Antikörper. Die beiden beschriebenen Isoformen sind sowohl im Zellkern als auch im neuronalen Zytoplasma lokalisiert. Mit NeuN lassen sich Motoneurone des Rückenmarks anfärben, nicht jedoch alle Klassen von Neurone (nicht z.B. Purkinje-Zellen des zerebralen Kortex) [41].

Das Prinzip der Färbung beruht auf einem indirekten Nachweis des Antigens. Der zum Antigen passende erste Antikörper wird mittels eines zweiten Antikörpers nachgewiesen, der mit Farbstoff markiert ist (indirekte Immunhistochemie).

In Vorversuchen wurden die Zusammensetzung der Lösung zum Blocken freier Bindungen, die Verdünnung des ersten Antikörpers und die Inkubationszeiten optimiert.

Die NeuN-Färbung der benötigten Schnitte wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Die gefrorenen Schnitte wurden, zur Verhinderung von Austrocknung, mit PBS bedeckt und für 5 Minuten aufgetaut. Anschließend wurde zur Reduzierung der unspezifischen Antikörperbindungen 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Zum Blocken auf dem Rüttelinkubator wurde eine Mischung aus PBS, 0,1% Triton X 100, 0,05% Tween 20, 1% BSA (Rinderserumalbumin) und 0,1% Gelatine sowie 2% Ziegenserum verwendet. Dabei übernimmt das Ziegenserum die Hauptfunktion beim Blocken und verhindert unspezifische Bindungen von Primär- und Sekundärantikörpern ans Gewebe.

Anschließend wurden die Schnitte mit dem ersten Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Dazu wurde Mouse-Anti-NeuN in PBS, 0,1% Gelatine und 1% BSA im Verhältnis 1:500 verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 2 Minuten wurde der zweite Antikörper, Alexa 488 goat anti-mouse IgG, 1:500 in PBS verdünnt, aufgetragen und für weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Dies musste, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern, ebenso wie die sich anschließenden Schritte, in möglichst lichtfreier Umgebung geschehen. Dazu wurden die Objektträger mit Alufolie umwickelt. Um eine bessere Verteilung der Antikörper zu erreichen, wurden auch diese Arbeitsgänge auf dem Rüttelinkubator durchgeführt. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS für jeweils 2 Minuten wurden die Schnitte mit Einbettmedium bedeckt, das Dapi, einen DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, enthielt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop sind im grünen Kanal Neurone bzw. Motoneurone zu sehen (NeuN, teilweise mit minimaler grünlicher Hintergrund-Färbung) sowie im blauen Kanal blau leuchtende Kerne (Dapi, mit leichter zytoplasmatischer Färbung).

#### 2.4.4.2 Nissl-Färbung

Um Nervengewebe spezifisch anzufärben sowie seine Bestandteile selektiv darzustellen gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten. Zu den gängigsten Färbungen gehört die hier angewandte Nissl-Färbung, bei welcher der verwendete Farbstoff Kresylviolett basophile Strukturen wie z.B. die ribonukleinsäurereichen Schollen in Nervenzellen anfärbt. Diese werden aufgrund ihrer Anordnung auch als Nissl-Schollen bzw. Nissl-Substanz bezeichnet.

In Vorversuchen wurden optimale Zeiten für Auftauen, Nachfixierung, Entwässerung, der Färbung an sich und der aufsteigenden Alkoholreihe sowie die Zusammensetzung der Färbelösung erarbeitet.

Zur Herstellung der Färbelösung, einer 0,1% wässrigen Kresylviolett-Lösung, wurden 1000 ml destilliertes Wasser mit 1 g Kresylviolett auf dem Magnetrührer verrührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und bis zum Gebrauch bei RT aufbewahrt.

Die Nissl-Färbung wurde bei RT nach folgendem Protokoll durchgeführt: Die eingefrorenen Schnitte wurden 50 Minuten aufgetaut und dabei, zur Verhinderung von Austrocknung, mit PBS bewässert. Anschließend wurde 15 Minuten mit 4% PFA nachfixiert,

zweimal 2 Minuten mit PBS gespült und erneut für 15 Minuten mit PBS gewaschen. Unter dem Abzug wurden die Objektträger nun für 15 Minuten in Kresylviolett gefärbt. Die sich anschließende aufsteigende Alkoholreihe bestand aus Eintauchen in destilliertes Wasser, Eintauchen in 70% Ethanol (jeweils etwa eine Sekunde), sowie für zweimal 2 Minuten in 100% Isopropanol. Abgeschlossen wurde mit Xylol (erst für 3, dann für 5 Minuten). Die Schnitte wurden mit Eukit eingedeckelt und bei -20°C gelagert.

Als Ergebnis sieht man im Lichtmikroskop die durch das Kresylviolett violett bzw. blau gefärbten Kerne, Nissl-Schollen und Ergastoplasma. Zytoplasma der Ganglienzellen und Gliazellen erscheinen blassblau, Zellfortsätze bleiben ungefärbt [48].

#### 2.4.4.3 Hoechst-Färbung

Die Markierung der transplantierten Zellen mit Hoechst wurde bereits vor der Transplantation durchgeführt. Durch das DNA-Färben sieht man die Zellen im blauen Kanal des Fluoreszenzmikroskops als blaue, intensiv leuchtende Punkte.

## **2.5 Auswertung**

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops und angeschlossener Kamera, mit welcher die fotografische Dokumentation möglich war. Zur Orientierung diente die im Querschnitt des Rückenmarks deutlich sichtbare Fissura mediana anterior sowie die Schmetterlingsform der zentralen grauen Substanz.

Die aufgenommenen Bilder wurden mit der Adobe Photoshop Software und mittels manueller Zähluhr ausgewertet. Zur Vermeidung von Mehrfachzählungen wurden die bereits gezählten Zellen mit einem Punkt markiert. Die einzelnen Bilder wurden nur einmal ausgezählt. Die Zählung wurde jedoch sowohl bei Auswertung der gefärbten Schnitte als auch bei Auswertung der nativen Objektträger auf transplantierte Zellen hin randomisiert und verblindet durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe einer in Excel erstellten Pivot-Tabelle ausgewertet [61].

Unabhängig von der verwendeten Färbung wurden die Schnitte mit Hilfe eines Mausatlases den einzelnen Segmenten des Rückenmarks zugeordnet [52].

### 2.5.1 *NeuN*

Zum Aufnehmen der NeuN-gefärbten Schnitte wurde der grüne Kanal des Fluoreszenzmikroskops verwendet und die Belichtung so gewählt, dass sie nicht den Sensitivitätsbereich der Kamera überschritt. Die Präparate wurden sowohl mit 10-facher als auch mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die 10-fache Vergrößerung diente zur Einstellung der Mitte des Ausschnittes. Dazu wurde in dem entsprechenden Vorder- bzw. Hinterhorn der grauen Substanz ein möglichst zentral gelegener Ausschnitt gewählt, so dass der ganze Bildausschnitt mit Motoneurone gefüllt war. Die 20-fache Vergrößerung diente zur Auswertung, um die lokale Zahl der Motoneurone zu bestimmen.

Die Mikroskopvergrößerung wurde so gewählt, dass sie groß genug war, um Gewebestrukturen eindeutig und ohne Schwierigkeiten erkennen zu können, dabei aber auch so niedrig wie möglich, um eine möglichst große Analysefläche abzudecken.

Bei jeder Maus wurden thorakales und lumbales Rückenmark untersucht, wobei pro Maus pro Rückenmarksabschnitt zwei Querschnitte verwendet wurden. Es wurden sowohl Vorder- als auch, zum Vergleich, Hinterhörner untersucht.

Gezählt wurden alle grün leuchtenden Zellen, die eindeutig vom Hintergrund abgrenzbar waren. Da NeuN für Neurone, jedoch nicht für Motoneurone spezifisch ist, wurden auch andere Neurone mitgezählt.

### 2.5.2 *Nissl*

Die mit Nissl gefärbten Präparate wurden im Fluoreszenzmikroskop mit Durchlicht bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Auch hier wurde sowohl thorakales als auch lumbales Rückenmark untersucht, jedoch nur die Vorderhörner mit drei Querschnitten pro Rückenmarksabschnitt.

Da nur die Vorderhörner ausgewertet werden sollten, wurden als Grenzen zwei senkrecht aufeinander stehende Linien durch den Mittelpunkt des Zentralkanals gezogen, um so Vorder- und Hinterhörner sowie links und rechts voneinander zu trennen. Gezählt wurden alle Zellen, die einen eindeutig abgrenzbaren Kern aufwiesen.

### 2.5.3 *Hoechst*

Zur Wiederauffindung der transplantierten Zellen wurden die Objektträger ohne zusätzliche Färbung im Fluoreszenzmikroskop (blauer Kanal, 10-fache Vergrößerung) betrachtet. Auf Höchst-markierte, transplantierte Zellen hin untersucht wurden jeweils die Mäuse der transplantierten Gruppen an Tag 55, nicht jedoch CsA- oder Kontroll-Mäuse. Mäuse, die erst an Tag 110 histologisch untersucht wurden, erhielten unmarkierte Stammzellen transplantiert, da Hoechst partiell zelltoxische Effekte verursachen kann. Pro Maus und pro Rückenmarksabschnitt wurden je zwei zufällig ausgewählte komplette Objektträger betrachtet, d.h. alle Schnitte, die auf dem Objektträger waren, sind zur Auswertung verwendet worden.

Da die mit Hoechst markierten Zellen nur im blauen Kanal sichtbar sind, wurde als Kriterium angelegt, dass nur die als Zellen zu identifizierenden „Punkte“ zu zählen sind, die im blauen, jedoch nicht im grünen oder roten Kanal des Fluoreszenzmikroskops sichtbar sind. Außerdem war die Größe (sehr klein im Gegensatz zu den anderen Strukturen) und die runde Form maßgebend, um die Zellen von Verschmutzungen unterscheiden zu können. Die Auswertung erfolgte für jeden Objektträger einzeln.

### 2.5.4 *Statistische Verfahren*

Alle gezeigten Daten zeigen die ursprünglich erhobenen Werte. Mittelwerte und Standardabweichung (s) sind als solche gekennzeichnet.

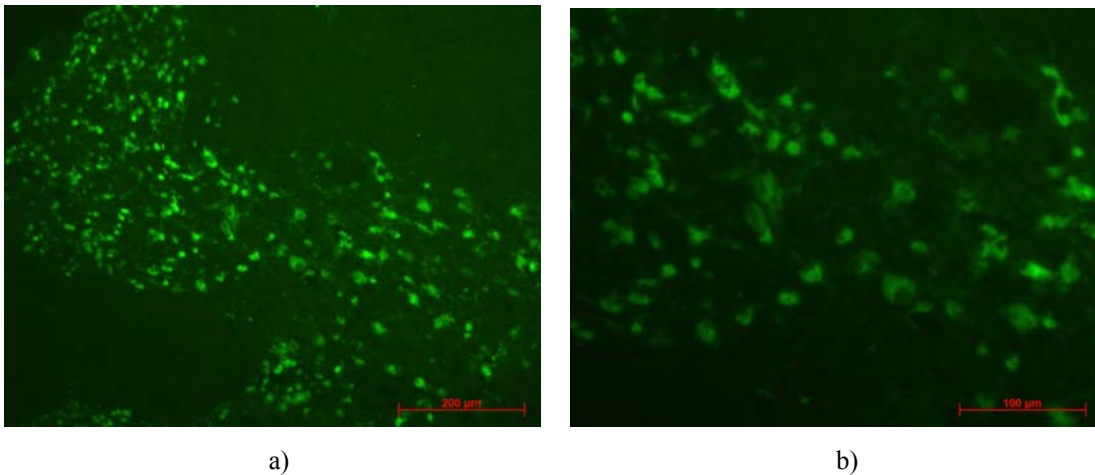
Zum Vergleich der aus den Rohdaten errechneten Mittelwerte wurde der zweiseitige t-Test verwendet, dessen Ergebnis bei einem Wert von  $p < 0,05$  signifikant ist.

### 3 Ergebnisse

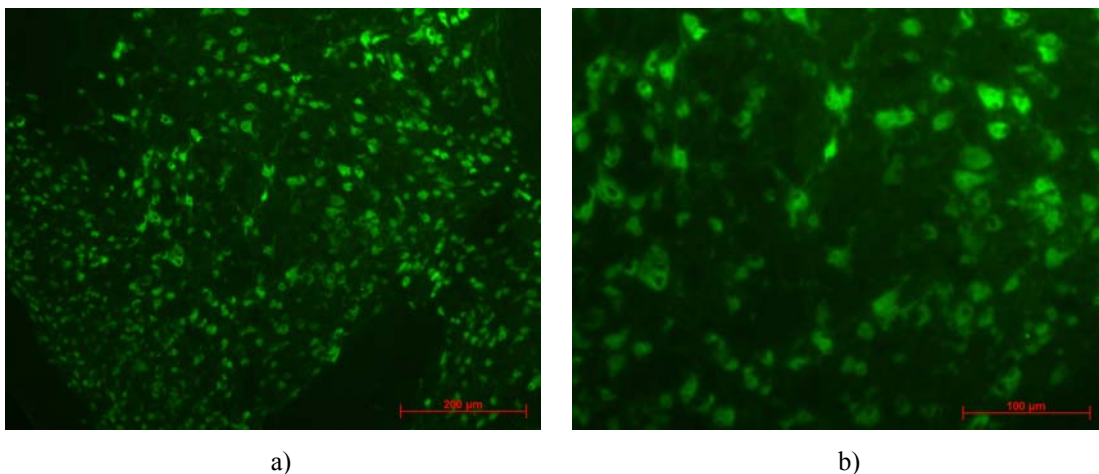
#### 3.1 Bilder

Das folgende Kapitel zeigt beispielhaft einige Bilder mit verschiedenen Färbungen (NeuN oder Nissl) und Vergrößerungen (10- oder 20-fach) die zur Auswertung verwendet wurden. Es handelt sich um unterschiedliche Behandlungsgruppen.

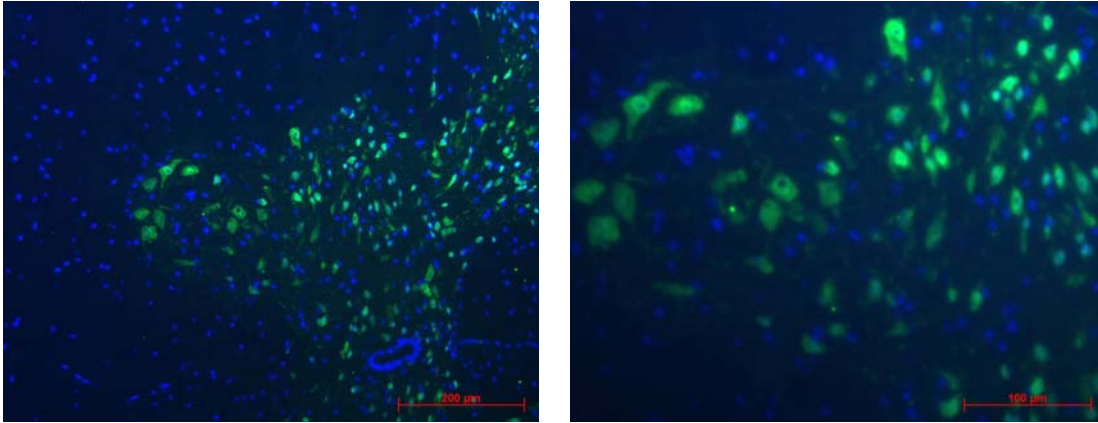
##### 3.1.1 *NeuN*



**Abbildung 1:** Es handelt sich um ein linkes Hinterhorn aus dem thorakalen Abschnitt einer mit MNSC (proneural-konvertierte mesenchymale Stammzellen) behandelten Maus in 10-facher (a) und 20-facher Vergrößerung (b), die an Tag 65 post transplantationem untersucht wurde. Sichtbar sind mit NeuN (Neuronal Nuclei) grün angefärbte Neurone. Der Maßstabsbalken zeigt eine Länge von 200  $\mu\text{m}$  (a) bzw. 100  $\mu\text{m}$  (b).



