

Technische Universität München

GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

Institut für Molekulare Virologie

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. V. Erfle)

**ETABLIERUNG EINES TIERMODELLS
ZUM GENTRANSFER INS ZNS**

Mirjam Katharina Fuchs

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. V. Erfle

2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 19.12.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.05.2002 angenommen.

1	EINLEITUNG	5
1.1	Entwicklung und Aufbau des Zentralnervensystems	5
1.2	Neurale Stammzellen	7
1.3	Therapie zentralnervöser Erkrankungen durch Stammzelltransplantation	9
1.4	Relevanz der Untersuchungen	11
2	MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1	Zellkulturtechniken	13
2.1.1	Kultivierung neuraler Stammzellen.....	13
2.1.2	Etablierung primärer Zellkulturen aus Knochenmark.....	13
2.1.3	Untersuchung von Zellkulturen auf Kontamination.....	14
2.1.4	Enzymhistochemischer Nachweis von <i>lacZ</i>	14
2.1.5	Untersuchung chemotaktischer Eigenschaften neuraler Stammzellen	15
2.1.5.1	Herstellung von Proteinextrakten aus murinen Geweben	15
2.1.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	15
2.1.5.3	Transwell-Kultur	16
2.2	Molekularbiologische Techniken	16
2.2.1	Chemikalien.....	16
2.2.2	Stammlösungen und Puffer.....	18
2.2.3	DNA-Isolierung	18
2.2.3.1	DNA-Isolierung aus murinen Geweben.....	19
2.2.3.2	DNA-Isolierung aus Mäuseblut und kultivierten Zellen	19
2.2.4	Quantifizierung genomischer DNA	19
2.2.5	Konzentrierung genomischer DNA.....	20
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	20
2.2.6.1	Herstellung von Agarosegelen	20
2.2.6.2	Elektrophorese.....	20
2.2.6.3	Sichtbarmachen der DNA im Agarosegel	21
2.2.7	DNA-Amplifikation durch PCR.....	21
2.2.7.1	Oligonukleotidprimer	22
2.2.7.2	Polymerase und Puffer	22
2.2.7.3	Reaktionsansatz	23
2.2.7.4	Sensitivität.....	24
2.2.8	Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot Analysen.....	24
2.2.9	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26

2.2.9.1	Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	26
2.2.9.2	Elektrophorese.....	27
2.2.10	Western Blot Analyse	28
2.2.10.1	Proteintransfer von SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	28
2.2.10.2	Anfärben der an die Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine.....	29
2.2.10.3	Coomassie-Färbung und Trocknen von SDS-Polyacrylamid-Gelen	29
2.2.10.4	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran	30
2.2.10.5	Antikörper-Inkubationen.....	30
2.2.10.6	Detektion der Proteine durch Chemolumineszenz	31
2.2.10.7	Entfernung gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran.....	31
2.2.11	Enzymhistochemischer Nachweis von β -Galaktosidase am geklärten murinen Gehirn	32
2.2.11.1	X-Gal-Färbung von murinen Geweben	32
2.2.11.2	Klärung von murinen Geweben.....	32
2.3	Tierexperimentelle Untersuchungen	33
2.3.1	Mäuse.....	33
2.3.2	Transplantation neuraler Stammzellen durch intravenöse Injektion.....	33
2.3.3	Sektion von Mäusen	34
2.4	Statistische Auswertungen	35
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im X-Gal gefärbten und geklärten Gehirn	37
3.2	Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im Gehirn durch PCR Amplifikation	39
3.2.1	Einfluss der Zahl injizierter Zellen auf die Implantation in das Gehirn.....	41
3.2.2	Einfluss des Rezipientenalters auf die Implantation von NS Zellen in das Gehirn	42
3.2.3	Einfluss des Geschlechts der Rezipienten auf die Implantation von NS Zellen in das Gehirn	44
3.3	Genexpression i.v. injizierter NS Zellen im Gehirn.....	45
3.4	Enzymhistochemischer Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm.....	46
3.5	PCR-Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm	49
3.6	Lokalisation i.v. injizierter NS Zellen innerhalb der Großhirnhemisphäre....	49
3.7	Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in Blut, Lunge und Milz von Rezipienten durch PCR Amplifikation.....	50

3.8	Untersuchung des Migrationsverhaltens von NS Zellen auf chemotaktische Einflüsse	52
3.9	Einfluss einer Äthernarkose auf die Transplantation von NS Zellen ins ZNS durch i.v. Injektion	55
3.10	Einfluss einer Äthernarkose auf die Verteilung i.v. injizierter NS Zellen im murinen ZNS	57
3.11	Zusammenfassung der Ergebnisse	59
4	DISKUSSION	61
4.1	Transplantation von neuronalen Stammzellen als Therapieansatz	61
4.2	Transplantation durch i.v. Injektion	61
4.2.1	Blut-Hirn-Schranke als limitierender Faktor bei der Transplantation von Zellen in das ZNS durch i.v. Injektion.....	63
4.2.1.1	Modulation der Permeabilität der BBB.....	63
4.2.2	Zusätzliche Einflüsse auf die Transplantationseffizienz neuronaler Stammzellen.....	64
4.2.2.1	Kritische Betrachtung der Analysen	66
4.3	Verteilung von NS Zellen im Organismus nach i.v. Injektion.....	67
4.4	Ausblick	69
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	72
7	LITERATURVERZEICHNIS	74
8	DANKSAGUNG	80

1 EINLEITUNG

1.1 Entwicklung und Aufbau des Zentralnervensystems

Das Zentralnervensystem (ZNS) besteht aus Gehirn und Rückenmark (RM), wobei das Gehirn die kraniale Fortsetzung des Rückenmarks darstellt. Das Gehirn selbst kann in verschiedene Bereiche unterteilt werden. Für das Verständnis des zum Gentransfer in das ZNS etablierten Tiermodells soll die Unterscheidung von Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm genügen. Das Großhirn umfasst die beiden Großhirnhemisphären. Diese tragen außen die Großhirnrinde, die graue nervenzellreiche Substanz, und bestehen ansonsten aus weißer nervenfaserreicher Substanz. Innen befinden sich die Liquorräume in Form der Seitenventrikel. Der Hirnstamm aus Mittelhirn, Brücke und verlängertem Mark stellt die Verbindung zwischen Großhirn und RM dar. Das Kleinhirn ist dem Hirnstamm dorsal angeschlossen und umfasst die beiden Kleinhirnhemisphären. Die Verteilung von grauer und weißer Substanz im Kleinhirn entspricht der Situation im Großhirn.

Gehirn und RM sind von einem bindegewebigen Hüllensystem, den Meningen umgeben. Hierbei werden die äußere straffe *Dura mater* oder Pachymeninx und die zarte innere Leptomeninx unterschieden. Letztere besteht aus zwei Blättern. Das innere Blatt, die *Pia mater*, liegt der Hirn- und Rückenmarksoberfläche direkt an und begrenzt zusammen mit dem äußeren Blatt, der Arachnoidea, den von Liquor erfüllten Subarachnoidealraum. Die *Pia mater* besteht aus flachen Bindegewebszellen und kollagenen Fibrillen. Die Zellen der innersten Schicht liegen der Basallamina des Gehirns, die aus Gliazellen besteht, an. In der *Pia mater* verlaufen Blutgefäße, die in das ZNS eindringen können. Wo die Blutgefäße in die zentralnervöse Substanz eintreten, werden sie von leptomeningealem Bindegewebe begleitet. Im Bereich der Kapillaren des ZNS fehlt die meningeale Umhüllung der Blutgefäße. Hier erfolgt die Trennung der Blutbahn vom Extrazellularraum des ZNS durch die sogenannte Blut-Hirn-Schranke (*blood-brain barrier*, BBB). Diese besteht aus dem Kapillarendothel, der Basallamina und Gliazellen. Die Barrierefunktion wird vor allem durch das Endothel der Hirnkapillaren aufrechterhalten. Die Endothelzellen sind durch kontinuierliche *tight junctions* miteinander verbunden. Dies sind undurchlässige interzelluläre Verschmelzungen, die auf transmembranöse Verbindungsproteine zurückgehen. Durch die *tight junctions* wird der parazelluläre Transport und die freie Beweglichkeit von Transportproteinen in der Zellmembran unterbunden. So wird der Übertritt insbesondere von hydrophilen Stoffen aus

der Blutbahn in das ZNS verhindert, um die Hirnfunktion nicht zu stören (*Brightman MW et al., J. Cell Biol. 40 (1969) 648-677; Reese TS et al., J. Cell Biol. 34 (1967) 207-217*).

Ontogenetisch entwickelt sich das ZNS aus einer Verdickung des Ektoderms. Diese sogenannte Neuralplatte bildet an ihren lateralen Rändern die Neuralfalten. Die Neuralfalten wölben sich auf und verschmelzen median miteinander. Es entsteht das Neuralrohr. Die Wand des Neuralrohrs besteht aus Neuroepithelzellen, die als neuroepitheliale Keimzellen aufgefasst werden können. Die neuroepithelialen Keimzellen des Neuralrohrs sind anfänglich homogen in Bezug auf die DNA-Synthese, die Proliferationskinetik und die Ultrastruktur. Später differenzieren sie sich in die Vorläufer der Neuronen und Gliazellen, die als untrennbare funktionelle Einheit die Zellen des Nervengewebes darstellen. Zunächst bilden sich aus den Neuroepithelzellen die ersten primitiven Nervenzellen, die Neuroblasten. Sie durchlaufen verschiedene Entwicklungsstadien, aus denen schließlich die einzelnen Nervenzellformen entstehen. Nachdem die Bildung von Neuroblasten aufgehört hat, entstehen aus dem Neuroepithel Glioblasten. Diese differenzieren sich letztendlich in Astrozyten und Oligodendrozyten, die Gruppe der Makroglia (*Frederiksen K et al., J. Neurosci. 8 (1988) 1144-1151; Gage FH et al., Annu. Rev. Neurosci. 18 (1995) 159-192; Skoff RP, Dev. Biol. 139 (1990) 149-168*). Die Fortsätze der Astrozyten bilden die Basallamina des Gehirns und sind an der Aufrechterhaltung der BBB beteiligt. Astrozyten sind die wichtigsten Stoffträger für die Versorgung der Nervenzellen. Sie regulieren den Ionenhaushalt im ZNS, der unter anderem für die Erregungsübertragung an den Synapsen entscheidend ist. Astrozyten sind wichtig für die Immunabwehr. Sie gehören zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen und verhindern als Bestandteil der BBB den Austausch immunologisch wirksamer Stoffe und Zellen zwischen Blut und Nervengewebe. Verletzungen des ZNS führen zu einer Vermehrung und Vergrößerung von Astrozyten, wodurch Defekte gedeckt werden können. Während der Neurogenese bilden Frühformen der Astrozyten im sich entwickelnden ZNS Leitstrukturen, an denen Nervenfortsätze ihrem Zielgebiet zugeführt werden (*Hatten ME, Annu. Rev. Neurosci. 22 (1999) 511-39*). Oligodendrozyten kommen in der grauen und weißen Substanz vor. In der grauen Substanz liegen sie den Perikarya der Nervenzellen an, in der weißen Substanz bilden sie parallel zu markhaltigen Nervenfasern verlaufende Reihen. Die Fortsätze der Oligodendrozyten bilden die Markscheiden im ZNS.

Eine weitere Gliaform stellt die Gruppe der Mikroglia dar. Diese Zellgruppe stammt nicht von den Keimzellen des Neuroepithels ab, sondern wandert aus der Blutbahn ein. Die Mikroglia übernehmen die Aufgabe der Phagozytose und treten im ZNS überall dort auf, wo

Stoffe abzuräumen sind. Sie wirken bei immunologischen Prozessen als antigenpräsentierende Zellen mit. Zur Gruppe der Neuroglia gehören außerdem die Ependymzellen, die die ventrikulären Oberflächen des Gehirns auskleiden. Sie differenzieren sich in späteren Entwicklungsstadien aus den Keimzellen des Neuralepithels.

1.2 Neurale Stammzellen

Die Keimzellen des Neuralepithels können sich in alle neuronalen Zelltypen des ZNS differenzieren. Als neurale Stammzellen (NS Zellen) sind sie multipotent und in der Lage, eine große Zahl von Vorläuferzellen wie Neuroblasten oder Glioblasten zu generieren. NS Zellen behalten für die gesamte Lebensspanne des Organismus die Fähigkeit, sich zu teilen. Die aus ihnen durch Teilung hervorgehenden Tochterzellen können die Eigenschaften der Stammzellen behalten oder sich über das Stadium der Vorläuferzellen endgültig differenzieren (*Gage FH et al., Annu. Rev. Neurosci. 18 (1995) 159-192*). Obwohl ein Großteil der Zellen des ZNS während der Embryonalzeit und in der frühen postnatalen Zeit entsteht, kann die Proliferation neuraler Stammzellen noch im Gehirn des erwachsenen Säugers beobachtet werden. Auch hier entstehen kontinuierlich neue Neuronen (*Altman J, J. Comp. Neurol. 124 (1965) 319-335*). Die NS Zellen können aus den verschiedensten Regionen des erwachsenen ZNS isoliert werden. Man findet sie in den Wänden der Ventrikel, im Hippokampus (*Lois C et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2074-2077*), im Striatum (*Reynolds BA et al., Science 255 (1992) 1707-1710*) oder im RM (*Weiss S et al., J. Neurosci. 16 (1996) 7599-7609*).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten C17.2 NS Zellen (siehe Kap. 2.1.1) wurden aus der äußeren Germinalzone (*external germinal layer, EGL*) des Kleinhirns neugeborener Mäuse isoliert. Die EGL ist eine durch kleine mitotische Zellen charakterisierte Zone an der Oberfläche des sich entwickelnden Kleinhirns. Sie entsteht am 13. Tag der Embryogenese aus Zellen des 4. Ventrikels, die in die Kleinhirnrinde wandern, und bildet sich im murinen Organismus bis zum Ende der dritten postnatalen Woche zurück (*Snyder EY et al., Cell 68 (1992) 33-51*).

Mit Hilfe retroviraler Vektoren wurde das Genom der C17.2 NS Zellen verändert. Retroviren sind aufgrund ihrer Struktur und ihres Lebenszyklusses in der Lage, fremde genetische