**Abbildung 2:** Es handelt sich um ein linkes Hinterhorn aus dem lumbalen Abschnitt einer mit CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A) behandelten Maus in 10-facher (a) und 20-facher Vergrößerung (b), die an Tag 10 post transplantationem untersucht wurde. Sichtbar sind mit NeuN (Neuronal Nuclei) grün angefärbte Neurone. Der Maßstabsbalken zeigt eine Länge von 200  $\mu\text{m}$  (a) bzw. 100  $\mu\text{m}$  (b).

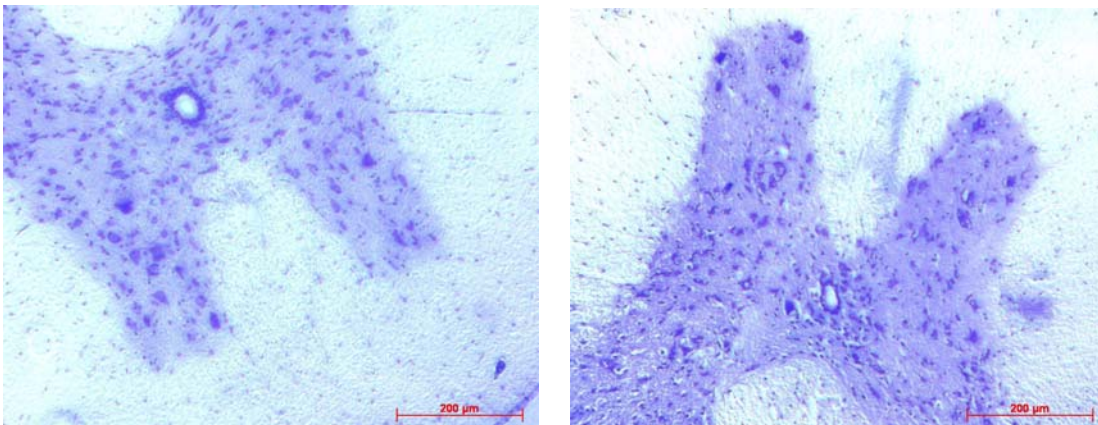


a)

b)

**Abbildung 3:** Es handelt sich um ein rechtes Vorderhorn aus dem thorakalen Abschnitt einer mit UBC (Nabelschnurblutzellen) behandelten Maus in 10-facher (a) und 20-facher Vergrößerung (b), die an Tag 11 post transplantationem untersucht wurde. Sichtbar sind mit NeuN (Neuronal Nuclei) grün angefarbte Neurone sowie mit Dapi blau angefarbte Zellkerne. Der Maßstabsbalken zeigt eine Länge von 200  $\mu\text{m}$  (a) bzw. 100  $\mu\text{m}$  (b).

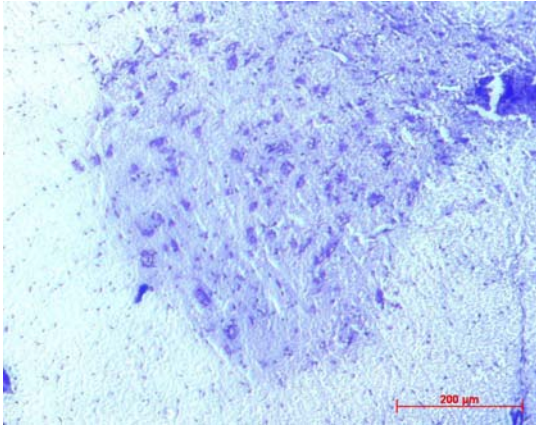
### 3.1.2 Nissl



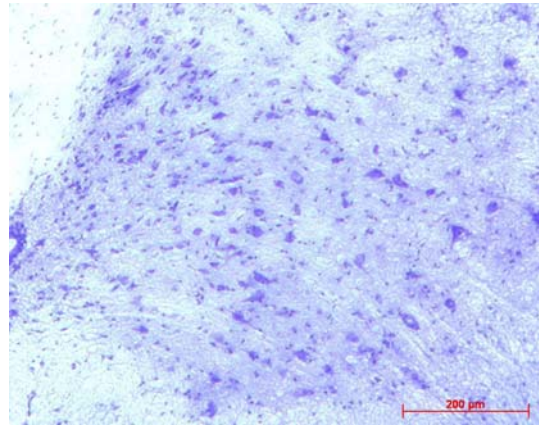
a)

b)

**Abbildung 4:** Die Bilder zeigen mit Nissl angefarbte Querschnitte des thorakalen Rückenmarks bei 10-facher Vergrößerung. Die Tiere gehören der Kontrollgruppe (a) und der mit MSC (b) (mesenchymale Stammzellen) behandelten Gruppe an, die 11 (a) bzw. 10 Tage (b) post transplantationem untersucht wurden. Der Maßstabsbalken zeigt jeweils eine Länge von 200  $\mu\text{m}$ .

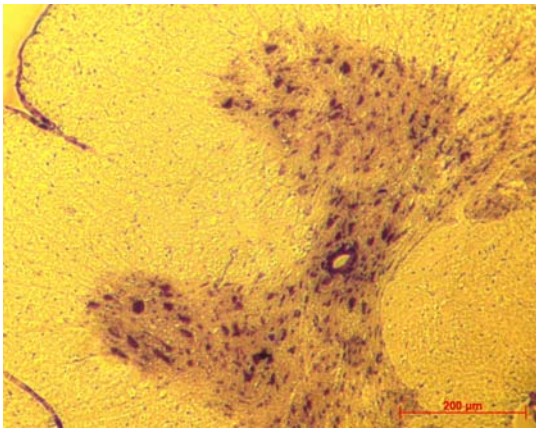


a)

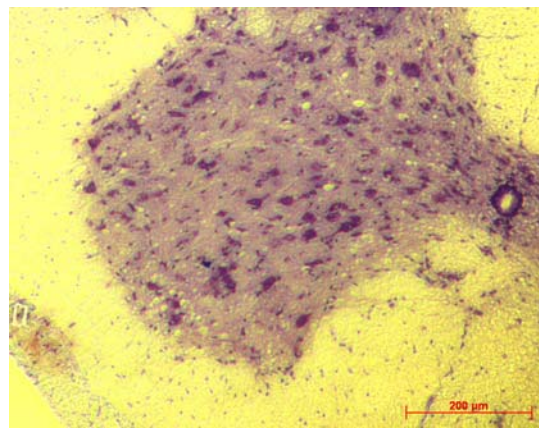


b)

**Abbildung 5:** Die mit Nissl angefärbten Querschnitte in 10-facher Vergrößerung entstammen dem lumbalen Abschnitt des Rückenmarks. In a) handelt es sich um ein rechtes Vorderhorn einer mit MNSC (proneural-konvertierte mesenchymale Stammzellen) behandelten Maus 10 Tage post transplantationem, in b) um ein linkes Vorderhorn einer Maus der Kontrollgruppe 65 Tage post transplantationem. Der Maßstabsbalken zeigt jeweils eine Länge von 200  $\mu\text{m}$ .



a)



b)

**Abbildung 6:** Zu sehen sind mit Nissl angefärbte Querschnitte der mit UBC (Nabelschnurblutzellen) behandelten Gruppe 65 Tage post transplantationem in 10-facher Vergrößerung. Es handelt sich dabei um eine Abbildung aus dem thorakalen Abschnitt (a) bzw. um ein rechtes Vorderhorn aus dem lumbalen Abschnitt (b). Der Maßstabsbalken zeigt jeweils eine Länge von 200  $\mu\text{m}$ .



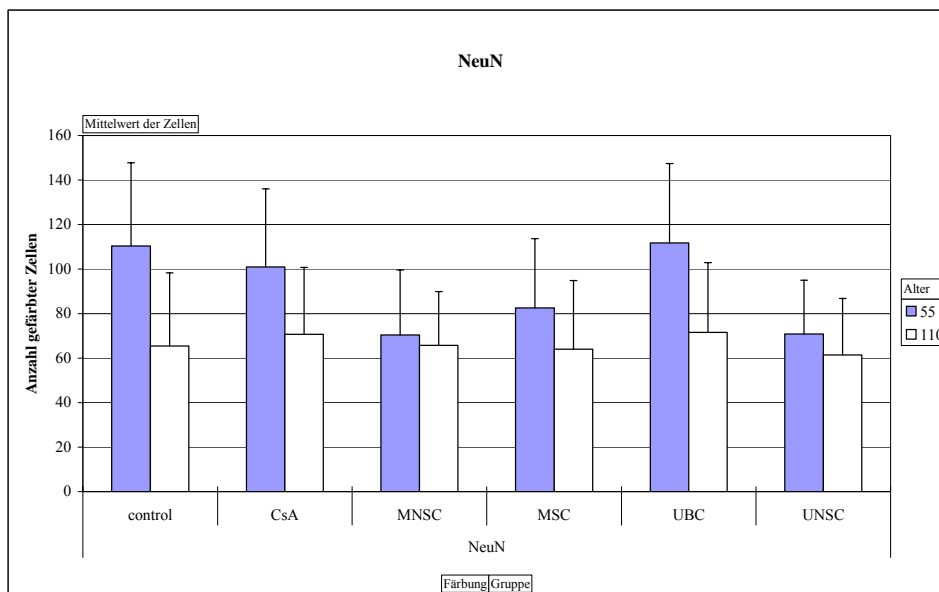
## 3.2 Diagramme

Die folgenden Diagramme zeigen die Mittelwerte der gezählten Zellen, gegebenenfalls mit entsprechend eingezeichneter Standardabweichung.

### 3.2.1 NeuN

#### 3.2.1.1 NeuN Übersicht

Aufgeteilt nach den einzelnen Behandlungsgruppen zeigt das folgende Diagramm, dass die zusammengefasste Anzahl der gezählten, mit NeuN angefärbten Zellen, an Tag 110 tendenziell überall geringer ist als an Tag 55. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (t-Test mit  $p > 0,05$ ).

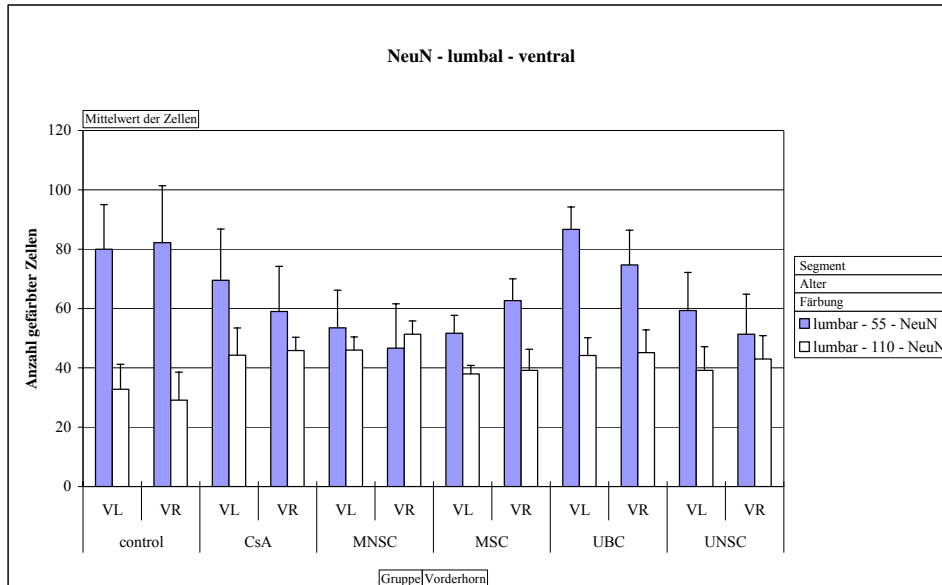


**Abbildung 7:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone (thorakales und lumbales Rückenmark). Die einzelnen Gruppen sind aufgeführt mit control (Kontrollgruppe), CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A), MNSC (proneural-konvertierte MSC), MSC (mesenchymale Stammzellen), UBC (Nabelschnurblutzellen) und UNSC (proneural-konvertierte UBC).

Bei der Kontrollgruppe (41%) sowie bei der UBC- (36%) und der CsA-Gruppe (30%) beträgt die prozentuale Abnahme der gezählten Zellen von Tag 55 auf Tag 110 jeweils etwa ein Drittel, wohingegen es bei den Gruppen MSC (23%) und UNSC (14%) zu einer gebremsten, bei MNSC (6%) zu fast keiner Abnahme kommt. Bei der UNSC- und der MNSC-Gruppe sind die Werte zu Behandlungsbeginn schon relativ niedrig.

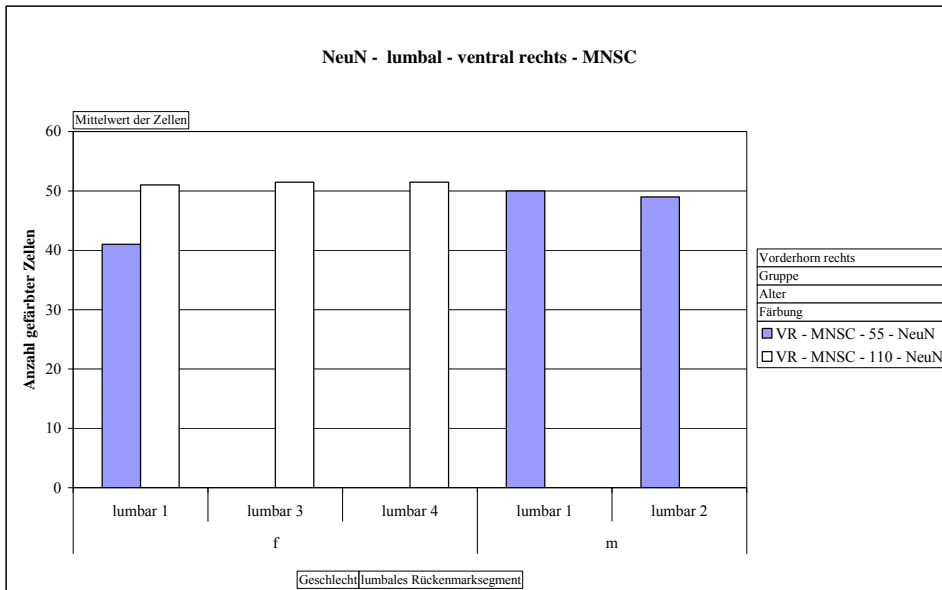
### 3.2.1.2 NeuN – lumbal – ventral

Auch hier ist die Anzahl der Zellen an Tag 110 geringer als an Tag 55 (mit Ausnahme von MNSC behandelten Tieren im rechten Vorderhorn).