Sequenzen in das Genom von Säugetierzellen einzuschleusen. Das Genom der Retroviren besteht aus zwei RNA-Einzelsträngen. Bei der Replikation wird die auf den RNA-Strängen enthaltene Information durch das Enzym Reverse Transkriptase in eine Doppelstrang-DNA übersetzt. Diese DNA-Sequenz muss zur Transkription in das Genom einer infizierten Zelle integriert werden. Denn für die Synthese viraler RNA-Transkripte werden zelluläre RNA-Polymerasen und andere zelluläre Faktoren benötigt (*Luciw PA et al., in "The Retroviridae", Levy JA (Ed.) (1992) 159-298*). Durch Inkorporation fremder Gene können Retroviren zur Übertragung auch nicht-retroviraler Sequenzen in das Genom von Zellen benutzt werden (*Bandyopadhyay PK et al., Mol. Cell. Biol. 4 (1984) 749; Joyner A et al., Nature 305 (1983) 556; Tabin CJ et al., Mol. Cell. Biol. 2 (1982) 426*). Die C17.2 NS Zellen wurden durch Infektion mit einem das Onkogen *v-myc* tragenden retroviralen Vektor immortalisiert (*Ryder EF et al., J. Neurobiol. 21 (1990) 356-375; Snyder EY et al., Cell 68 (1992) 33-51*). Dies führte zu einer unbegrenzten mitotischen Aktivität der C17.2 NS Zellen ohne tumoröse Entartung (*Land H et al., Mol. Cell. Biol. 6 (1986) 1917-1925*). Des Weiteren sind die C17.2 NS Zellen durch retroviralen Transfer des *lacZ*-Reportergens genetisch markiert. Dies erlaubt ihre Detektion mit molekularbiologischen und enzym- bzw. immunhistochemischen Methoden. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) kann das *lacZ*-Gen unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide aus der chromosomalen DNA der Zellen amplifiziert werden (siehe Kap. 2.2.7). Da das *lacZ*-Reportergen für das Enzym β -Galaktosidase kodiert, kann die Expression dieses Gens in C17.2 NS Zellen auch auf Proteinebene mit Hilfe des Western Blots mit Antikörpern gegen β -Galaktosidase nachgewiesen werden (siehe Kap. 2.2.10). Die Expression von β -Galaktosidase ermöglicht darüber hinaus eine Detektion von C17.2 NS Zellen *in situ*. Das Enzym β -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von Indolyl-Glykosiden in Kohlenhydrate und Indoxyl-Reste. Als Substrat für diese Reaktion wurde 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal) verwendet. Die aus dem farblosen Substrat X-Gal enzymatisch freigesetzten Indoxyl-Reste werden unter Verbrauch von Sauerstoff zu einem unlöslichen blauen Farbstoff oxidiert. Auf diese Weise können i.v. injizierte C17.2 NS Zellen lichtmikroskopisch im Gewebe nachgewiesen werden (siehe Kap. 2.2.11).

In vitro Untersuchungen zeigten, dass die C17.2 NS Zellen die Eigenschaften neuraler Stammzellen aufweisen (*Ryder EF et al., J. Neurobiol. 21 (1990) 356-375*). Dies wurde durch *in vivo* Experimente mit den multipotenten, immortalisierten C17.2 Zellen bestätigt (*Snyder EY et al., Cell 68 (1992) 33-51*). Nach direkter Injektion von C17.2 NS Zellen in das Gehirn neugeborener und erwachsener Mäuse integrierten sich die Zellen in die Zytoarchitektur des

gesunden murinen Gehirns. Die intrakranial (i.c.) injizierten Zellen wurden bis zu 22 Monate nach der Transplantation im murinen Gehirn nachgewiesen, ohne dass pathologische Veränderungen der zentralnervösen Strukturen auftraten. Dabei wurde eine Differenzierung der transplantierten C17.2 NS Zellen in Neuronen und Gliazellen beobachtet.

1.3 Therapie zentralnervöser Erkrankungen durch Stammzelltransplantation

Da durch Transplantation in das Gehirn eingebrachte NS Zellen in der Lage sind, dauerhaft ein integraler Bestandteil der zentralnervösen Substanz zu werden, liegt es nahe, NS Zellen als potentiell Therapeutikum für den strukturellen und funktionellen Verlust von Gehirnsubstanz zu erwägen. Der strukturelle und funktionelle Ersatz von Hirngewebe wird bei Verlust von Hirnschicht durch Krankheit, Degeneration oder Traumen nötig. In das Gehirn transplantierte NS Zellen könnten durch ihre Fähigkeit zur Integration in die vorhandene Hirnschicht und ihre Fähigkeit zur Proliferation Substanzverluste ausgleichen. Durch komplexe epigenetische Signale werden die in die zentralnervöse Substanz transplantierten NS Zellen in gesteigertem Maße zur Differenzierung angeregt (*Whittemore SR et al., Mol. Neurobiol. 12 (1996) 13-38*). Zudem sezernieren sie trophische Faktoren wie *nerve growth factor* (NGF), die wiederum positiv auf das Überleben kranker und gesunder Neuronen wirken (*Gage FH et al., Neuron 6 (1991) 1-12*).

Die Sekretion trophischer Faktoren wie NGF durch transplantierte NS Zellen ist ein wichtiger therapeutischer Aspekt. So wird beispielsweise die bei der Alzheimer Erkrankung auftretende Degeneration cholinergischer Neurone durch einen Mangel an NGF verursacht. Die Alzheimer-Krankheit ist eine progrediente Hirnatrophie, von der vorwiegend weibliche Patienten ab dem 40. Lebensjahr betroffen sind. Zu Beginn der Erkrankung stehen Gedächtnisstörungen wie mangelnde Merkfähigkeit im Vordergrund der klinischen Symptomatik. In einem Tiermodell für die Alzheimer Erkrankung wurde die therapeutische Wirkung neuraler Stammzellen gezeigt. Durch die Transplantation neuraler Stammzellen und die damit verbundene indirekte Zufuhr von NGF wurde die Degeneration der cholinergen Neurone eingeschränkt (*Martinez-Serrana A et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 1858-1863*).

Auch im Bereich der Makroglia gelingt der substanzliche und funktionelle Ersatz von

Hirngewebe. Dies wurde am Beispiel der *shiverer (shi)* Maus gezeigt. Die *shi* Maus leidet an einer das gesamte ZNS betreffenden Demyelinisierung (Molineaux SM et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7542-7546). Als herdförmige Entmarkung ist die Demyelinisierung beim Krankheitsbild der Multiplen Sklerose von pathologischer Relevanz. Die Multiple Sklerose manifestiert sich vor allem zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr gehäuft bei Frauen. Die oft schubförmig verlaufende Krankheit äußert sich durch verschiedenste zerebrale und spinale Symptome. Insbesondere treten spastische Paresen, Sensibilitätsstörungen und zerebellare Ataxien auf. Am Modell der *shi* Maus wurde eine Strategie für die Therapie dieser Erkrankung aufgezeigt. Durch Transplantation neuraler Stammzellen konnten die Demyelinisierungen im ZNS der *shi* Maus weitgehend behoben werden. Den *shi* Mäusen direkt i.c. implantierte NS Zellen verteilten sich über das gesamte vom Verlust der weißen Substanz betroffene Gehirn. Ein Großteil der transplantierten Zellen differenzierte sich in Oligodendrozyten, wodurch eine Remyelinisierung von bis zu 52 % der Axone erreicht wurde (Yandava BD et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 7029-7034). Dieses Modell bestätigt, dass der globale Ersatz zentralnervöser Substanz durch Transplantation von NS Zellen grundsätzlich möglich ist.

Viele Erkrankungen des ZNS sind durch funktionelle Defekte neuraler Zellen bedingt. Das im Rahmen der Therapie funktioneller Hirndefekte wohl am meisten untersuchte Krankheitsbild ist die Parkinson Erkrankung. Im Falle der Parkinson Erkrankung sind Neurone der *Substantia nigra* des Striatums nicht mehr oder nur eingeschränkt in der Lage, den Transmitter Dopamin zu synthetisieren. Dadurch kommt es zu der für das Parkinson-Syndrom typischen Symptomen-Trias aus Akinese, Rigor und Tremor. Die Parkinson Erkrankung ist die häufigste neurologische Erkrankung des fortgeschrittenen Lebensalters, die vor allem Männer im Alter über 60 betrifft. Um die therapeutische Kapazität von NS Zellen im Rahmen der Parkinson Erkrankung zu untersuchen, wurden NS Zellen in das Striatum von an Parkinson erkrankten Ratten transplantiert. Die transplantierten NS Zellen synthetisierten nach ihrer Differenzierung den fehlenden Neurotransmitter Dopamin und übernahmen die Funktion der degenerierten dopaminergen Neurone des Striatums, wodurch im Tiermodell eine Besserung der klinischen Symptomatik erzielt wurde (Svendsen CN et al., Exp. Neurol. 148 (1997) 135-146).

Durch genetische Modifikation neuraler Stammzellen können diese als Vehikel für den Transfer fremder Gene in das ZNS benutzt werden. Dass NS Zellen auch nach Transplantation ins ZNS zur Expression fremder Gene in der Lage sind, wurde von E.

Snyder in Transplantationsstudien mit C17.2 NS Zellen nachgewiesen (*Snyder EY et al., Cell 68 (1992) 33-51*). Die stabile Expression fremder Genprodukte im ZNS durch transplantierte NS Zellen ist ein wichtiger therapeutischer Ansatz. Durch genetisch modifizierte NS Zellen, die sich nach Transplantation in die Zytoarchitektur des ZNS integrieren, können Genprodukte von therapeutischem Interesse am Ort der Erkrankung direkt exprimiert werden und ihre therapeutische Wirkung entfalten. Dies ist von Bedeutung bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise der lysosomalen Speicherkrankheiten des ZNS. Lysosomale Speicherkrankheiten sind durch den Mangel oder Defekt von Enzymen gekennzeichnet. Es kommt zur intrazellulären Anhäufung von Stoffwechselprodukten, die durch die fehlende Enzymaktivität nicht abgebaut werden können. Neben verschiedensten Organmanifestationen und somatischen Veränderungen treten bei Beteiligung des ZNS Intelligenzdefekte bis hin zur geistigen Retardierung auf. Um das durch genetische Modifikation gesteigerte Potential neuraler Stammzellen bei der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen aufzuzeigen, wurde das Beispiel der Mukopolysaccharidose ausgewählt. Bei der Mukopolysaccharidose mangelt es am Enzym β -Glukuronidase, das für den Abbau von Glykosaminoglykanen verantwortlich ist. Durch den fehlenden Abbau akkumulieren die Glykosaminoglykane im Gehirn. Im Tiermodell konnte durch Transplantation genetisch modifizierter C17.2 NS Zellen eine Korrektur des Enzymmangels erreicht werden. Die C17.2 NS Zellen waren vor der Transplantation mit einem für die β -Glukuronidase kodierenden retroviralen Vektor infiziert worden (*Snyder EY et al., Mental Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 1 (1995) 27-38*).

1.4 Relevanz der Untersuchungen

Um das therapeutische Potential von NS Zellen in ausreichendem Maße nutzen zu können, musste ein Weg gefunden werden, diese einfach und effektiv in die zentralnervöse Substanz einzubringen. In den bisher beschriebenen Tiermodellen gelang die Transplantation der NS Zellen in das Gehirn durch direkte Injektion in das Hirngewebe oder in das Ventrikelsystem. Da die direkte i.c. Injektion eine invasive und komplizierte Methode der Transplantation darstellt, sollte untersucht werden, ob die vergleichsweise einfache und wenig invasive intravenöse Gabe von Stammzellen, wie sie beispielsweise im Rahmen von Knochenmarkstransplantationen durchgeführt wird, ein potentieller Weg auch für die zentralnervöse Stammzelltherapie ist.

Da NS Zellen einen endogenen Bestandteil der zentralnervösen Substanz darstellen und multipotente Vorläufer aller neuronalen Zellarten außer der Mikroglia sind, sollte untersucht werden, ob auch eine Integration i.v. verabreichter NS Zellen in das ZNS möglich ist. Hierzu sollte ein Tiermodell etabliert werden. Dieses sollte nicht nur die Möglichkeit der Transplantation von NS Zellen in das ZNS durch i.v. Injektion aufzeigen, sondern auch, ob durch genetische Modifikation der i.v. verabreichten NS Zellen ein Transfer fremder Gene in das Gehirn möglich ist.

Obwohl die BBB das Blutgefäßsystem vom Extrazellularraum des Gehirns trennt, wurden hämatopoietische Stammzellen aus dem KM in Gehirnen von Mäusen nachgewiesen, denen diese Zellen i.v. verabreicht worden waren. Es war eine Migration der hämatopoietischen Zellen aus dem Blutgefäßsystem in das Gehirn erfolgt. Bereits drei Tage nach der i.v. Injektion konnten die hämatopoietischen Stammzellen im Gehirn von Rezipienten-Mäusen nachgewiesen werden. Sie differenzierten sich schließlich zu Mikroglia und Astrozyten (*Eglitis MA et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997) 4080-4085*). Ob die i.v. Injektion auch für NS Zellen eine effektive Methode der Transplantation ins ZNS darstellt, sollte zunächst geklärt werden. Hierzu sollten C17.2 NS Zellen Rezipienten-Mäusen über eine Schwanzvene injiziert werden. Der Nachweis der i.v. injizierten Zellen sollte anhand ihres *lacZ*-Reportergens und seiner Genprodukte auf molekularer, immunologischer und histochemischer Ebene erfolgen.

Da eine systemische Injektion die NS Zellen durch den gesamten Organismus zirkulieren lässt, sollten nicht nur das Gehirn, sondern auch periphere Organe und Gewebe von Rezipienten-Mäusen auf das Vorhandensein von C17.2 NS Zellen untersucht werden. Außerdem sollte geklärt werden, ob die i.v. injizierten NS Zellen aus dem Blut bevorzugt in das mit ihnen verwandte zentralnervöse Gewebe oder in andere Organe oder Gewebe migrieren. Bei erfolgreicher Transplantation sollte die regionale Verteilung der in die Hirnsubstanz integrierten C17.2 NS Zellen berücksichtigt werden. Schließlich sollte geprüft werden, ob sich die Implantation i.v. injizierter NS Zellen in das ZNS durch beim Versuchsaufbau veränderte Parameter oder unterschiedliche Eigenschaften der Versuchstiere modulieren und optimieren lässt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellkulturtechniken

2.1.1 Kultivierung neuraler Stammzellen

C17.2 neurale Stammzellen aus dem Kleinhirn der Maus (*Snyder EY et al., Cell 68 (1992) 33-51*) wurden von Dr. Evan Y. Snyder, Boston zur Verfügung gestellt. Sie wurden in gesättigter Wasserdampfatosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Konfluente Zellkulturen wurden mittels Trypsin/EDTA (Merck, Darmstadt) dissoziiert und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturgefäße (Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg) eingesät. Die Kultivierung erfolgte in *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) mit 862 µg/ml Glutamax 1 (Life Technologies, Karlsruhe), 10 % fötalem, hitzeinaktiviertem Kälberserum (FKS, Biochrom, Berlin) und 5 % Pferdeserum (*horse serum*, HS, Biochrom, Berlin).

2.1.2 Etablierung primärer Zellkulturen aus Knochenmark

Knochenmark (KM) zur Etablierung primärer Zellkulturen wurde aus den *Femora* von drei bis vier Wochen alten, weiblichen und männlichen CD-1 Mäusen gewonnen. Die bei der Autopsie entnommenen Knochen wurden nach Entfernung des umgebenden Muskelgewebes bis zur Knochenmarkentnahme in PBS aufbewahrt. Unter sterilen Bedingungen wurde die Markhöhle eröffnet, und das Mark mittels einer 1 ml Einmalspritze (Becton Dickinson, New Jersey, USA) und einer 25G1, 0,5 × 25 mm Kanüle (Becton Dickinson, Dublin, Irland) mit dem Kulturmedium herausgespült. Mit dieser Technik wurden pro *Femur* zwischen 1,5 und 2 × 10⁷ Zellen gewonnen. Zur Kultur der Knochenmarkzellen wurden dem Medium als Wachstumsfaktoren für die Hämatopoese Interleukin 3 (IL-3, R&D Systems, Wiesbaden), Interleukin 6 (IL-6, R&D Systems, Wiesbaden), Stammzellfaktor (*stem cell factor*, SCF, R&D Systems, Wiesbaden) und granulozyten-makrophagen-koloniestimulierender Faktor (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*, GM-CSF, Boehringer, Mannheim) zugesetzt. Um Keimwachstum zu verhindern, erfolgte die Kultur unter Zugabe von Antibiotika (Penicillin/Streptomycin, Biochrom, Berlin).