**Abbildung 8:** Dargestellt werden die Mittelwerte des lumbalen Rückenmarks von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone. Die einzelnen Gruppen sind aufgeführt mit control (Kontrollgruppe), CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A), MNSC (proneural-konvertierte MSC), MSC (mesenchymale Stammzellen), UBC (Nabelschnurblutzellen) und UNSC (proneural-konvertierte UBC). Eine weitere Unterteilung erfolgt nach linkem (VL) und rechtem Vorderhorn (VR).

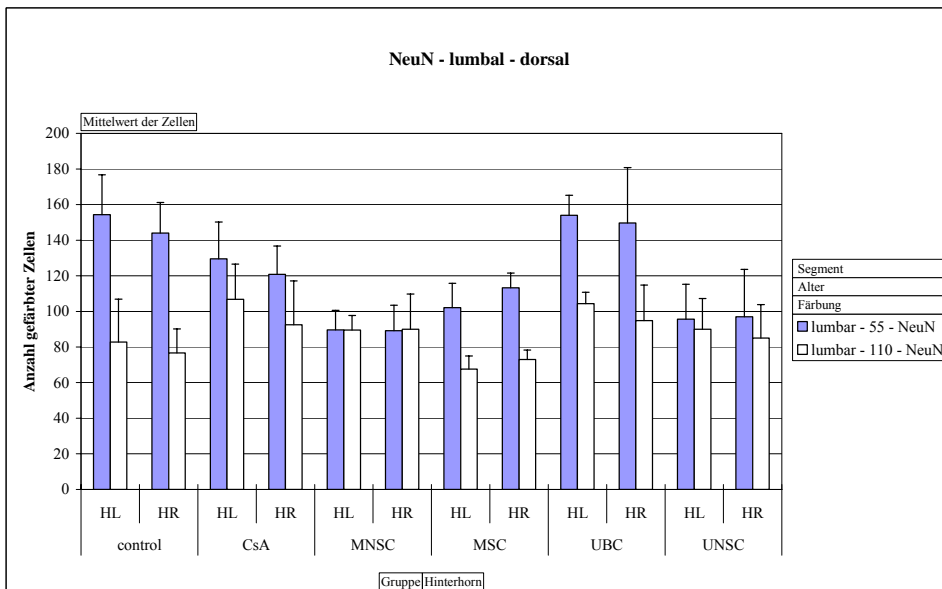
Bei Darstellung aufgesplittet nach den einzelnen Rückenmarksegmenten und dem Geschlecht wird deutlich, dass nur ein Wert, bei weiblichen Tieren auf Höhe von L1, auffällig ist. An Tag 110 wurden keine männlichen Tiere untersucht, so dass kein Vergleich möglich ist. Da bei den weiblichen Tieren nur auf Höhe von L1 zwei Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht wurden, ist nur hier ein Vergleich möglich.



**Abbildung 9:** Dargestellt werden die Werte der einzelnen lumbalen Rückenmarksegmente von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone. Nach weiblichen (f) und männlichen Tieren (m) getrennt sind die Daten der MNSC-Gruppe (proneural-konvertierte mesenchymale Stammzellen) des rechten Vorderhorns dargestellt.

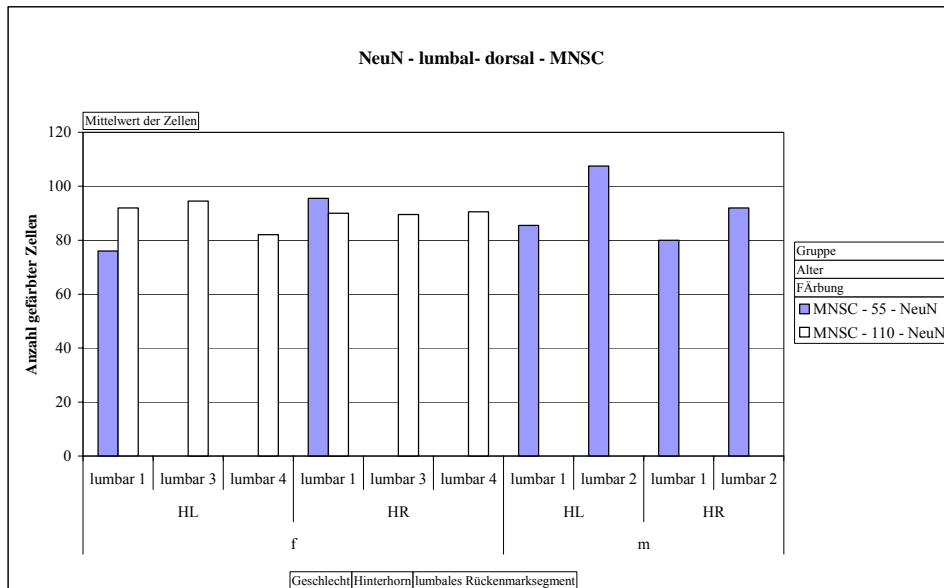
### 3.2.1.3 NeuN – lumbal – dorsal

Die Zellzahl ist an Tag 110 überall geringer als an Tag 55, jedoch ist sie bei der MNSC-Gruppe im linken Hinterhorn gleich bzw. im rechten Hinterhorn minimal höher.



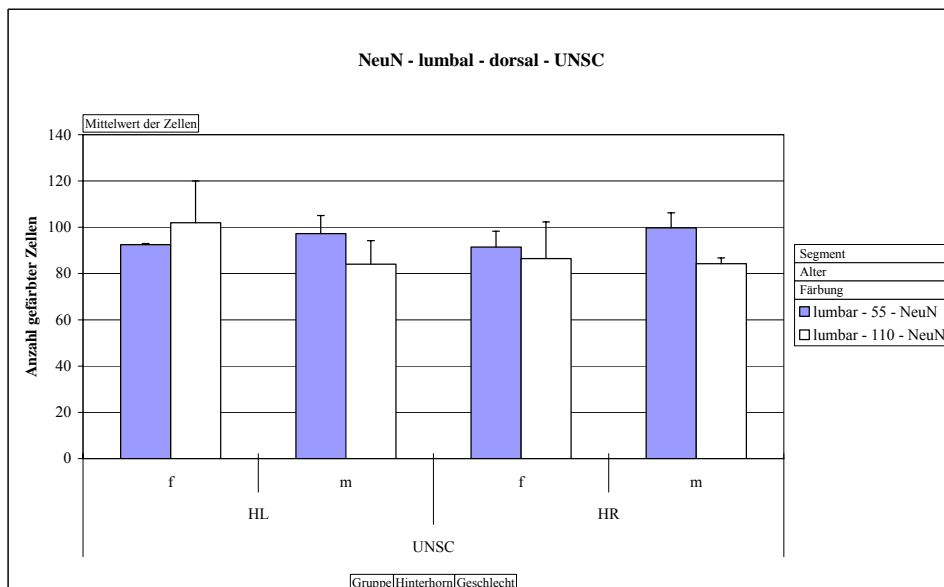
**Abbildung 10:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone des lumbalen Rückenmarks. Die einzelnen Gruppen sind aufgeführt mit control (Kontrollgruppe), CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A), MNSC (proneural-konvertierte MSC), MSC (mesenchymale Stammzellen), UBC (Nabelschnurblutzellen) und UNSC (proneural-konvertierte UBC). Eine weitere Unterteilung erfolgt nach linkem (HL) und rechtem Hinterhorn (HR).

Bei genauerer Betrachtung wird deutlich, dass auch hier nur bei weiblichen Tieren auf Höhe von L1 eine Auffälligkeit besteht. Auch hier ergibt sich nach Aufteilung nach dem Geschlecht und den einzelnen Rückenmarksegmenten nur dort eine Vergleichsmöglichkeit.



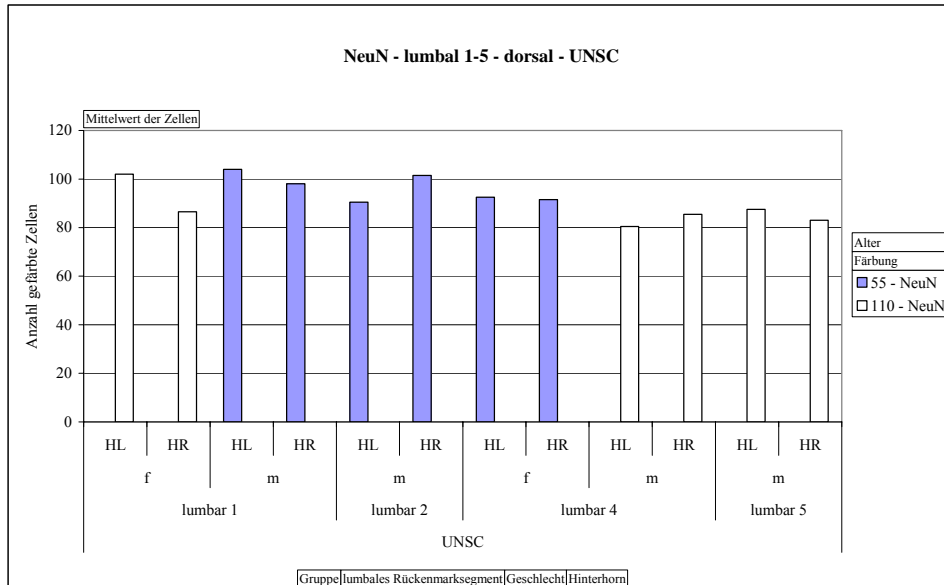
**Abbildung 11:** Dargestellt werden die Werte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone. Aufgeführt ist die MNSC-Gruppe (proneural-konvertierte mesenchymale Stammzellen), aufgeteilt nach lumbalen Rückenmarksegmenten, linkem (HL) und rechtem Hinterhorn (HR) sowie dem Geschlecht (f: weiblich, m: männlich).

Ohne in der Gesamtübersicht aufzufallen, kommt es auch in der mit UNSC behandelten Gruppe an Tag 110 zu einer, im Vergleich zu Tag 55, höheren Zahl an angefärbten Zellen (im linken Hinterhorn bei den weiblichen Tieren).



**Abbildung 12:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone. Aufgeführt sind die Daten der UNSC-Gruppe (proneural-konvertierte Nabelschnurblutzellen), aufgeteilt nach Geschlecht (f: weiblich, m: männlich) und linkem (HL) und rechtem Hinterhorn (HR).

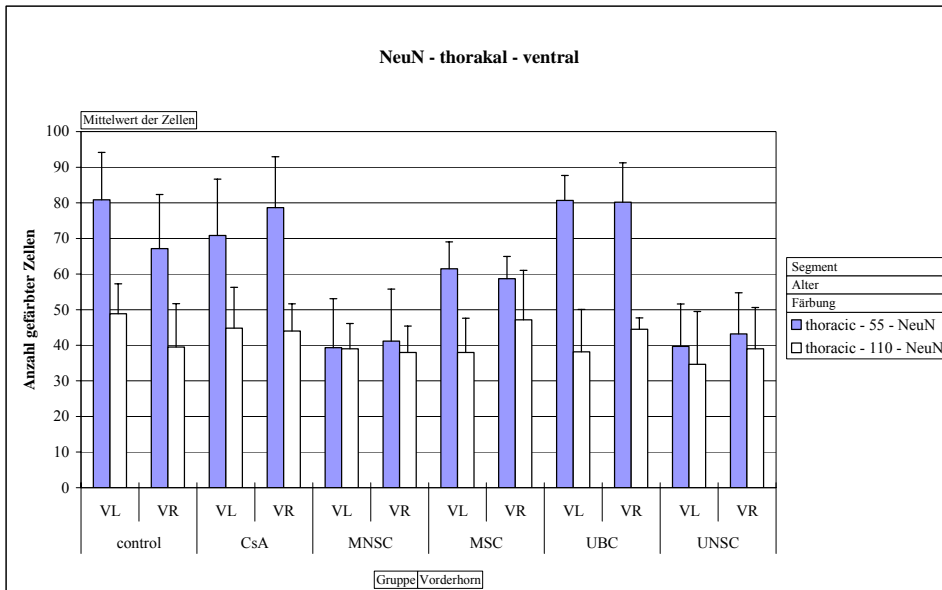
Bei Anordnung nach den verschiedenen Rückenmarksegmenten wird deutlich, dass diese zwar eine unterschiedliche Anzahl NeuN-positiver Zellen aufweisen, jedoch gestattet ein Vergleich über verschiedene Rückenmarksegmente keine verlässliche Aussage, da Vergleichsdaten fehlen.



**Abbildung 13:** Dargestellt werden die Werte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone der mit UNSC (proneural-konvertierte Nabelschnurblutzellen) behandelten Gruppe. Eine Unterteilung erfolgt nach einzelnen Rückenmarksegmenten, dem Geschlecht (f: weiblich, m: männlich) sowie linkem (HL) und rechtem Hinterhorn (HR).

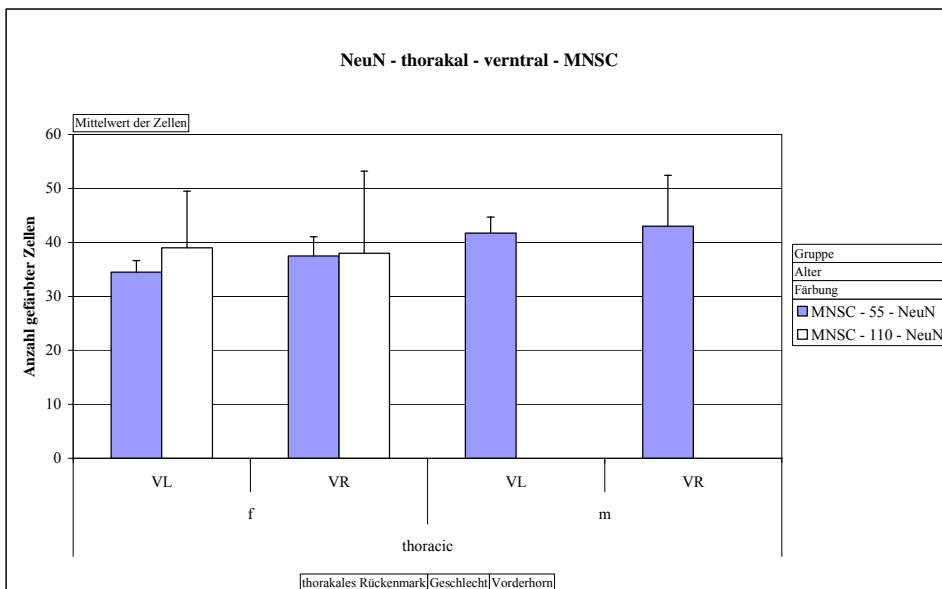
### 3.2.1.4 NeuN – thorakal – ventral

Auch im thorakalen Abschnitt fällt nur ein Wert auf: bei der MNSC-Gruppe sind die Werte an Tag 55 und 110 gleich, in den anderen Gruppen sind sie an Tag 110 überall geringer.



**Abbildung 14:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone des thorakalen Rückenmarks. Die einzelnen Gruppen sind aufgeführt mit control (Kontrollgruppe), CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A), MNSC (proneural-konvertierte MSC), MSC (mesenchymale Stammzellen), UBC (Nabelschnurblutzellen) und UNSC (proneural-konvertierte UBC). Eine weitere Unterteilung erfolgt nach linkem (VL) und rechtem Vorderhorn (VR).