Medium für die Knochenmark-Kultur

DMEM mit

15 %	FKS
50 ng/ml	IL-3
100 ng/ml	IL-6
100 ng/ml	SCF
10 U/ml	GM-CSF
500 U/ml	Penicillin
500 U/ml	Streptomycinsulfat

2.1.3 Untersuchung von Zellkulturen auf Kontamination

Neben Kontaminationen durch das Personal spielen Trypsin oder Medienzusätze wie FKS bei der Infektion von Zellkulturen mit Mykoplasmen eine Rolle. Um derartige Kontaminationen auszuschließen, erfolgte eine regelmäßige Untersuchung der Zellkulturen auf Mykoplasmen. Hierzu wurden die Zellen in p30-Petrischalen (Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg) eingesät und in geringer Zelldichte 10 min mit einem 3 : 1 Methanol/Eisessig-Gemisch (v/v; Merck, Darmstadt) fixiert. Auf die getrockneten Zellen wurde eine Lösung mit dem Farbstoff Bisbenzimid (H33258, 50 µg/ml, Boehringer, Mannheim) gegeben. Auf diese Weise werden C-G-reiche Bereiche in der DNA spezifisch angefärbt. Mykoplasmen können dadurch im Fluoreszenzmikroskop als extrazelluläre, auf der Zellmembran liegende fluoreszierende Einzelpunkte erkannt werden.

2.1.4 Enzymhistochemischer Nachweis von *lacZ*

Durch X-Gal-Färbung kultivierter Zellen konnte die durch *lacZ* kodierte β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Zellen für einen Zeitraum von 20 min in 2 % Paraformaldehyd (Sigma, Deisenhofen) in PBS fixiert. Um das Enzym β -Galaktosidase nicht durch Fixativreste in seiner Aktivität zu hemmen, wurden die Zellen vor dem Färben mit PBS gewaschen. Für die X-Gal-Färbung wurden die Zellen mit der das Substrat 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid (X-Gal, 50 mg/ml in Dimethylformamid, Promega, Madison, USA) enthaltenden Färbelösung (siehe Kap. 2.2.11.1) bedeckt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zellen, in denen das Substrat X-Gal durch die β -Galaktosidase

umgesetzt wurde, erschienen bläulich.

2.1.5 Untersuchung chemotaktischer Eigenschaften neuraler Stammzellen

Zur Klärung der Frage, ob die Ansiedlung neuraler Stammzellen in den unterschiedlichen Organen des Organismus der Maus nach i.v. Injektion auf chemotaktischer Anziehung beruht, wurde ein Transwell-System etabliert. Es wurden 24-Loch-Platten der Firma Costar, Bodenheim mit FluoroBlok Transwell-Einsätzen der Firma Falcon, Heidelberg verwendet. In die 24-Loch-Platten wurden die auf ihre Chemoattraktivität gegenüber NS Zellen zu untersuchenden Gemische gegeben. Die NS Zellen wurden in die Transwell-Einsätze eingesät. Die Poren der Transwell-Membranen (3 µm Porengröße) konnten von den NS Zellen aktiv passiert werden, um an der Unterseite der Membran näher am Proteingemisch anzuwachsen. Für ein passives Durchfallen der Zellen waren die Poren zu eng.

2.1.5.1 Herstellung von Proteinextrakten aus murinen Geweben

Für die Untersuchung von Proteinen aus murinen Geweben hinsichtlich ihrer chemotaktischen Wirkung auf NS Zellen wurden Proteinlysate von Organen hergestellt. Hierzu wurden die bei der Autopsie entnommenen Organe in DMEM mit 10 % FKS und 5 % HS homogenisiert. Die Organkonzentration im Medium betrug 0,2 g/ml.

2.1.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Gewebelysat wurde das Microtiter Plate Protocol der Firma Pierce, Illinois, USA verwendet. Es wurden jeweils Verdünnungsreihen aus BSA mit PBS, Medium (DMEM, 10 % FKS, 5 % HS) mit PBS und Gewebelysat mit PBS hergestellt. Durch Messung der Absorption der einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 570 nm konnte jeweils unter Berücksichtigung der Absorption von PBS allein aus der Verdünnungsreihe mit BSA eine Eichkurve erstellt werden. Anhand dieser Kurve wurden dann unter Berücksichtigung der Absorption des Mediums die Proteinkonzentrationen im Gewebelysat bestimmt.

2.1.5.3 Transwell-Kultur

Vor der Einsaat der NS Zellen wurden die FluoroBlok Membranen 24 h in DMEM mit 10 % FKS und 5 % HS in gesättigter Wasserdampfatosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für die Aussaat der NS Zellen wurden die Transwell-Einsätze in eine 24-Loch-Platte mit Protein- und Zellgemischen gesetzt. Es wurden auf jede Membran in einem Gesamtvolumen von 200 µl Medium 1×10^5 Zellen ausgesät. Nach 4 h Wachstum in gesättigter Wasserdampfatosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Transwell-Einsätze aus den 24-Loch-Platten mit den Protein- und Zellgemischen genommen. Die Zellen wurden mit 100 % Methanol (Merck, Darmstadt) auf den FluoroBlok Membranen fixiert und mit Ethidiumbromid (0,01 %, Stammlösung mit $M = 394,32 \text{ g/mol}$, Merck, Darmstadt) angefärbt. Die gefärbte Membran wurde aus dem Transwell-Einsatz herausgeschnitten und auf einen Objektträger gebracht. Die mit Polyethylen beschichtete Membran der FluoroBlok Einsätze absorbiert sichtbares Licht im Bereich von 490 bis 700 nm. Nach Anfärben mit Ethidiumbromid wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop die durch Interkalierung des Ethidiumbromids in die DNA-Doppelhelix fluoreszierenden Zellen an der Unterseite der Membran sichtbar. Zum Auszählen der durch die Poren der Membranen gewanderten Zellen wurden die gefärbten Membranunterseiten unter dem Fluoreszenzmikroskop nach Anregung mit UV-Licht photographiert, und die fluoreszierenden Zellen auf den Photographien ausgezählt.

2.2 Molekularbiologische Techniken

2.2.1 Chemikalien

Bei den Rezepten im molekularbiologischen Teil der vorliegenden Dissertation wurden für die verwendeten Chemikalien keine Angaben zu den Herstellern gemacht. Folgende Liste gibt einen Überblick über die Firmen, von denen diese Chemikalien bezogen wurden.

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
K-Ferrizyanid	Merck, Darmstadt
K-Ferrozyanid	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
MgCl_2	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Sigma, Deisenhofen
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt
Na_2HPO_4	Seromed-Biochrom, Berlin
Nonidet-P-40	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sulfosalicylsäure	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris/HCl	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

2.2.2 Stammlösungen und Puffer

Die Rezepte für Stammlösungen und Puffer für molekularbiologische Analysen sind im Folgenden angeführt.

50 × TAE

2 M Tris/HCl pH 8

1 M Eisessig

0,1 M EDTA

Zur Herstellung von 1 × TAE Puffer wurde 50 × TAE 1 : 50 mit autoklaviertem Wasser verdünnt.

PBS

13,7 mM NaCl

2,7 mM KCl

80,9 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

2.2.3 DNA-Isolierung

Zur Isolierung von DNA wurde der QiaAmp Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Mit Hilfe dieses Kits erfolgte die DNA-Isolierung in drei Schritten: nach der mechanischen und chemischen Lyse des Gewebes bzw. der Zellen wurde die DNA aus dem Lysat an die positiven Ladungen von Ionenaustauschromatographiesäulen reversibel gebunden. Um die DNA von Verunreinigungen zu befreien, die eine nachfolgende PCR (siehe Kap. 2.2.7) stören könnten, wurde die Silikatmembran der Säulen mit der gebundenen DNA mehrmals gewaschen. Die gereinigte DNA wurde mit autoklaviertem Wasser von den QiaAmp Säulen eluiert.