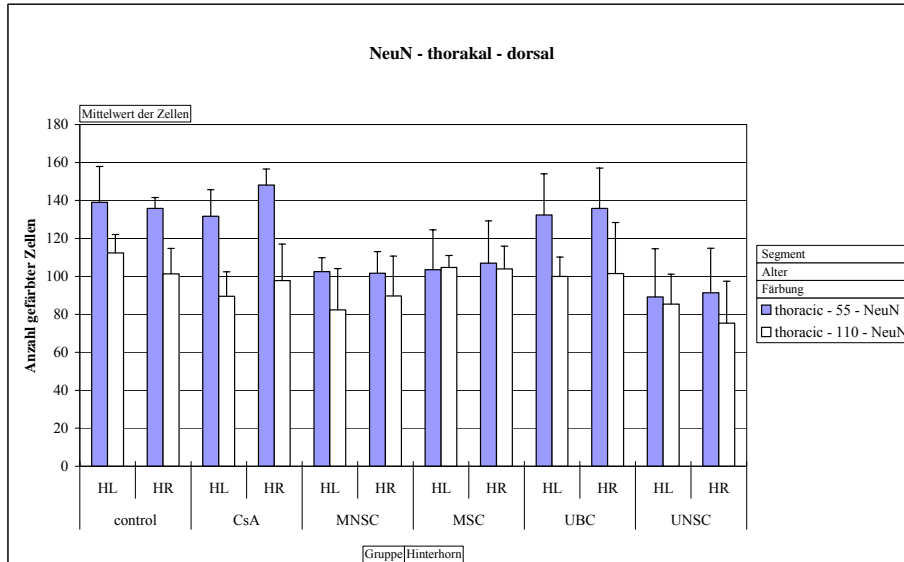
Bei genauerer Betrachtung fällt auch hier auf, dass weibliche Tiere betroffen sind, sowohl vorne links als auch vorne rechts. Vergleichsdaten von Männchen liegen nicht vor.



**Abbildung 15:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone des thorakalen Rückenmarks. Aufgeführt ist die mit MNSC (proneural-konvertierte mesenchymale Stammzellen) behandelte Gruppe, aufgeteilt nach dem Geschlecht (f: weiblich, m: männlich) sowie nach linkem (VL) und rechtem Vorderhorn (VR).

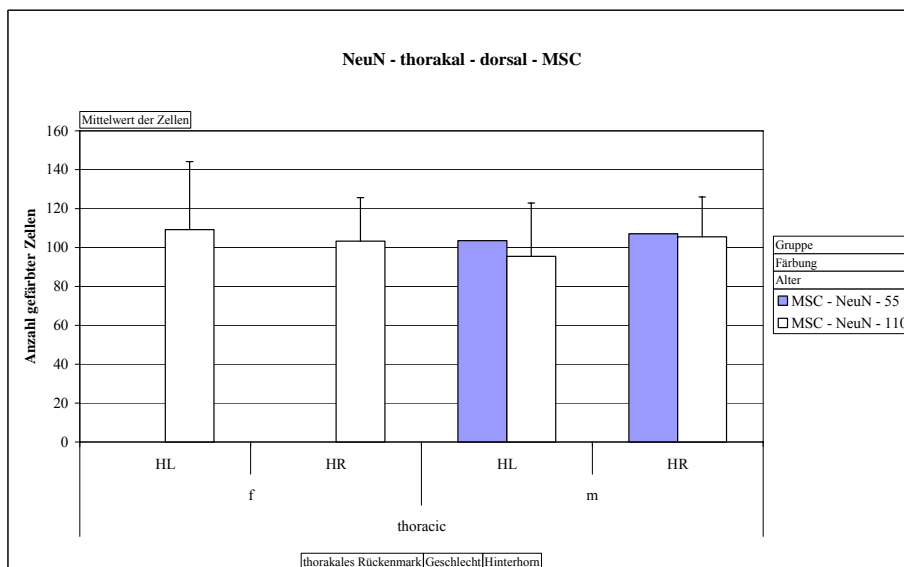
### 3.2.1.5 NeuN – thorakal – dorsal

Auch hier ist die Anzahl der NeuN-positiven Zellen, mit Ausnahme im linken Hinterhorn der MSC-Gruppe, an Tag 55 größer als an Tag 110.



**Abbildung 16:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone des thorakalen Rückenmarks. Die einzelnen Gruppen sind aufgeführt mit control (Kontrollgruppe), CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A), MNSC (proneural-konvertierte MSC), MSC (mesenchymale Stammzellen), UBC (Nabelschnurblutzellen) und UNSC (proneural-konvertierte UBC). Eine weitere Unterteilung erfolgt nach linkem (HL) und rechtem Hinterhorn (HR).

Bei Aufteilung nach dem Geschlecht wird deutlich, dass auch hier die Anzahl der angefärbten Zellen von Tag 55 auf Tag 110 abnimmt.

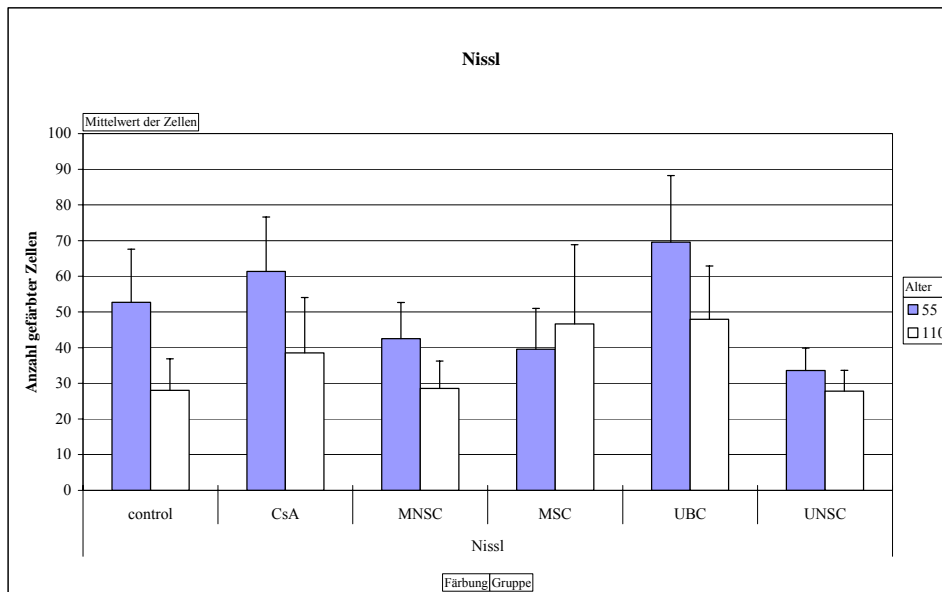


**Abbildung 17:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone des thorakalen Rückenmarks. Aufgeführt ist die mit MSC (mesenchymale Stammzellen) behandelte Gruppe, aufgeteilt nach linkem (HL) und rechtem Hinterhorn (HR) der beiden Geschlechter (f: weiblich, m: männlich).

### 3.2.2 Nissl

#### 3.2.2.1 Nissl Übersicht

Bei Zusammenfassung aller Daten ist auch bei der Nissl-Färbung an Tag 110 eine geringere Zahl als der an Tag 55 gezählten Zellen zu beobachten. Auffällig sind die Werte der mit MSC behandelten Gruppe, bei der diese vergleichsweise höher liegen.



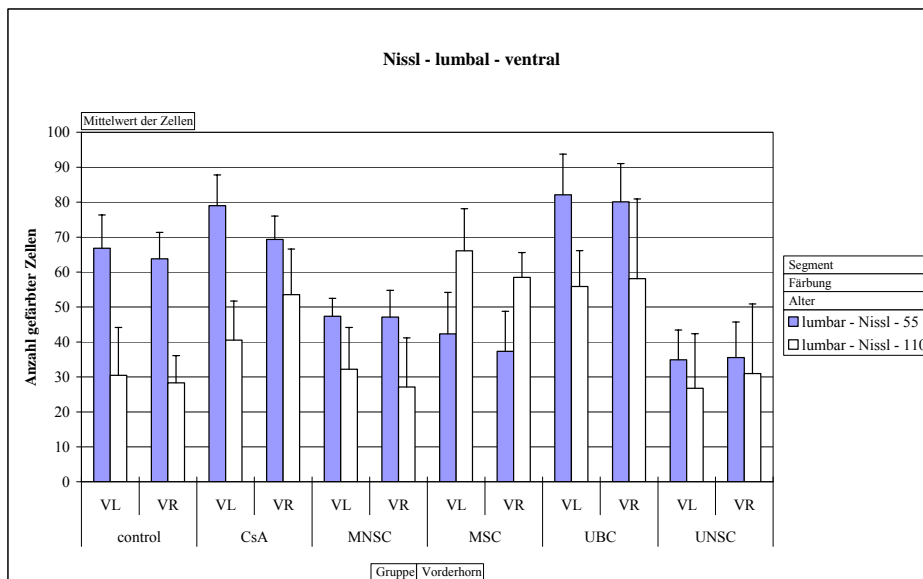
**Abbildung 18:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit Nissl angefärbten Motoneurone. Die einzelnen Gruppen sind aufgeführt mit control (Kontrollgruppe), CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A), MNSC (proneural-konvertierte MSC), MSC (mesenchymale Stammzellen), UBC (Nabelschnurblutzellen) und UNSC (proneural-konvertierte UBC).

Bei der Kontrollgruppe beträgt die Anzahl der gezählten Zellen an Tag 110 fast die Hälfte weniger als an Tag 55 (47% weniger), bei weiteren drei Gruppen beträgt die prozentuale Abnahme etwa ein Drittel (CsA 36%, MNSC 33%, UBC 31%). Auffällig ist eine vergleichsweise geringe prozentuale Abnahme (18%) der mit UNSC behandelten Gruppe (mit den niedrigsten Ausgangswerten an Tag 55) und sogar eine Zunahme der Anzahl der gezählten Zellen bei der Gruppe der mit MSC behandelten Tiere (+18%, von Tag 55 auf Tag 110).

#### 3.2.2.2 Nissl – lumbal – ventral

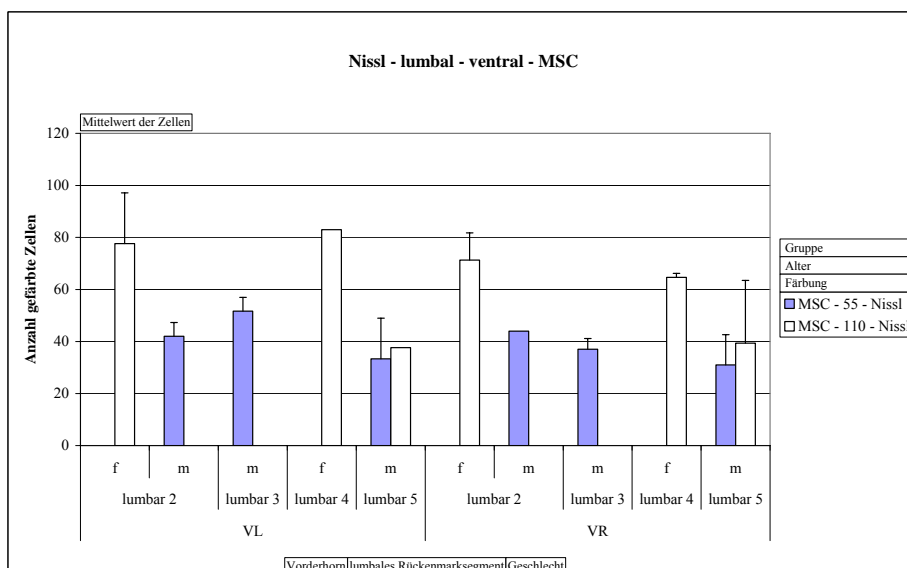
Bei weiteren Untersuchungen wird deutlich, dass sich die an Tag 110 vergleichsweise höheren Werte der MSC-Gruppe nur im lumbalen Rückenmark nachweisen lassen:





**Abbildung 19:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit Nissl angefärbten Motoneurone des lumbalen Rückenmarks. Die einzelnen Gruppen sind aufgeführt mit control (Kontrollgruppe), CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A), MNSC (proneural-konvertierte MSC), MSC (mesenchymale Stammzellen), UBC (Nabelschnurblutzellen) und UNSC (proneural-konvertierte UBC). Eine weitere Unterteilung erfolgt nach linkem (VL) und rechtem Vorderhorn (VR).

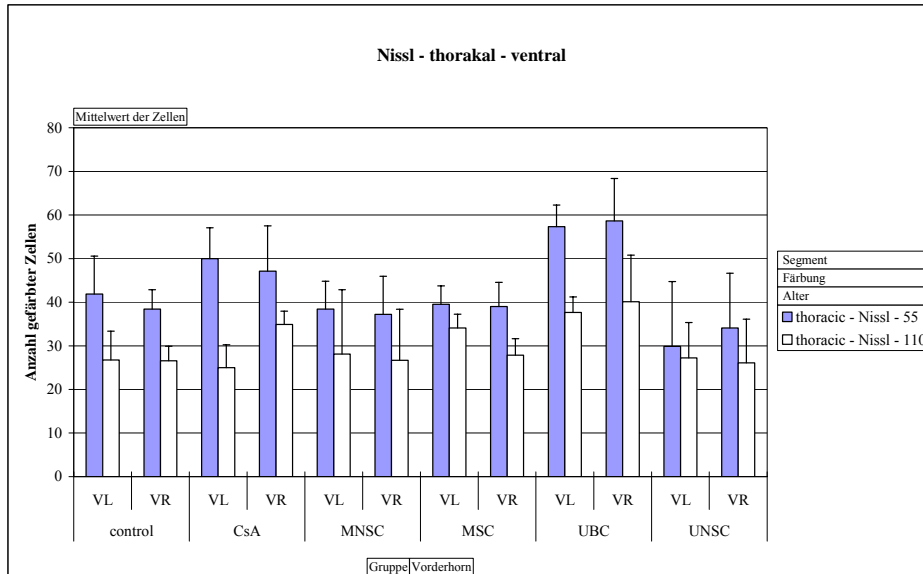
Bei Aufspaltung nach einzelnen Rückenmarksegmenten und dem Geschlecht zeigt sich, bei den miteinander vergleichbaren Werten, dass an Tag 110 ein vergleichsweise höherer Wert als an Tag 55 gefunden wurde (bei männlichen Tieren in beiden Vorderhörnern in L5).



**Abbildung 20:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit Nissl angefärbten Motoneurone des lumbalen Rückenmarks. Aufgeführt ist die mit MSC behandelte Gruppe (mesenchymale Stammzellen). Eine Unterteilung erfolgt nach linkem (VL) und rechtem Vorderhorn (VR), nach Rückenmarksegment und nach dem Geschlecht (f: weiblich, m: männlich).

### 3.2.2.3 Nissl – thorakal – ventral

Bei Auszählung der Nissl-Färbung im thorakalen Bereich des Rückenmarks fallen die Werte an Tag 110 überall geringer aus als an Tag 55.



**Abbildung 21:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 (blau) und Tag 110 (weiß) mit entsprechender Standardabweichung der mit Nissl angefärbten Motoneurone des thorakalen Rückenmarks. Die einzelnen Gruppen sind aufgeführt mit control (Kontrollgruppe), CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A), MNSC (proneural-konvertierte MSC), MSC (mesenchymale Stammzellen), UBC (Nabelschnurblutzellen) und UNSC (proneural-konvertierte UBC). Eine weitere Unterteilung erfolgt nach linkem (VL) und rechtem Vorderhorn (VR).

### 3.2.3 *Sonstiges*

#### 3.2.3.1 Vergleich von NeuN und Nissl

In etwa zwei Drittel der Fälle findet sich bei der NeuN-Färbung eine vergleichsweise höhere Anzahl an angefärbten Zellen als bei der Nissl-Färbung.

#### 3.2.3.2 Geschlechtsunterschiede

Bei dem Vergleich der Zellzahlen zwischen weiblichen und männlichen Tieren war keine einheitliche Tendenz sichtbar. Bei beiden Geschlechtern war, keiner Regelmäßigkeit folgend, die jeweils höhere Anzahl an angefärbten Zellen zu finden.

### 3.3 Transplantierte Zellen

In den folgenden Tabellen ist die Häufigkeit der Anzahl der transplantierten gefundenen Zellen, sortiert nach Zellart, aufgelistet. Da sowohl der Kontroll- als auch der CsA-Gruppe keine Zellen transplantiert wurden, fallen diese hier weg. Angeführt ist, wie häufig jeweils 1 bis 5 einzelne Zellen gefunden wurden bzw. unter „ $\geq 5$  Zellen“ die genaue Anzahl der als Zellhaufen gefundenen Zellen. Die Zellen wurden außerhalb des Rückenmarks superficial dem Rückenmarksquerschnitt anliegend und nicht intraparenchymal gefunden. Bei zwei Zellen konnte man eine minimale intraparenchymale Einwanderung vermuten. Diese sind in den folgenden Tabellen mit einem \* markiert, wobei jeweils eine Zelle und nicht alle vier einzeln gefundenen Zellen gemeint sind.

**Tabelle 1: Anzahl wieder gefundener transplantierte Zellen im thorakalen und lumbalen Abschnitt 10 Tage post transplantationem der MSC-Gruppe (MSC: mesenchymale Stammzellen).**

Maus	1	2	3
Thorakal			
1 Zelle	3	1	1
2 Zellen	1	-	1
3 Zellen	1	-	-
4 Zellen	-	-	-
$\geq 5$ Zellen	-	-	1x6
Ausgewertete Schnitte	28	20	16
Lumbal			
1 Zelle	-	1	-
2 Zellen	3	2	-
3 Zellen	1	-	-
4 Zellen	-	-	-
$\geq 5$ Zellen	1x5, 1x7, 2x8, 1x9	1x5	-
Ausgewertete Schnitte	23	20	16

**Tabelle 2: Anzahl wieder gefundener transplantiertes Zellen im thorakalen und lumbalen Abschnitt 10 Tage post transplantationem der MNSC-Gruppe (MNSC: proneural-konvertierte mesenchymale Stammzellen).**

**Bei der mit \* markierten Zelle wird eine intraparenchymale Einwanderung vermutet.**

Maus	1	2	3
Thorakal			
1 Zelle	4*	5	1
2 Zellen	1	1	-
3 Zellen	1	-	-
4 Zellen	1	1	-
≥ 5 Zellen	3x8	-	-
Ausgewertete Schnitte	25	24	32
Lumbal			
1 Zelle	2	2	1
2 Zellen	1	1	-
3 Zellen	1	-	-
4 Zellen	-	-	-
≥ 5 Zellen	-	2x8	-
Ausgewertete Schnitte	20	20	32

**Tabelle 3: Anzahl wieder gefundener transplantiertes Zellen im thorakalen und lumbalen Abschnitt 11 Tage post transplantationem der UBC-Gruppe (UBC: Nabelschnurblutzellen).**

**Bei der mit \* markierten Zelle wird eine intraparenchymale Einwanderung vermutet.**

Maus	1	2	3	4
Thorakal				
1 Zelle	3	3	-	-
2 Zellen	-	-	-	-
3 Zellen	-	-	-	-
4 Zellen	-	-	-	-
≥ 5 Zellen	-	-	-	-
Ausgewertete Schnitte	22	18	24	24
Lumbal				
1 Zelle	4*	1	-	-
2 Zellen	1	-	-	1
3 Zellen	-	-	-	-
4 Zellen	1	-	-	-
≥ 5 Zellen	-	-	-	-
Ausgewertete Schnitte	15	16	22	18

**Tabelle 4: Anzahl wieder gefundener transplantiertes Zellen im thorakalen und lumbalen Abschnitt 11 Tage post transplantationem der UNSC-Gruppe (UNSC: proneural-konvertierte Nabelschnurblutzellen).**

Maus	1	2	3
Thorakal			
1 Zelle	3	3	-
2 Zellen	-	1	-
3 Zellen	1	-	-
4 Zellen	-	-	-
≥ 5 Zellen	-	-	-
Ausgewertete Schnitte	16	24	28
Lumbal			
1 Zelle	3	1	-
2 Zellen	3	3	-
3 Zellen	-	1	-
4 Zellen	-	-	-
≥ 5 Zellen	-	-	-
Ausgewertete Schnitte	20	18	24

Bei den mit Stammzellen behandelten Gruppen wurden 10 bzw. 11 Tage nach der Transplantation vereinzelt Zellen gefunden, jedoch nur bei MSC und MNSC kleinere Zellhaufen mit mehr als 4 Zellen zusammen. In einigen Mäusen wurden keine Zellen gefunden. Wo Zellhaufen gefunden wurden, vor allem im lumbalen Abschnitt, fanden sich maximal 10 Zellen als Aggregat. Bei den späten Tieren, die 65 Tage nach der Operation untersucht wurden, konnte keine Auswertung gemacht werden, da die transplantierten Zellen nicht mit Hoechst markiert waren.

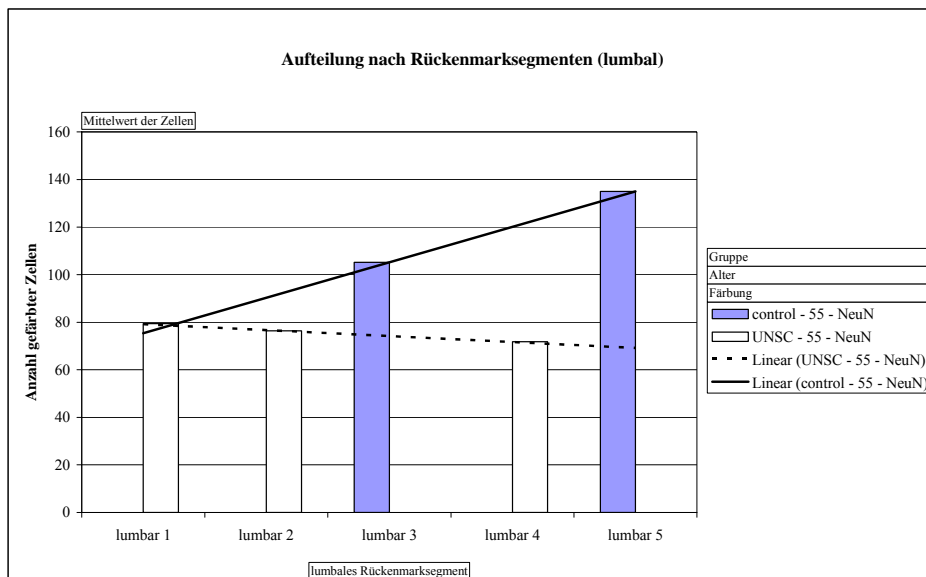
### 3.4 Lumbales Rückenmark

Anhand eines Mausatlases wurden die Schnitte den jeweiligen Rückenmarksegmenten zugeordnet. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Zuordnung für das lumbale Rückenmark. Die ersten drei Mäuse (1-3) zeigen die Ergebnisse für die frühen Tiere (55 Tage), die letzten drei Mäuse (4-6) zeigen die der späten Tiere (110 Tage).

**Tabelle 5: Zu sehen sind die Höhen der lumbalen Rückenmarksegmente (L) der Mäuse (1 bis 6) aus den einzelnen Behandlungsgruppen. Die Gruppen sind: Kontrolle, CsA (Kontrollgruppe für Cyclosporin A), MNSC (proneural-konvertierte MSC), MSC (mesenchymale Stammzellen), UBC (Nabelschnurblutzellen) und UNSC (proneural-konvertierte UBC).**

Maus	1	2	3	4	5	6
Kontrolle	L 3	L 3	L 5	L 4	L 2	L 4
CsA	L 3	L 5	L 2	L 4	L 2	L 2
MNSC	L 1	L 1	L 2	L 1	L 4	L 3
MSC	L 5	L 3	L 2	L 4	L 2	L 5
UNSC	L 5	L 1	L 2	L 4	L 4	L 1
UBC	L1	L2	L5	L3	L 3	L2

Bei weiterer Betrachtung der Ergebnisse des lumbalen Rückenmarks fällt auf, dass es starke interindividuelle Unterschiede geben kann. Als Beispiel sind hier die UNSC- und die Kontrollgruppe gewählt, um zu zeigen, dass es weder eine einheitliche Zu- oder Abnahme der Zellzahl von L1 bis L5 gibt, sondern dies je nach Gruppe unterschiedlich verlaufen kann, bzw. die interindividuellen Unterschiede zu groß sind, um eindeutige Aussagen machen zu können.



**Abbildung 22:** Dargestellt werden die Mittelwerte von Tag 55 der Kontrollgruppe (control; blau) sowie der UNSC-Gruppe (proneural-konvertierte Nabelschnurblutzellen; weiß) der mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbten Motoneurone des lumbalen Rückenmarks, aufgeteilt nach einzelnen Rückenmarksegmenten. Die Regressionsgeraden beziehen sich auf die Kontrollgruppe (schwarz) und die UNSC-Gruppe (gestrichelt).

### 3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit einigen Ausnahmen ist die Zahl der angefärbten Zellen prinzipiell an Tag 110 geringer als an Tag 55. Ausnahmen findet man bei folgenden behandelten Mäusen:

- MNSC NeuN, L1 und thorakal, jeweils ventral und dorsal bei weiblichen Tieren
- UNSC NeuN, lumbal dorsal bei weiblichen Tieren (Vergleichsdaten fehlen)
- MSC Nissl, L5 bei männlichen Tieren vorne links und vorne rechts.

Es wurden an Tag 10 bzw. 11 superficial um die Rückenmarksquerschnitte verteilt vereinzelte Zellen gefunden bzw. in zwei Gruppen (MSC, MNSC) auch kleinere Zellhaufen.

Die Querschnitte des lumbalen Rückenmarks gehören unterschiedlichen Segmenten an (L1 bis L5), dabei fallen starke interindividuelle Unterschiede auf.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Fragestellung**

ALS ist eine Krankheit, bei der sowohl Motoneurone im motorischen Kortex als auch im Vorderhorn des Rückenmarks zu Grunde gehen. Ziel der vorliegenden Dissertation war es zu untersuchen, inwieweit die in die Cisterna magna transplantierten Zellen einen Effekt auf die Überlebenszeit der Motoneurone im Rückenmark haben und somit den Verlauf der Krankheit beeinflussen. Aufgrund von anderen Studien wurde von einem positiven Effekt ausgegangen [13, 14, 17, 22].

### **4.2 Methodik**

#### *4.2.1 Histologie*

Ein wichtiger Faktor für das Gelingen der beiden verwendeten Färbungen, Nissl und NeuN, war die vor der Präparation stattfindende Perfusion der Tiere. Durch eine transkardiale Perfusion wurde das gerinnbare Blut entfernt und das Gewebe mittels 2% PFA fixiert. Mit Anwendung dieser Standardmethodik [11, 21, 38] war eine gute Fixierung des Gewebes und damit eine problemlose „Dura-Präp“ möglich. Da mit 2% PFA perfundiert wurde, statt wie üblicherweise mit 4% PFA [11, 21, 38], mussten die Stücke, um den nötigen Härtegrad zum Schneiden am Mikrotom zu bekommen, später nachfixiert werden [67]. Obwohl für die Nissl-Färbung eigentlich in Paraffin eingebettete Schnitte besser geeignet sind als Gefrierschnitte, mussten letztere aufgrund der immunhistochemischen Färbung mit NeuN verwendet werden.

Um das Rückenmark (immun)histologisch untersuchen zu können, wurden mit dem Mikrotom Schnitte angefertigt und anschließend gefärbt. Zur Herstellung der Schnitte wurden die Rückenmarkstücke auf einen Stempel aufgebracht (dem Probenhalter des Mikrotoms), was sich als problematisch gestaltete. Da es nicht immer möglich war, die Stücke genau orthogonal auf den Stempel aufzubringen, führte dies teilweise zu einer etwas schrägen Schnittfläche, die mikroskopisch nicht zu beurteilen war. Je mehr die Schnittfläche von der Horizontalen abweicht, desto größer ist die Oberfläche und desto mehr Zellen können sich dort befinden. Dies kann zu Schwankungen der ausgezählten



Zellzahl führen. Des Weiteren war die Länge des Rückenmarks ein Problem [12]. Mit nur wenigen Zentimetern Länge war es anhand anatomischer Merkmale möglich, die einzelnen Abschnitte, nicht jedoch die einzelnen Segmente voneinander zu unterscheiden [27, 52]. Aus diesem Grund wurden Schnitte aus verschiedenen Segmenten ausgewertet (L1 bis L5, siehe Tabelle 5). Dies führt zu Schwankungen, da unterschiedliche Segmente aus anatomischen Gründen eine nicht identische Anzahl an Motoneurone aufweist. Die lumbalen Schnitte wurden nach Färbung und Auswertung anhand eines Mausatlases ihrer Segmenthöhe zugeordnet [52]. Dies sollte besser bereits vor dem Färben bei der Auswahl der Schnitte erfolgen, um sicherzustellen, dass die gewählten Schnitte demselben Segment entstammen. Durch Anwendung eines standardisierten Vorgehens zur Festlegung der zu schneidenden Höhe bzw. durch entsprechende Auswahl der Schnitte vor Färbung sind diese Schwankungen minimierbar. Bei einigen wenigen Tieren war, auf Grund von bei der „Dura-Präp“ entstandenen Verletzungen des Rückenmarks, durch äußere Gegebenheiten die Höhe der Schnitte vorgegeben.

Des Weiteren wird oft ein einheitlicher Abstand zwischen den ausgewerteten Schnitten eingehalten, um repräsentativere Stichproben zu erhalten [29, 38, 68]. Dies war, auf Grund der technischen Durchführung (Schnitte waren teilweise durch Überschlag am Rand, Risse, Stauchung usw. schlecht auszuwerten), nicht möglich. Da die Schnitte sowohl direkt nebeneinander liegen konnten, d.h. damit auch in etwa dieselbe Zellzahl hatten, als auch mehrere 100 µm auseinander, entstehen auch dadurch Schwankungen in der Anzahl der ausgezählten Zellen. So spielen alle erwähnten Faktoren in die Problematik der großen Schwankungen der Zellzahl mit ein.

Der Verlauf der Krankheit korreliert mit dem progredienten Verlust spinaler Motoneurone [22, 23] und um diese Veränderung zu verfolgen, wurden zwei unterschiedliche Färbungen gewählt (NeuN und Nissl), die sich gegenseitig verifizieren sollten.

Mit der Nissl-Färbung wurde eine vielfach gebräuchliche histologische Färbung gewählt, die eine Unterscheidung zwischen Neurone und Motoneurone zulässt [14, 20, 63]. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass sich zur Nissl-Färbung, die auch von Hemendinger R et al. 2005 [29] und Zhao Z et al. 2006 [68] verwendete Dicke der Schnitte von 10 µm, besser eignet als 15 µm. Deshalb wurde mit einer Schichtdicke von 10 µm gearbeitet, obwohl auch weit aus dickere Schnitte möglich gewesen wären [20, 30, 38, 63].