2.2.3.1 DNA-Isolierung aus murinen Geweben

Die zur DNA-Gewinnung vorgesehenen Organe wurden je nach Gewebeart zu einzelnen Proben mit einem Gewicht von 10 bis 50 mg aufgeteilt. Nach mechanischer Zerkleinerung der Organteile mit Hilfe eines Skalpells erfolgte die DNA-Isolation mit den im Kit mitgelieferten Reagenzien entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die isolierte DNA wurde mit 400 μ l auf 70 °C vorgeheiztem autoklaviertem Wasser von der Silikatmembran der QiaAmp Ionenaustauschchromatographiesäulen eluiert.

2.2.3.2 DNA-Isolierung aus Mäuseblut und kultivierten Zellen

Heparinisiertes Blut (maximal 1 ml pro Versuchstier) wurde mit PBS verdünnt und 20 min zentrifugiert (6000 rpm, Tischzentrifuge, Hettich Mikroliter, Tuttlingen). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Blutzellen in 200 μ l PBS aufgenommen. Die DNA-Isolation aus der Zellsuspension erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die an die Silikatmembran der QiaAmp Säulen adsorbierte DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 200 μ l auf 70°C vorgeheiztem autoklaviertem Wasser von den Säulen eluiert.

2.2.4 Quantifizierung genomischer DNA

Um die im jeweiligen Eluat befindliche DNA-Menge quantitativ zu erfassen, wurde die Absorption des 1 : 20 mit autoklaviertem Wasser verdünnten DNA-Gemisches photometrisch bestimmt. Da DNA Licht im ultravioletten Bereich zwischen 250 und 270 nm absorbiert, erfolgte die Konzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 260 nm (OD_{260nm}). Durch gleichzeitige Bestimmung der Absorption bei 280 nm (OD_{280nm}) wurde der Proteingehalt des DNA-Gemisches bestimmt. Anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 und 280 nm ($A_{260/280}$ Ratio) wurde die Reinheit der isolierten DNA beurteilt. Um eine hohe Qualität der isolierten DNA und die Korrektheit der durch Messung der OD_{260nm} ermittelten Werte sicherzustellen, wurden nur DNA-Proben für weitere Analysen verwendet, deren $A_{260/280}$ Ratio zwischen 1,7 und 1,9 lag.

2.2.5 Konzentrierung genomischer DNA

Zur Erhöhung der Konzentration des bei der DNA-Isolierung gewonnenen Eluats wurde eine Isopropanolfällung durchgeführt. Hierzu wurden die zu fällenden Proben mit 1/10 vol 3 M Natriumacetat (Merck, Darmstadt) versetzt. Nach Zugabe des zweifachen Gesamtvolumens Isopropanol (Merck, Darmstadt) wurde die Probe bis zur Ausfällung der DNA geschwenkt, anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 45 min inkubiert. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 10000 rpm (Eppendorf-Zentrifuge) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol (Merck, Darmstadt) gewaschen, um Salzreste zu entfernen. Das luftgetrocknete Pellet wurde in der gewünschten Menge autoklavierten Wassers aufgenommen.

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine Elektrophorese in Agarosegelen durchgeführt. Die Lokalisation der DNA innerhalb des Agarosegels konnte hierbei unmittelbar durch Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid bestimmt werden. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und kann durch seine Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.2.6.1 Herstellung von Agarosegelen

Zum Gießen der Gele wurden bis zu 2 % Agarose (w/v, FMC Bioproducts, Rockland, USA) in $1 \times$ TAE bis zum Entstehen einer transparenten Lösung geschmolzen, um anschließend im Gelschlitten mit den gewünschten Kämmen (BioRad, München) wieder zu erhärten. Hierbei formt die Agarose eine Matrix, deren Dichte von der Konzentration abhängt.

2.2.6.2 Elektrophorese

Nach Einsetzen des Gelschlittens in eine mit Elektrophoresepuffer gefüllte horizontale Elektrophoresekammer der Firma BioRad wurden die Kämmen aus dem festen Gel gezogen. Die gewünschte DNA-Menge wurde in einem Verhältnis von 1 : 6 mit Ladepuffer verdünnt und in die entstandenen Taschen des Gels pipettiert. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes an das Gel wandert die negativ geladene DNA bei neutralem pH in Richtung Anode, wobei die Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum \log_{10} der Zahl der Basenpaare des

Fragments ist. Als Elektrophoresepuffer wurde ausschließlich $1 \times$ TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophoresen wurden bei 80 bis 100 V durchgeführt. Um die Größe der jeweiligen DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurden entsprechende DNA-Längenstandards der Firma Boehringer, Mannheim mit der zu untersuchenden DNA auf das Agarosegel aufgetragen.

Ladepuffer

0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol
30 % (v/v)	Glycerin
69,5 % (v/v)	$1 \times$ TAE

2.2.6.3 Sichtbarmachen der DNA im Agarosegel

Um die DNA im Agarosegel sichtbar zu machen, wurde diese mit dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid (10 mg/ml in $1 \times$ TAE; Stock 100 mg/ μ l, Merck, Darmstadt) angefärbt. Das unter UV-Bestrahlung fluoreszierende Bandenmuster wurde photographisch dokumentiert (Transilluminator, 266 nm, Herolab, Wiesloch).

2.2.7 DNA-Amplifikation durch PCR

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird ein DNA-Segment amplifiziert, welches zwischen zwei DNA-Regionen bekannter Sequenz liegt. Es werden zwei Oligonukleotide als "Primer" für multiple, von einer DNA-Polymerase katalysierte Syntheseschritte verwendet. Die beiden Oligonukleotidprimer haben verschiedene Sequenzen, welche jeweils komplementär zu den das zu amplifizierende DNA-Fragment flankierenden Sequenzen sind. Durch die 5'-Enden der verwendeten Primer werden die Enden der amplifizierten Doppelstrang-DNA bestimmt. Ihre Länge ist definiert durch ihren Abstand. Zunächst muss eine Denaturierung der DNA erfolgen. Dies wird durch Erhitzen des PCR-Reaktionsgemisches, welches einen Überschuss an Primern und Desoxynucleotid-5'-triphosphaten (dNTPs) enthält, erreicht. Zum Binden der Oligonukleotide an die entsprechenden DNA-Sequenzen muss das Reaktionsgemisch auf die für die verwendeten

Primer optimale Bindungstemperatur abgekühlt werden. Die gebundenen Primer können mittels der thermostabilen DNA-Polymerase verlängert werden. Dieser Zyklus aus DNA-Denaturierung, Binden der Primer und DNA-Synthese wird ca. 25 bis 35 Mal wiederholt, um eine im Agarosegel nachweisbare Menge von Kopien des gewünschten DNA-Fragments zu erhalten.

2.2.7.1 Oligonukleotidprimer

Die Spezifität der für die PCR verwendeten Primer ist abhängig von deren Länge und der Temperatur, bei der sie an die DNA-Matrize binden. Für eine hohe Sequenzspezifität sollte die Bindungstemperatur der Primer in der PCR-Reaktion nur wenige Grade von der Temperatur abweichen, bei der Primer und Matrizen-DNA auseinanderdissoziieren (T_m). Die beiden Primer sollten sich bezüglich ihrer T_m nicht um mehr als 2-3 °C unterscheiden. Um die für die jeweils verwendeten Primerpaare optimale Bindungstemperatur zu bestimmen, wurden mit Hilfe einer Gradienten-PCR-Maschine (Eppendorf Mastercycler Gradient, Hamburg) verschiedene Bindungstemperaturen für ein Primerpaar getestet.

Die für die Analysen verwendeten Primer wurden in der AG BioDV in der GSF hergestellt.

Primer zum Nachweis *lacZ*-spezifischer Sequenzen

Name	Sequenz (5'→3')	DNA Position (bp)
LacZ5innen	TTG CAG CAC ATC CCC CTT TC	1366-1385
LacZ3innen	TAA TTC GCG TCT GGC CTT CC	1710-1691

2.2.7.2 Polymerase und Puffer

Bei den PCR-Reaktionen wurde eine thermostabile DNA-Polymerase (5 U/μl, AmpliTaq Gold™, Perkin-Elmer, Weiterstadt) verwendet. Sie wurde in inaktiver Form zum Reaktionsgemisch gegeben und durch Erhitzen auf 94 °C (12 min) aktiviert. Vom selben Hersteller wurde der Puffer für die PCR bezogen (GeneAmp® 10 × PCR Puffer).

2.2.7.3 Reaktionsansatz

Für die PCR-Amplifikation wurden zu einem Reaktionsgemisch mit Gesamtvolumen von 100 µl 200 ng bis 1 µg isolierter DNA zugegeben. Das 100-µl PCR-Reaktionsgemisch enthielt 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM jedes Desoxynucleotid-5'-triphosphats (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 5 U AmpliTaq Gold DNA-Polymerase und 25 pmol jedes Primers.

PCR mit *lacZ*-Primern zur Detektion *lacZ* spezifischer Sequenzen

Reagenz	eingesetzte Menge pro 100 µl Reaktionsansatz
Ausgangs-DNA	1 µg
AmpliTaq Gold™	5 U
5'-Primer	25 pmol
3'-Primer	25 pmol
10 × PCR Puffer	10 µl
dNTP-Mix (1,25 mM/dNTP)	16 µl
H ₂ O	<i>ad</i> 100 µl

Um Kontaminationen der PCR-Reaktionsgemische zu vermeiden, wurden diese bis zur Zugabe der DNA-Probe ausschließlich in einem eigens dafür eingerichteten Reinraum unter sterilen Bedingungen pipettiert. Außerdem wurden die Reaktionsgemische bis zum Start der PCR-Reaktion bei 4 °C aufbewahrt und vor Beginn der Reaktion kurz abzentrifugiert.

Programm für die PCR-Reaktion

Für die PCR-Reaktionen wurde die PCR-Maschine (Perkin-Elmer, Weiterstadt) wie folgt programmiert:

Funktion	Dauer	Temperatur
Hitzeaktivierung der AmpliTaq Gold™	12 min	94°C
DNA-Denaturierung	30 sek	94°C
Primerhybridisierung	30 sek	60°C
Primerelongation	1 min	72°C
Finale Primerelongation	7 min	72°C

Zur Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments wurden die Schritte DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung und –elongation insgesamt 35 Mal zyklisch wiederholt.

2.2.7.4 Sensitivität

Mit Hilfe dieses Protokolls konnten in einer Suspension *lacZ* negativer Zellen 0.01 % Zellen mit dem *lacZ*-Gen detektiert werden.

2.2.8 Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot Analysen

Für die Durchführung von Western Blot Analysen erfolgte die Proteinextraktion aus dem vorher in Gefriermedium (Reichert-Jung, Wiesloch) eingebetteten murinen Gehirn. Es wurden jeweils 20 aufeinanderfolgende koronare oder sagittale Kryostatschnitte von 20 µm Dicke zu einer Probe verarbeitet. Das Gefriermedium wurde durch Waschen mit PBS entfernt. Das Pellet aus zerkleinertem Hirngewebe wurde in 100 µl Lysismix aus Lysispuffer und Proteaseinhibitoren aufgenommen, homogenisiert und mit 500 µl Probenpuffer versetzt. Zur Inhibition von Serin-Proteasen wurde Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma, Deisenhofen) verwendet. Als Peptidaseinhibitor diente Leupeptin (Sigma, Deisenhofen). Durch Pepstatin A (Sigma, Deisenhofen) wurde die Wirkung von Pepsin, Cathepsin D und

Renin unterbunden. Als Trypsininhibitor wurde dem Lysispuffer Aprotinin (Sigma, Deisenhofen) zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation des Gemisches aus zerkleinertem Gewebe, Lysispuffer und Probenpuffer bei 99 °C zur Denaturierung der Proteine und nach 3-minütiger Zentrifugation (12000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge) wurde ein Aliquot des Überstandes für die nachfolgend beschriebene SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet.

Lysispuffer

1 %	Nonidet-P-40 (v/v)
0,4 %	Natriumdeoxycholat
66 mM	EDTA
10 mM	Tris-HCl pH 7,4

Proteaseinhibitoren

Proteaseinhibitor	Konzentration
PMSF	43,55 mg/ml
Leupeptin	5 mg/ml
Pepstatin A	5 mg/ml
Aprotinin	25 mg/ml

2 × Probenpuffer

60 mM	Tris/HCl pH 6,8
10 %	Glycerol
1 %	SDS
1 %	β-Mercaptoethanol
0,01 %	Bromphenolblau

2.2.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden denaturierte Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das im Probenpuffer enthaltene SDS bindet in einer Menge, die dem Molekulargewicht des entsprechenden Polypeptides proportional ist, an die denaturierten Proteine und bedingt deren negative Ladung. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Die SDS-Polypeptid-Komplexe wandern dem elektrischen Feld entsprechend durch das Gel. Durch ein Sammelgel, in dessen Taschen jeweils ein Aliquot des zu untersuchenden Proteingemisches pipettiert wird, erfolgt die Fokussierung der Proteine an der Grenze zwischen Trenngel und Sammelgel. Zur Auftrennung der Proteine wurden Trenngele mit einer Konzentration von 10 % bzw. 13 % Acrylamid verwendet. Das Sammelgel hatte stets eine Konzentration von 4 % Acrylamid.

2.2.9.1 Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Für das Gießen der vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gele und die Elektrophorese wurde das Mini Protean II System der Firma BioRad, München verwendet. Zunächst wurde das Trenngel zwischen den Glasplatten des Gelgießstandes gegossen, wobei ein Raum von etwa 2 cm unterhalb des oberen Randes der kleineren Glasplatte für das Sammelgel freigelassen wurde. Durch einen Platzhalter von 0,7 mm Dicke wurde der Abstand der beiden Glasplatten voneinander definiert. Bis zur vollständigen Auspolymerisation wurde das Trenngel mit in Wasser gesättigtem Butanol (Merck, Darmstadt) überschichtet, um am Ende eine gerade Geloberfläche zu erhalten. Vor Hinzufügen des Sammelgels wurde das Butanol abgegossen, und Butanolreste sowie unpolymerisiertes Acrylamid durch mehrmaliges Spülen der Geloberfläche mit deionisiertem Wasser entfernt. Auf das trockene Trenngel wurde die Mixtur für das Sammelgel gegossen, und ein Kamm zur Herstellung der Taschen für das Einfüllen der Proteingemische hineingesteckt.

Sammelgel

Substanz	4 %
H ₂ O	2,5 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1 ml
10 % SDS	40 µl
Acrylamid/Bis (30 %/0,8 %)	0,5 ml
TEMED	5 µl
10 % APS	50 µl

Trenngel

Substanz	10 %	12 %	13 %
H ₂ O	4 ml	2,5 ml	2 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 ml	2 ml	4,8 ml
10 % SDS	100 µl	75 µl	128 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	3,4 ml	3 ml	5,3 ml
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	64,5 µl

Das zur Herstellung der Gele benutzte Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %) wurde von der Firma BioRad, München bezogen.

2.2.9.2 Elektrophorese

Nach Einbringen der Gele in die vertikale Elektrophoresekammer und Überschichtung der Gele mit Laufpuffer wurden die Kämme aus dem polymerisierten Sammelgel gezogen. In die entstandenen Taschen wurden zwischen 5 und 20 µl des zu untersuchenden Proteingemisches pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V bis das Bromphenolblau-Band des Probenpuffers am Unterrand des Gels herausgelaufen war. Neben den Proben wurde ein Längenstandard in eine der Taschen des Gels gegeben. Der verwendete vorgefärbte Proteinstandard der Firma BioRad, München enthielt Proteine mit den Molekulargewichten 201 kDa, 122 kDa, 85 kDa, 41,8 kDa, 31,8 kDa, 18 kDa und

6,4 kDa.

Laufpuffer pH 8,3

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,1 %	SDS

2.2.10 Western Blot Analyse

Beim Western Blot werden die bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (BioRad, München) übertragen.