Das Färbeprotokoll an sich wurde anhand gängiger Protokolle erarbeitet und modifiziert. So musste vor der Färbung eine Bewässerungszeit von etwa 50 Minuten

eingehalten werden, da die Schnitte sonst anschließend nicht genug Farbe aufnehmen. Da sich eine Färbezeit von 5 Minuten als zu kurz erwies, wurde für 15 Minuten gefärbt. Durch Hinzufügen von Essigsäure zur Färbelösung kann eine Verkürzung der Färbezeit erreicht werden [48], jedoch zeigten sich bei Färbung nach unserem Protokoll die besten Ergebnisse.

Ebenso wurde die immunhistochemische NeuN-Färbung, wie in anderen Studien auch, verwendet [7, 29, 67]. Auch hier wurde in Vorversuchen das best mögliche Protokoll erarbeitet. So führte das Kochen in Citrat-Puffer von Weyer A, Schilling K 2003 [62] ebenso wie Antikörper-Verdünnungen von 1:200 [7, 41, 67] und 1:600 nicht zu den gewünschten Ergebnissen. Trotz kurzer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur [7] statt über Nacht im Kühlschrank [14, 29, 62] war die Immunreaktivität nicht vermindert [67].

Die NeuN-Färbung wurde gewählt, da sich fast alle Neurone spezifisch anfärben lassen. Jedoch ist eine Unterscheidung der Zellarten, wie bei der Nissl-Färbung, nicht möglich, wodurch Motoneurone als auch andere Neurone gezählt wurden [41, 44]. Die mangelnde Spezifität führt zu einem nicht exakten Ergebnis und so war nur eine Quantifizierung der Gesamtneuronenzahl möglich [29]. Deswegen ist ein Vergleich mit der spezifischeren Nissl-Färbung nicht möglich. Ein weiteres Problem ist das Charakteristikum von NeuN, nur dann detektiert werden zu können, wenn es die immunogene Phosphorylierung aufweist. Fehlt diese Phosphorylierung, so ist die angefärbte Zelle der Analyse nicht zugänglich [41]. Ein Vorteil von NeuN ist, dass sich damit eine neuronale Differenzierung von Stammzellen untersuchen lässt, die von uns jedoch nicht untersucht wurde [47].

Um eine genaue Quantifizierung der spinalen Motoneurone durchführen zu können, wäre eine für Motoneurone spezifischere Färbung nötig, was bis dato jedoch nur durch mehr oder minder allgemeine histologische Färbungen in Kombination mit morphologischen Kriterien erfolgen kann.

Um die transplantierten Zellen später detektieren zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Neben endogenen Markern kommen, wie hier verwendet, exogene Marker zum Einsatz. Das verwendete Hoechst 33342 bindet an DNA und ist ein oft gebrauchter Marker der es ermöglichte, die vor der Transplantation markierten Zellen 10 Tage nach Transplantation im Fluoreszenzmikroskop nachzuweisen.

#### 4.2.2 Auswertung

Um gefärbte Objektträger auszuwerten gibt es mehrere Möglichkeiten. Oft wird dies mit einem Konfokalmikroskop durchgeführt [7, 14, 41, 55, 65]. Das hier verwendete inverse Fluoreszenzmikroskop hatte zum einen den Nachteil, dass es durch die Vereinfachung von 3D auf 2D zu einem gewissen Informationsverlust kam, zum anderen den Vorteil, dass eine überschaubarere Datenmenge produziert wurde, die im Verhältnis zu der verwendeten Anzahl an Tieren stand.

Vielfach angewandte manuelle oder maschinelle Zählsysteme wurden nicht verwendet [29, 38, 68], sondern mit einfachen Methoden wie manueller Zähluhr ausgewertet. Zwar sind solche computergestützten Auswertungssysteme vermeintlich objektiver in Bezug auf interindividuelle Unterschiede der Untersuchungsobjekte, umgekehrt hängen wiederum die „Entscheidungen“ der Software von der Eingabe des Benutzers ab und sind wenig flexibel in Bezug auf von der Norm abweichende Morphologien.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte bei der Nissl-Färbung in 10-facher, bei der NeuN-Färbung in 20-facher Vergrößerung. Dadurch wurden unterschiedlich große Analyseflächen ausgewertet und somit ein direkter Vergleich der Ergebnisse zwischen den einzelnen Färbungen nicht möglich. Ziel war es, relative Unterschiede zwischen Tieren im frühen und fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung sowie zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen festzustellen. Um möglicherweise beobachtete Unterschiede unabhängig voneinander verifizieren zu können, wurden die beiden unterschiedlichen Färbungen durchgeführt. Dies war jedoch auf Grund der nicht übereinstimmenden Vergrößerungen, als auch der Eigenschaften der Färbungen (siehe S. 37) nicht möglich.

Zur Durchführung von Zellcharakterisierungen wird eine stärkere Vergrößerung gewählt, in der die einzelnen Strukturen besser zu erkennen sind [38, 68]. Da es hier um eine quantitative Auswertung ging, wurde mit einer kleinen Vergrößerung (10-fach bzw. 20-fach) gearbeitet.

Um ganz genaue Ergebnisse erreichen zu können, sollte, bei Anwendung exakterer Meßmethoden, eine Adjustierung für die Dicke des Schnittes vorgenommen werden [68].

Zum Nachweis transplantierte Zellen wäre die elegantere Methode nicht die durchgeführten histologischen Untersuchungen gewesen, sondern der Nachweis der transplantierten Zellen im Magnetresonanztomograph (vorher mittels ferromagnetischer Partikel markiert). Dadurch wird es möglich, dasselbe Tier im zeitlichen Verlauf zu mehreren Zeit-

punkten zu untersuchen womit die interindividuellen Schwankungen eventuell geringer ausfallen [66]. Diese Methode ließe es jedoch, aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens und aufgrund zu geringer Dichteunterschiede zwischen einzelnen Zellen, nicht zu, die Zahl vorhandener Motoneurone im Rückenmark einer Maus zu bestimmen.

Ziel der Auszählung sollte sein, die Ergebnisse möglichst objektiv zu gewinnen. Dazu wurden verblindete und randomisierte Zählungen durchgeführt, jedoch nur von einer Person. Durch mehrfaches Auszählen bzw. Auszählen durch eine weitere Person wäre es möglich gewesen, die Ergebnisse noch weiter zu objektivieren.

Als Kriterium bei der Auszählung der Nissl-Färbung galt die Größe und Form der Zellen, einhergehend mit der Sichtbarkeit des Kerns, d.h. die Zellen wiesen eine bestimmte Minimalgröße auf [20, 21]. Es wurde kein exakter Maßstab zur Größenbestimmung angelegt [68]. So wurden auch Zellen, die Motoneuron-ähnlich aussahen, mitgezählt bzw. nur teilweise dargestellte Motoneurone ohne Sichtbarkeit des Kerns nicht gezählt.

Da sich bei der NeuN-Färbung die Zellarten nicht voneinander unterscheiden ließen, wurden kategorisch alle angefärbten Zellen gezählt. Problematisch war auch hier die Auswahl des auszuwertenden Abschnitts. Nach subjektivem Empfinden wurde die Mitte des Vorder- bzw. Hinterhorns gewählt und anschließend herausvergrößert, d.h. nicht alle angefärbten Zellen pro (gesamten) Querschnitt ausgezählt, sondern nur Teile davon. Dies führte zu Stichprobenfehlern.

Bei der Auswertung der gefundenen transplantierten Zellen mit Hoechst war hauptsächlich die Größe zur Identifizierung ausschlaggebend. Da jedoch relativ wenige Zellen gefunden wurden, war die Auswertung schwierig, da sie nicht ohne weiteres von Verschmutzungen auf dem Objektträger abzugrenzen waren.

## **4.3 Ergebnisse**

### *4.3.1 Versuchstiere*

Zur Durchführung der Experimente wurden G93A-Mäuse verwendet. Diese sind sehr gut geeignet, da es sich um ein schon seit längerem bekanntes und etabliertes Tiermodell handelt [24]. Des Weiteren eignen sich Mäuse aufgrund einer kurzen Generationsdauer ausgezeichnet. Mit der Wahl der G93A-Maus wurde außerdem ein der menschlichen Krankheit weitgehend ähnliches Tiermodell gewählt, so dass die experimentellen Voraussetzungen

und Bedingungen mit der menschlichen Krankheit so weit als derzeit möglich übereinstimmten [1, 58].

Mit dem Verlauf der Krankheit nimmt auch die Zahl der Motoneurone ab, weswegen aus pathophysiologischen Gründen eine Abnahme der Neuronenzahl von Tag 55 auf Tag 110 zu erwarten war [16, 23, 24, 58]. Dies bestätigte sich auch, wobei die prozentuale Abnahme nicht einzuschätzen ist, da der Verlust der Motoneurone nicht linear verläuft. Auch spielt hier die Problematik mit ein, dass bei der NeuN-Färbung alle Neurone gezählt wurden und nicht nur Motoneurone.

Es wurde von Heiman-Patterson TD et al. 2005 gezeigt, dass das Geschlecht der Tiere einen Einfluss auf deren Überlebenszeit hat und weibliche Tiere länger überleben als männliche Tiere [28]. Insgesamt waren von den 36 untersuchten Tieren 15 weiblich und 21 männlich. Zwar konnte kein Einfluss des Geschlechts auf die Anzahl der vorhandenen Motoneurone nachgewiesen werden, jedoch sollte der Aspekt des Geschlechts berücksichtigt werden. So sind Ergebnisse, bei denen unterschiedliche Geschlechter miteinander verglichen wurden, nur bedingt verwertbar. Dies gilt für zwei der Ergebnisse, bei denen an Tag 110 mehr Zellen gezählt wurden als an Tag 55: Eine der Zunahmen fand sich bei der mit MSC behandelten Gruppe (NeuN, thorakal dorsal, siehe Abbildung 17). Diese ist jedoch, nach Aufteilung nach dem Geschlecht, nicht mehr ersichtlich, da männliche und weibliche Tiere miteinander verglichen wurden. Dies gilt auch für die MNSC-behandelte Gruppe (NeuN, thorakal ventral, siehe Abbildung 15). Bei Aufteilung wird ersichtlich, dass an Tag 110 nur weibliche Tiere und an Tag 55 ein weibliches und zwei männliche Tiere untersucht wurden.

Um die aus dem Rahmen fallenden Werte besser untersuchen zu können, wurden die lumbalen Schnitte des Rückenmarks ihrer entsprechenden anatomischen Höhe zugeordnet. Damit die Endergebnisse besser zu vergleichen sind, wäre eine vorherige Standardisierung auf jeweils dieselbe Schnitthöhe besser gewesen, da es mit Lokalisation der Intumescentia lumbosacralis in diesem Bereich zu erheblichen Schwankungen an Neuronen pro Querschnitt kommt. Dies bedeutet, dass die verschiedenen Segmente bereits von Natur aus eine unterschiedliche Anzahl Motoneurone bzw. Neurone aufweisen. Außerdem kommt es zu einer frühen Affektion auf Höhe von L4/5, da dort die bei der ALS als erstes affizierten Hinterläufe innerviert werden [63]. Mit diesen beiden Faktoren lässt sich ein weiteres

ungewöhnliches Ergebnis erklären. Indem man die Ergebnisse der UNSC-Gruppe (NeuN, lumbal dorsal links, siehe Abbildung 13) nach Rückenmarksegmenten aufteilt, kommt es zu keiner Zunahme von Tag 55 auf Tag 110 mehr, da unterschiedliche Segmente untersucht wurden (L1, 2, 4 und 5).

Mit dem Gruppendesign von 3 Tieren pro Gruppe, die zusammengefasst wurden, ist – bei der beobachteten relativ großen Streuung – rein statistisch gesehen, eine zu kleine Einheit gewählt worden. So können auffällige Ergebnisse auf einem einzigen der ausgezählten Tiere beruhen. Dadurch ist die Aussagekraft der ausgezählten Zellzahlen gering und die entsprechenden Werte würden, bei einer größeren Gruppe, weniger oder gar nicht aus dem Rahmen fallen. Dies ist zum Beispiel bei drei der auffälligen Ergebnisse der Fall, bei denen bereits nach Geschlecht und Höhe der Rückenmarksegmente aufgeteilt wurde. Bei der MNSC-Gruppe (NeuN, L1 ventral rechts und dorsal links und rechts, siehe Abbildung 9) sind nur weibliche Tiere, bei der MSC-Gruppe (Nissl, L5 ventral, siehe Abbildung 20), nur männliche Tiere betroffen. Bei beiden entstand der Wert an Tag 55 von einem ausgewerteten Tier, ebenso diente an Tag 110 nur ein Tier als Referenz. Insofern sind auch diese Ergebnisse, rein statistisch gesehen, nicht aussagekräftig. Um dies zu erreichen, wäre eine Studie in einem weit aus größerem Umfang nötig gewesen. Dies wäre jedoch nicht im Verhältnis zu den einzusetzenden Mitteln (Arbeitszeit, Forschungsgelder usw.) gestanden, zumal es darum ging, eine Grundtendenz festzustellen, d.h. ob die Zellen einen positiven Effekt haben oder nicht, und nicht darum, diese dann sofort zu etablieren.

Ein interessanter Aspekt für weitere Untersuchungen ist der Fakt, dass bei zwei Gruppen (MSC und MNSC) Zellen ins Cerebellum einwanderten, was bei den anderen Gruppen (UBC und UNSC) nicht der Fall war [25]. Korrelierend dazu fallen die Ergebnisse der mit MSC und MNSC behandelten Gruppen auf, die an Tag 110 mehr gezählte Zellen aufwiesen als an Tag 55 (siehe oben). Insofern wäre eine Untersuchung bezüglich eines Zusammenhangs von Interesse, da sich damit ganz neue Möglichkeiten für die Zukunft eröffnen könnten.

Die Tiere wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten getötet und anschließend histologisch untersucht. Die Todeszeitpunkte mit 55 Lebenstagen und 110 Lebenstagen wurden gewählt, da der Tag 55 in etwa den Beginn des Frühstadiums und der Tag 110 in etwa den Beginn des Spätstadiums markiert [2, 12, 16, 17, 22 - 26].

Der natürliche Todestag der Tiere wäre nicht verwertbar gewesen, weswegen der Zeitpunkt mit Tag 110 verwendet wurde. Da der Tod der Tiere von einem Motoneuronenverlust begleitet ist, hätten die Tiere trotz unterschiedlicher natürlicher Todeszeitpunkte immer in etwa dieselbe, sozusagen minimale „letale“ Anzahl an Motoneurone aufgewiesen.

#### 4.3.2 *Immunsuppression*

Um eine Abstoßungsreaktion des xenogenen Transplantats zu verhindern, wurden die Tiere, einen Tag vor der Transplantation beginnend, mit CsA immunsupprimiert [8]. Eine weitere Kontrollgruppe („CsA“) sollte mögliche positive Effekte von CsA aufzeigen [37, 39].

CsA wird üblicherweise i.p. oder subkutan gespritzt [7] bzw. über eine Schlundsonde gegeben. Aus Tierschutzgründen und, um eine mögliche Infektion zu umgehen, wurde eine oral zu gebende Darreichungsform gewählt. Die verwendete Dosis mit 40 mg/kg Körpergewicht pro Tag per os wurde in Vorversuchen, ausgehend von der üblicherweise verwendeten i.p.-Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag ermittelt [20, 22, 67]. Im Vergleich zu Garbuzova-Davis S et al. 2002 [21] und Willing AE et al. 2001 [63], die CsA mit einer Dosierung von 25 mg/kg Körpergewicht pro Tag per os gaben, liegt unsere Dosierung mit 40 mg eher hoch. In den beiden genannten Studien wurden 150.000 hNT-Neurone transplantiert, was die motorische Fähigkeit der Tiere verbesserte und deren Lebenszeit verlängerte. Die überlebten transplantierten Zellen konnten 10 bis 11 Wochen nach Gabe nachgewiesen werden (Nachweis mit Nuclear Matrix Antigen) [21]. Ausgehend davon kann die verwendete Immunsuppression in Höhe von 40 mg/kg Körpergewicht pro Tag per os als ausreichend hoch eingeschätzt werden.

#### 4.3.3 *Zellen*

Im Prinzip besitzen MSC und MNSC die Fähigkeit sich in die ektodermale Zelllinie zu differenzieren, was auch im Rahmen zahlreicher Studien sowohl in vitro als auch in vivo versucht wurde [19, 33, 40, 50, 67]. Die Fähigkeit zur Transdifferenzierung eröffnet die Möglichkeit einer regenerativen Therapie, wurde hier aber nicht untersucht.

MSC und MNSC wurden verwendet, da nach Transplantation von MSC von positiven Effekten berichtet wurde [50], die sich bei uns jedoch nicht bestätigten. Das primäre Ziel war es, MNSC als neuartige, unter speziellen Bedingungen kultivierte Zellen, auf ihre

therapeutische Wirksamkeit hin zu untersuchen, wobei die MSC sozusagen als Kontrolle verwendet wurden.

Knochenmarkzellen können auf verschiedenen Wegen gewonnen werden, die in der heutigen Medizin bereits etabliert sind, d.h. entsprechendes Know-how ist vorhanden und die Zellen sind dadurch ohne größere Nebenwirkungen zu gewinnen. Die Zellen können sowohl nach Stimulation durch einen Wachstumsfaktor aus peripherem Blut, bei einer Knochenmarkaspiration, als auch aus Nabelschnurblut oder der fötalen Leber gewonnen werden. Ethische Probleme machen es bisher unmöglich, menschliches fötales Gewebe als Quelle von Zellen für therapeutische Zwecke zu verwenden. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen können adulte Stammzellen aus autologem Knochenmark gewonnen werden und haben bei Reimplantation den Vorteil, dass es nicht wie bei embryonalen Zellen, zu einer Abstoßung durch MHC-Proteine kommt [40, 42, 50]. Außerdem ist das Risiko einer Teratomentstehung bei adulten deutlich geringer als bei embryonalen Stammzellen [7]. Neuere Studien berichten von einem erhöhten Tumorrisiko bei MSC [69]. Die autologe und allogene Stammzelltransplantation ist eine gängige Methode bei der Behandlung von Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphomen und weiteren blutbildungsstörenden Erkrankungen, da die Zellen leicht zu gewinnen und durch Kryoprotektion lange aufzubewahren sind. In diese Richtung wurden bereits bei ALS-Patienten Pilotstudien durchgeführt [34].

Auch UBC und UNSC mit der Eigenschaft zur Differenzierung in Zellen mit dem morphologischen Phänotyp und der Antigenität neuraler Zellen wurden verwendet [10, 22, 32, 36, 50]. Zwar konnten Ende N et al. 2000 [17] und Garbuzova-Davis S et al. 2003 [22] mit diesen Zellen positive Effekte erzielen, mit dem Ansatz dieser Studie, einer intrathekalen Applikation, konnten wir diese Effekte jedoch nicht reproduzieren.

Da menschliche Nabelschnurblutzellen nicht-fetalen Ursprungs sind, sind sie relativ leicht zu gewinnen. Sie werden durch Punktion der Nabelschnurvenen nach der Plazentalösung bei der Geburt gewonnen und können ebenso durch Kryoprotektion lange aufbewahrt werden [22]. Der Gebrauch von menschlichen Nabelschnurblutzellen zur Transplantation ist limitiert, da ein passender HLA-Spender benötigt wird bzw. nur von einem Spender Zellen verwendet werden können [17]. Deshalb ist ihre Verwendung auf eine autologe Transplantation beschränkt.

Sowohl die Gewinnung der MSC und UBC als auch deren spezielle epigenetische Konvertierung nach den Protokollen von Buzanska L et al. 2002 [10] und Hermann A, Gastl R



et al. 2004 [31] ist eine gängige Methode. Für die vorliegende Studie wurde aufgrund früherer Befunde angenommen, dass sich alle Zellen in ähnlicher Weise verändern. Dies wurde vor der Transplantation nicht untersucht. Man geht jedoch davon aus, dass jedes Tier dieselbe Zellpopulation bekommen hat. Sollte eine Anwendung beim Mensch in Frage kommen, wäre eine vorherige Prüfung unerlässlich.

Ein weiterer Grund, warum diese Zellarten verwendet wurden war, dass bereits gezeigt werden konnte, dass alle transplantierten Zellarten nach Transplantation migrieren können [19, 22, 32, 50]. Dies ist insofern von Bedeutung, dass sich bei einem möglichst geringfügigen invasiven Zugang die Zellen an alle Orte mit Läsionen, bei der ALS im motorischen Kortex und im Rückenmark, verteilen sollten, um einen maximal zu erzielenden therapeutischen Erfolg zu erreichen.

Bei unseren Experimenten konnte eine weite Verteilung im Gehirn festgestellt werden, jedoch waren nur sehr wenige Zellen im Liquorsystem des Rückenmarks nachzuweisen [25]. Zhang ZG et al. 2003 zufolge migrieren intracisternal injizierte Zellen ( $10^5$ ) relativ langsam [66], anderen Studien zufolge ist es den Zellen möglich, innerhalb von 2 Tagen vom vierten Ventrikel aus sowohl im ganzen Liquor des Rückenmarksbereichs verteilt zu sein (bei  $5 \times 10^6$  Zellen, [45]) als auch in anderen Teilen des ZNS (intravenöse Gabe von  $10^6$  Zellen, [22]) oder weiteren Körperorganen ( $30 \times 10^6$  Zellen i.p. transplantiert, [14]). Bei allen aufgeführten Studien wurden deutlich mehr Zellen verwendet als bei dieser Studie mit  $10^5$  transplantierten Zellen. Dies erklärt auch die fehlende „Wanderung“ der Zellen.

Die Zellverteilung im Liquor resultiert primär aus der passiven Verteilung der Zellen mit dem Liquorstrom bzw. durch die Schwerkraft sowie den Druck und die Richtung der Injektion (da sich die Zellen in Suspension nicht fortbewegen können). Die vom Liquor transportierten Einzelzellen befanden sich in allen Teilen des Rückenmarks, wohingegen die gefundenen Zellhaufen vornehmlich im lumbalen Bereich lokalisiert waren. Dies würde dafür sprechen, dass kleinere Zellaggregate mit dem Liquor in Richtung kaudal schneller fortbewegt werden können als einzelne Zellen, da Einzelzellen wiederum schneller an der Oberfläche des Gewebes anhaften können.

Eine weitere Ursache für das Fehlen ausgeprägter Effekte der Zellen ist der Umstand, dass keine Zellen am Ort der Läsionen (im Rückenmark) vorhanden waren.

Es wurden 10 Tage nach der Transplantation im Rückenmark noch vereinzelt Zellen bzw. kleine Zellhaufen gefunden (siehe Tabelle 1 bis Tabelle 5). Ohta M et al. 2004 transplantierte mit  $5 \times 10^6$  deutlich mehr Zellen intrathekal, welche bereits 3 Wochen später nicht mehr nachzuweisen waren [45]. Bei Transplantationen mit einer Zellzahl von  $10^6$  Zellen war es Wu S et al. 2002 möglich, 1 Woche später noch Zellen nachzuweisen [65], ebenso Garbuzova-Davis S et al. 2003 nach einem Zeitraum von 10 bis 12 Wochen [22]. Dies könnte sowohl an der höheren Zelldosis [22, 65] als auch an der peripheren Gabe liegen [22]. Bei sehr niedrig gewählter Dosierung mit wenigen Tausend Zellen konnten Björklund LM et al. 2002 14 bis 16 Wochen nach Transplantation nicht mehr bei allen Tieren Zellen nachweisen [7]. Es wird deutlich, dass, je größer die applizierte Zellzahl ist, umso mehr Zellen über einen längeren Zeitraum nachweisbar sind.

In dieser Studie wurden pro Maus 100.000 Zellen transplantiert. Das waren, im Gegensatz zu anderen Studien (siehe oben), relativ wenig Zellen [14, 17, 45, 63]. In einzelnen Studien war die Zellzahl mit  $10^5$  Zellen ausreichend um einen Effekt nach 2 Tagen [66] bzw. kurz vor dem natürlichen Todeszeitpunkt nachzuweisen [22, 29, 30,], jedoch könnte das Fehlen eines Effekts hier durch eine begrenzte Anzahl an transplantierten Zellen hervorgerufen worden sein.

Die äußerst geringe Zahl von wieder gefundenen transplantierten Zellen könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass thorakale und lumbale Abschnitte des Rückenmarks untersucht wurden und nicht die näher an der Cisterna magna gelegenen zervikalen Abschnitte, in denen sich 24 Stunden nach Transplantation 90% der im Rückenmark gefundenen Zellen, insgesamt etwa 10.000 Zellen, befanden [25]. Der Nachweis von Zellen im thorakalen und lumbalen Rückenmark deutet auf eine weite Verteilung der Zellen im Liquorsystem hin. Durch eine Verteilung auf ein großes Volumen (Liquor) kommt es zu einer Abnahme der Zellkonzentration vor Ort der Läsion. Auch könnten die schlechten Ernährungsbedingungen im Liquor zu einem frühen Absterben der Zellen beitragen, auf Grund dessen bereits an Tag 10 post transplantationem kaum mehr Zellen gefunden wurden. Die Verteilung mit nur etwa 10% der transplantierten Zellen Richtung Rückenmark trägt jedoch zu dem gefundenen Ergebnis bei. Dies korreliert ebenso mit den wenigen, im Verhältnis zu den ausgezählten Schnitten, wieder gefundenen Zellen.

Es wurden bei allen transplantierten Zellarten Zellen gefunden, jedoch nur bei MSC (siehe Tabelle 1) und MNSC (siehe Tabelle 2) Zellhaufen mit mehr als 3 Zellen auf einmal. Dies korreliert mit dem Ergebnis, dass in den Mäusen, die MSC bzw. MNSC erhielten, eine insgesamt höhere Zahl an Zellen nachgewiesen wurde [25].

Die Zellen wurden, bis auf eventuell zwei einzelne Zellen, nicht intraparenchymal sondern außen dem Rückenmarksquerschnitt anliegend gefunden.

#### 4.3.4 *Transplantation*

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um Zellen zu transplantieren. Zum einen können die Zellen direkt ins Gewebe transplantiert werden, beispielsweise ins Striatum [7] oder in den Kortex [67], und befinden sich dann direkt am Ort der Läsion. Ein solches Vorgehen wäre bei der ALS sehr aufwendig, da es mit Kortex und Rückenmark mehrere Läsionsorte gibt. Aus diesem Grund wäre nicht eine Injektionsstelle ausreichend, sondern es würden mehrere benötigt werden. Zum anderen gibt es die Möglichkeit der systemischen Gabe, die sowohl venös [22] als auch i.p. [14] erfolgen kann. Der Nachteil dabei ist, dass die Zellen erst die Blut-Hirn-Schranke überqueren müssen um ins ZNS gelangen zu können.

Aus diesen Gründen scheint bei der ALS eine intrathekale Gabe der Zellen am geeignetsten zu sein. Das wurde durch die Transplantation in die Cisterna magna erreicht.

Bereits von anderen wurden erfolgreiche Transplantationen in die Cisterna magna sowohl am Tiermodell [45, 65, 66] als auch am Menschen durchgeführt [34]. Durch unsere Transplantationsmethode in der „concorde-like position“ direkt in die Cisterna magna konnte ein Wiederaustreten der Zellen verhindert werden, was unter anderem durch den natürlich vorhandenen Liquordruck passieren kann [45].

Ein Vorteil der Methodik ist die Minimalinvasivität sowie die kurze Dauer des Vorgangs gegenüber länger dauernden intraspinalen Infusionen. Dies ist bei chronischen Erkrankungen von Vorteil [34], wohingegen eine länger dauernde Therapie eher ungeeignet wäre [54]. Bei entsprechendem Erfolg würde dies aber sicher gerne von den Patienten in Kauf genommen werden. Ein weiterer Vorteil der Technik ist, dass man Zugang zu großen Teilen des Gehirns und des Rückenmarks hat, wodurch sich die transplantierten Zellen von einem Ort aus über den Liquor im ganzen ZNS verteilen können, d.h. sowohl in kaudaler als auch in kranialer Richtung [45, 65, 66]. Auch über längere Distanzen wie beispielsweise beim Affen, bei dem sich die Cisterna magna und das untere Ende des Rückenmarks (v.a. lumbaler Abschnitt) deutlich weiter voneinander entfernt befinden als bei der Maus, konnte die Ausbreitung von transplantierten Zellen nachgewiesen werden [54]. Die einzige Möglichkeit der transplantierten Zellen ins Rückenmark zu kommen ist über den im Plexus choroideus gebildeten Liquor, der nach kaudal fließt [65]. Günstig ist

auch der Umstand, dass bei intrathekaler Transplantation im Gegensatz zur peripheren Gabe, die Blut-Hirn-Schranke bereits überquert ist [20, 22, 54]. Auch bei ausreichender systemischer Gabe, bei der mehr Zellen benötigt werden (z. B.  $10^6$  Zellen), können die Zellen ins Gehirn und ins Rückenmark wandern [14, 22].

Nachteilig ist die Tatsache, dass nicht kontrolliert werden kann, in welche Richtung sich die Zellen ausbreiten (siehe oben: Problem, dass nur 10% der Zellen im zervikalen Rückenmark zu finden waren). Ein weiterer Nachteil bei einer einmaligen Transplantation bzw. Infusion versus mehreren Infusionen ist, dass im Falle unvorhergesehener Nebenwirkungen die Infusionstherapie die Möglichkeit zum Abbruch (z.B. während oder nach der ersten Behandlung) belässt, wohingegen eine Transplantation endgültig ist.

Eine wichtige Rolle spielt auch der Zeitpunkt der Transplantation. Mit Transplantation am 45. Lebensjahr wurde ein zu anderen Studien ähnlicher Zeitpunkt gewählt, der einige Wochen vor dem Beginn der Krankheit liegt [14, 17, 22, 29, 30]. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass der gewählte Zeitpunkt der Transplantation für die negativen Ergebnisse in unserer Studie verantwortlich ist.

## 4.4 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es trotz vermuteten positiven Effekten von intracisternal transplantierten Knochenmarkstroma- und Nabelschnurblutzellen im zeitlichen Verlauf zu keiner nennenswerten Beeinflussung der Anzahl der intraspinalen Motoneurone in einem Tiermodell der ALS kommt. Auch war bei den proneural-konvertierten Zellen, die noch nie zuvor transplantiert wurden, kein Effekt sichtbar.

Um bei zukünftigen Studien einen Effekt der Zellen erreichen und nachweisen zu können, wären folgende Ansätze denkbar:

Zum einen wird mit der intrathekalen Transplantationstechnik zwar eine Umgehung der Blut-Hirn-Schranke erreicht und die Zellen direkt ins ZNS eingebracht, jedoch erwies sich diese Technik nicht als optimal. Um eine ausreichende Verteilung der Zellen im gesamten ZNS zu erhalten, wäre sowohl eine Verbesserung der Transplantationstechnik als auch die Verwendung einer höheren Anzahl an transplantierten Zellen pro Maus zu empfehlen.

Zum anderen gestaltete sich die Auswertung als schwierig. Nicht nur eine bessere Standardisierung der Methodik bezüglich der Schnittherstellung, sondern auch die Entwicklung einer für Motoneurone spezifischeren Färbung als NeuN wäre empfehlenswert. Bei der Suche nach geeigneter Vergleichsliteratur fiel auf, dass die quantitative Auswertung der Motoneurone bisher immer problematisch war. Aus diesem Grund sollte in Zukunft auch an der fehlenden Grundlagenforschung gearbeitet werden.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, durch Quantifizierung spinaler Motoneurone festzustellen, inwieweit in die Cisterna magna transplantierte Stammzellen einen Einfluss auf den Verlauf einer Motoneuronerkrankung haben.

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 transplantiert. Nach erfolgter Perfusion 10 beziehungsweise 65 Tage nach Transplantation und Präparation des gesamten Zentralnervensystems (Gehirn und Rückenmark) mit intakter Dura mater wurden am Mikrotom Schnitte des Rückenmarks angefertigt, die anschließend histologisch mit Nissl und immunhistologisch mit NeuN (Neuronal Nuclei) angefärbt wurden. Die gefärbten Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop (NeuN) beziehungsweise mit Durchlicht (Nissl) aufgenommen und quantitativ ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Studie sind:

- (1) Mit wenigen Ausnahmen nimmt die Zahl der Motoneurone erwartungsgemäß von Tag 10 auf Tag 65 ab.
- (2) Bei der Abnahme der Motoneurone im zeitlichen Verlauf konnte kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den behandelten Gruppen festgestellt werden.
- (3) Die auffallenden Ergebnisse der MSC- und MNSC-Gruppe (siehe Kapitel 3) korrelieren sowohl mit der in diesen Mäusen insgesamt gefundenen hohen Anzahl an transplantierten Zellen als auch mit der Tatsache, dass nur bei diesen Mäusen Zellen ins Cerebellum einwanderten.
- (4) Im Rückenmark wurden in allen Gruppen (UBC, UNSC, MSC, MNSC) vereinzelte, mit Hoechst markierte, transplantierte Zellen gefunden.

Trotz aus früheren Studien erwartetem positivem Effekt der Zellen konnte dieser bei keiner der transplantierten Gruppen bestätigt werden.

Aus der Arbeit konnte geschlussfolgert werden, dass für zukünftige Forschung vor allem Ansätze an der Transplantationstechnik, der Anzahl der transplantierten Zellen als auch an der zum Nachweis der Motoneurone verwendeten Färbungen interessant wären.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Almer G:  
Amyotrophe Lateralsklerose: Überlegungen zu Ursprung und Pathophysiologie der Erkrankung.  
Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie 4: 6-12 (2003)
2. Angenstein F, Niessen HG, Goldschmidt J, Vielhaber S, Ludolph AC, Scheich H:  
Age-dependent changes in MRI of motor brain stem nuclei in a mouse model of ALS.  
NeuroReport 15: 2271-2274 (2004)
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.  
Annals of Neurology 57: 104-110 (2005)
4. Bachus R, Claus A, Meyer T, Riepe M, Ludolph AC:  
Molecular biology findings in amyotrophic lateral sclerosis.  
Nervenarzt 68: 785-791 (1997)
5. Belsh JM:  
ALS diagnostic criteria of El Escorial Revisited: do they meet the needs of clinicians as well as researchers?  
Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders 1 Suppl 1: 57-60 (2000)
6. Berlit P:  
Amyotrophische Lateralsklerose.  
In: Berlit (Hrsg) Klinische Neurologie, 1. Aufl, Springer Berlin New York: 258-260 (1999)
7. Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O:

- Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model.  
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 2344-2349 (2002)
8. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stähelin H:  
Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals.  
Immunology 32: 1017-1025 (1977)
  9. Brown RH Jr.:  
SOD1 aggregates in ALS: cause, correlate or consequence?  
Nature Medicine 4: 1362-1364 (1998)
  10. Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K:  
Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro.  
Journal of Cell Science 115: 2131-2138 (2002)
  11. Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Garbuzova-Davis S, Jiang L, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR, Zigova T, Willing AE:  
Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural.  
Stem Cells 23: 1560-1570 (2005)
  12. Chung YH, Joo KM, Lee YJ, Cha CI:  
Immunohistochemical study on the distribution of MnSOD in the central nervous system of the transgenic mice expressing a human Cu/Zn SOD mutation.  
Brain Research 990: 215-220 (2003)
  13. Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW:  
Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice.  
Science 302: 113-117 (2003)



14. 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)
15. 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 and Development 13: 121-131 (2004)
16. Dal Canto MC, Gurney ME:  
Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis.  
American Journal of Pathology 145: 1271-1279 (1994)
17. Ende N, Weinstein F, Chen R, Ende M:  
Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis).  
Life Sciences 67: 53-59 (2000)
18. Finsterer J:  
Genetische Heterogenität der familiären amyotrophen Lateralsklerose.  
Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie 5: 7-13 (2004)
19. Gage FH:  
Mammalian neural stem cells.  
Science 287: 1433-1438 (2000)
20. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Milliken M, Saporta S, Sowerby B, Cahill DW, Sanberg PR:  
Intraspinal implantation of hNT neurons into SOD1 mice with apparent motor deficit.  
Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders 2: 175-180 (2001)

21. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Milliken M, Saporta S, Zigova T, Cahill DW, Sanberg PR:  
Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis.  
*Experimental Neurology* 174: 169-180 (2002)
22. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, Hudson JE, Chen N, Davis CD, Sanberg PR:  
Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation.  
*Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research* 12: 255-270 (2003)
23. Guégan C, Przedborski S:  
Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis.  
*The Journal of Clinical Investigation* 111: 153-161 (2003)
24. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, Chen W, Zhai P, Sufit RL, Siddique T:  
Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation.  
*Science* 264: 1772-1775 (1994)
25. 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.  
*Journal of Neural Transmission* [Epub ahead of print] (2007)
26. Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annur A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka

- Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM:  
Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport.  
Science 300: 808-812 (2003)
27. Hebel R, Stromberg MW:  
Nervous System.  
In: Hebel R, Stromberg MW (Hrsg) Anatomy of the laboratory rat, 1. Aufl, The Williams & Wilkins Company Baltimore: 119-125 (1976)
28. Heiman-Patterson TD, Deitch JS, Blankenhorn EP, Erwin KL, Perreault MJ, Alexander BK, Byers N, Toman I, Alexander GM:  
Background and gender effects on survival in the TgN(SOD1-G93A)<sup>1</sup>Gur mouse model of ALS.  
Journal of the Neurological Sciences 236: 1-7 (2005)
29. Hemendinger R, Wang J, Malik S, Persinski R, Copeland J, Emerich D, Gores P, Halberstadt C, Rosenfeld J:  
Sertoli cells improve survival of motor neurons in SOD1 transgenic mice, a model of amyotrophic lateral sclerosis.  
Experimental Neurology 196: 235-243 (2005)
30. Hendricks WA, Pak ES, Owensby JP, Menta KJ, Glazova M, Moretto J, Hollis S, Brewer KL, Murashov AK:  
Predifferentiated embryonic stem cells prevent chronic pain behaviors and restore sensory function following spinal cord injury in mice.  
Molecular Medicine 12: 34-46 (2006)
31. 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.  
Journal of Cell Science 117: 4411-4422 (2004)
32. Hermann A, Gerlach M, Schwarz J, Storch A:  
Neurorestoration in Parkinson's disease by cell replacement and endogenous regeneration.  
Expert Opinion on Biological Therapy 4: 131-143 (2004)
33. Hermann A, Liebau S, Gastl R, Fickert S, Habisch HJ, Fiedler J, Schwarz J, Brenner R, Storch A:  
Comparative analysis of neuroectodermal differentiation capacity of human bone marrow stromal cells using various conversion protocols.  
Journal of Neuroscience Research 83: 1502-1514 (2006)
34. Janson CG, Ramesh TM, During MJ, Leone P, Heywood J:  
Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis.  
Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research 10: 913-915 (2001)
35. Jerusalem F, Zierz S:  
Amyotrophe Lateralsklerose.  
In: Jerusalem F, Zierz S (Hrsg) Muskelerkrankungen. Klinik, Therapie, Pathologie, 2. Aufl, Thieme Stuttgart: 221-229 (1991)
36. Jurga M, Markiewicz I, Sarnowska A, Habich A, Kozłowska 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.  
Journal of Neuroscience Research 83: 627-637 (2006)
37. Keep M, Elmer E, Fong KS, Csiszar K:  
Intrathecal cyclosporin prolongs survival of late-stage ALS mice.  
Brain Research 894: 327-331 (2001)

38. Kiaei M, Kipiani K, Chen J, Calingasan NY, Beal MF:  
Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist extends survival in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.  
Experimental Neurology 191: 331-336 (2005)
39. Kirkinezos IG, Hernandez D, Bradley WG, Moraes CT:  
An ALS mouse model with a permeable blood-brain barrier benefits from systemic cyclosporine A treatment.  
Journal of Neurochemistry 88: 821-826 (2004)
40. Körbling M, Estrov Z:  
Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?  
New England Journal of Medicine 349: 570-582 (2003)
41. Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K:  
Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization.  
Journal of Neuroscience Research 79: 295-302 (2005)
42. 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.  
Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research 12: 689-699 (2003)
43. 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)

44. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM:  
NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.  
Development 116: 201-211 (1992)
45. Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, Chou H, Ishikawa N,  
Matsumoto N, Iwashita Y, Mizuta E, Kuno S, Ide C:  
Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional  
recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation.  
Experimental Neurology 187: 266-278 (2004)
46. Poeck, K:  
Amyotrophische Lateralsklerose.  
In: Poeck K (Hrsg) Neurologie, 7. Aufl, Springer Berlin: 457-460 (1990)
47. Rakic P:  
Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis.  
Journal of Neuroscience 22: 614-618 (2002)
48. Romeis B:  
Kernfärbung mit Kresylechtviolett.  
In: Böck P (Hrsg) Mikroskopische Technik, 17. Aufl, Urban und Schwarzenberg  
München: 232-233 (1989)
49. Rowland LP, Shneider NA:  
Amyotrophic lateral sclerosis.  
New England Journal of Medicine 344: 1688-1700 (2001)
50. Sanchez-Ramos JR:  
Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood.  
Journal of Neuroscience Research 69: 880-893 (2002)
51. Schwartz A:  
Amyotrophe Lateralsklerose.

- In: Schwartz A (Hrsg) Neurologie systematisch, 2. Aufl, Uni-Med Bremen: 301-302 (2000)
52. Sidman RL, Angevine JB, Pierce ET:  
The Spinal Cord.  
In: Sidman RL, Angevine JB, Pierce ET (Hrsg) Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord, 1. Aufl, Harvard University Press Cambridge: 251-260 (1971)
53. Silani V, Cova L, Corbo M, Ciammola A, Polli E:  
Stem-cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis.  
The Lancet 364: 200-202 (2004)
54. Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, Monia BP, Condon TP, Hung G, Lobsiger CS, Ward CM, McAlonis-Downes M, Wei H, Wancewicz EV, Bennett CF, Cleveland DW:  
Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease.  
The Journal of Clinical Investigation 116: 2290-2296. (2006)
55. Solomon JN, Lewis CA, Ajami B, Corbel SY, Rossi FM, Krieger C:  
Origin and distribution of bone marrow-derived cells in the central nervous system in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.  
Glia 53: 744-753 (2006)
56. Song S, Sanchez-Ramos J:  
Brain as the Sea of Marrow.  
Experimental Neurology 184: 54-60 (2003)
57. Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK:  
Aggregation of ubiquitin and a mutant ALS-linked SOD1 protein correlate with disease progression and fragmentation of the Golgi apparatus.  
Journal of the Neurological Sciences 173: 53-62 (2000)
58. Stieber A, Gonatas JO, Gonatas NK:  
Aggregates of mutant protein appear progressively in dendrites, in periaxonal

- processes of oligodendrocytes, and in neuronal and astrocytic perikarya of mice expressing the SOD1(G93A) mutation of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 177: 114-123 (2000)
59. Stieber A, Gonatas JO, Moore JS, Bantly A, Yim HS, Yim MB, Gonatas NK:  
Disruption of the structure of the Golgi apparatus and the function of the secretory pathway by mutants G93A and G85R of Cu, Zn superoxide dismutase (SOD1) of familial amyotrophic lateral sclerosis.  
*Journal of the Neurological Sciences* 219: 45-53 (2004)
60. Strey CW, Spellman D, Stieber A, Gonatas JO, Wang X, Lambris JD, Gonatas NK:  
Dysregulation of stathmin, a microtubule-destabilizing protein, and up-regulation of Hsp25, Hsp27, and the antioxidant peroxiredoxin 6 in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis.  
*American Journal of Pathology* 165: 1701-1718 (2004)
61. Wies P:  
Pivot-Tabellen erstellen.  
In: Wies P (Hrsg) *Microsoft Office Excel 2003 für Windows: fortgeschrittene Techniken*, 2. Aufl, Herdt Bodenheim: 72-83 (2005)
62. Weyer A, Schilling K:  
Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum.  
*Journal of Neuroscience Research* 73: 400-409 (2003)
63. Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Milliken M, Cahill DW, Sanberg PR:  
hNT neurons delay onset of motor deficits in a model of amyotrophic lateral sclerosis.  
*Brain Research Bulletin* 56: 525-530 (2001)
64. Wokke J:  
Riluzole.  
*The Lancet* 348: 795-799 (1996)



65. Wu S, Suzuki Y, Kitada M, Kataoka K, Kitaura M, Chou H, Nishimura Y, Ide C:  
New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord  
through cerebrospinal fluid in rat.  
Neuroscience Letters 318: 81-84 (2002)
66. Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, Zhang L, Wang L, Zhang L, Arniago P, Ho KL,  
Chopp M:  
Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat.  
Annals of Neurology 53: 259-263 (2003)
67. 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 Research Protocols 11: 38-45 (2003)
68. Zhao Z, Lange DJ, Voustantiounk A, MacGrogan D, Ho L, Suh J, Humala N,  
Thiyagarajan M, Wang J, Pasinetti GM:  
A ketogenic diet as a potential novel therapeutic intervention in amyotrophic lateral  
sclerosis.  
BMC Neuroscience 3: 29 (Artikel) (2006)
69. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y:  
Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in  
vivo.  
Experimental and Molecular Pathology 80: 267-274 (2006)

## **DANKSAGUNG**

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Albert C. Ludolph für die freundliche Überlassung des Themas und bei Dr. rer. nat. Hans-Jörg Habisch für die unterstützende Betreuung bedanken, ebenso bei den technischen Assistenten Nancy Meyer und Stephen Meier für ihre große Hilfe. Abschließend gilt mein Dank Donat Binder, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.