2.2.10.1 Proteintransfer von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Vor dem elektrophoretischen Transfer der im SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen mussten sowohl Gel als auch Membran für einen Zeitraum von 15 min in Blot-Puffer äquilibriert werden. Für den Transfer der Proteine wurde der "Semi Dry Blotting" Apparat der Firma BioRad, München verwendet. Das Gel und die Membran wurden zwischen zwei in Blot-Puffer getränkten extra dicken Filterpapieren der Firma BioRad, München (7,5 × 10 cm, 60 mm) zwischen den Elektroden der Blot-Apparatur angeordnet und zwar so, dass die Nitrozellulosemembran an der Seite der Anode zuliegen kam. Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 15 V für einen Zeitraum von 35 min.

Blot-Puffer pH 8,3

25 mM	Tris/HCl
192 mM	Glycin
20 %	Methanol

2.2.10.2 Anfärben der an die Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine

Um sicherzugehen zu können, dass der elektrophoretische Transfer der Proteine vom SDS-Polyacrylamid-Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgreich war, wurde die Membran mit dem wasserlöslichen Farbstoff Ponceau S (3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfophenylazo]-phenyl-azo)-2,7-naphthalendisulfonidsäure, Merck, Darmstadt) angefärbt. Dadurch wurden die Proteinbanden rötlich sichtbar. Für die Färbung mit Ponceau S wurde die Nitrozellulosemembran unter Schwenken in der Färbelösung inkubiert, bis die rötlichen Proteinbanden makroskopisch sichtbar waren. Der Farbstoff wurde mit entionisiertem Wasser zum Verblassen gebracht und verschwand bei den im Rahmen des "Western Blots" folgenden Waschschritten.

Ponceau S Stamm-Lösung

2 g	Ponceau S
30 g	Trichloressigsäure
30 g	Sulfosalicylsäure
ad 100 ml	H ₂ O

Zur Herstellung der Ponceau S Färbelösung wurde die Ponceau S Stamm-Lösung 1 : 9 mit deionisiertem Wasser verdünnt.

2.2.10.3 Coomassie-Färbung und Trocknen von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Zur Einschätzung des elektrophoretischen Transfers der Proteine vom SDS-Polyacrylamid-Gel auf die Nitrozellulosemembran wurden die im Gel verbliebenen Proteine mit Coomassie Brilliant Blau R250 (Merck, Darmstadt) angefärbt. Hierfür genügte eine einstündige Inkubation der Gele in der Coomassie-Färbelösung. Um die angefärbten Proteine erkennen zu können, musste der gefärbte Hintergrund entfärbt werden. Dazu wurden die Gele für einen Zeitraum von mehreren Stunden in einer Entfärbelösung geschwenkt. Bei der hier beschriebenen Färb- und Entfärbeprozedur schrumpften die SDS-Polyacrylamid-Gele um ca. 30 %. Durch Inkubation in Wasser konnte ihre ursprüngliche Größe wiederhergestellt werden. Die Trocknung der Gele erfolgte mit dem Gel-Trocknungs-System der Firma Novex, San Diego. Hierzu mussten die Gele in der mitgelieferten Gel-Trocknungs-Lösung für 15 min äquilibriert werden, um dann zwischen zwei Lagen in der Gel-Trocknungs-Lösung getränkten Zellophans eingespannt zu werden. Um das Entstehen von Rissen im Gel während des Trocknungs-Prozesses zu vermeiden, wurden Luftblasen zwischen Zellophan

und Gel entfernt.

Coomassie-Färbelösung

1 g	Coomassie Brilliant Blau R250
100 ml	Essigsäure
400 ml	H ₂ O
500 ml	Methanol

Entfärbelösung

500 ml	Methanol
75 ml	Essigsäure
425 ml	H ₂ O

2.2.10.4 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran

Um ein unspezifisches Binden der verwendeten Antikörper zu vermindern, wurden potentielle Bindungsstellen an der Nitrozellulosemembran durch Milchproteine abgesättigt. Dazu wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in PBS mit 10 % Frischmilch (1,5 % Fett) (Gesamtvolumen pro Membran 30 ml) inkubiert.

2.2.10.5 Antikörper-Inkubationen

Nach Entfernung der Blockier-Lösung durch Waschen der Nitrozellulosemembran in PBS wurde die Membran mit dem jeweils ersten Antikörper inkubiert. Die durchgeführten Western Blots dienten ausschließlich dem Nachweis des Enzyms β -Galaktosidase (121 kDa). Hierzu wurde als erster Antikörper der monoklonale Anti- β -Galaktosidase-Antikörper der Firma Promega, Mannheim verwendet. Dieser laut Herstellerangaben aus murinem Hybridom-Aszites gewonnene IgG-Antikörper (Subklasse IgG_{2a}(k)) erkennt β -Galaktosidase aus *E. coli*. Um die Bindung des ersten Antikörpers an die auf die Nitrozellulosemembran geblottete β -Galaktosidase zu gewährleisten, wurde die Membran für einen Zeitraum von 2 h in dem in PBS mit 5 % Frischmilch (1,5 % Fett) 1 : 5000 verdünnten Antikörper bei Raumtemperatur geschwenkt.

Als zweiter Antikörper wurde ein mit dem Enzym Merrettich-Peroxidase kovalent verbundener, gegen murine Immunglobuline der Klasse G gerichteter Antikörper verwendet (*goat-anti-mouse IgG*, Dianova, Hamburg). Überschüssiger erster Antikörper wurde von der Nitrozellulosemembran durch Waschen mit PBS entfernt. Zur Bindung des zweiten Antikörpers an den an β -Galaktosidase gebundenen ersten Antikörper wurde die Nitrozellulosemembran für einen Zeitraum von 1 h in dem in PBS mit 5 % Frischmilch (1,5 % Fett) 1 : 2000 verdünnten Antikörper bei Raumtemperatur geschwenkt.

2.2.10.6 Detektion der Proteine durch Chemoluminiszenz

Die an die Nitrozellulosemembran gebundenen Antikörper konnten mit Hilfe des ECL-Kits der Firma Amersham, Freiburg sichtbar gemacht werden. Vorher musste die Nitrozellulosemembran jeweils für 10 min in den Waschlösungen TBS-N (0,1 % Nonidet-P-40 (Merck Darmstadt) in 1 \times TBS), TBS-T (0,1 % Tween 20 (Merck Darmstadt) in 1 \times TBS), TBS-T mit 0,5 % Triton (Sigma, Deisenhofen) und abschließend noch einmal in TBS-T geschwenkt werden. Dies gewährleistete die Entfernung des überschüssigen, nicht gebundenen zweiten Antikörpers. Für die Detektion der auf der Membran gebundenen Proteine katalysiert das an den zweiten Antikörper kovalent gebundene Enzym Merrettich-Peroxidase die Oxidation von Luminol (ECL-Kit). Hierdurch kommt es zur Emission von Licht der Wellenlänge 428 nm. Mittels Röntgenfilm (Biomax ML, Kodak, Rochester, USA) kann dieses Signal nachgewiesen werden.

Stocklösung 10 \times TBS

0,5 M	Tris/HCl pH 7,5
2 M	NaCl
in H ₂ O	

2.2.10.7 Entfernung gebundener Antikörper von der Nitrozellulosemembran

Um eine Nitrozellulosemembran nach der Prozedur des Western Blottings von den gebundenen Antikörpern zu befreien, wurde der Western Blot Recycling Kit der Firma Chemicon, Hofheim verwendet. Nach Entfernen der gebundenen Antikörper konnte die Analyse mit anderen Antikörpern wiederholt werden.

2.2.11 Enzymhistochemischer Nachweis von β -Galaktosidase am geklärten murinen Gehirn

2.2.11.1 X-Gal-Färbung von murinen Geweben

Um die injizierten neuralen Stammzellen anhand ihres histochemischen Markers, dem *lacZ*-Gen aus *E. coli*, im murinen Gehirn auffinden zu können, wurden sie mit Hilfe des Substrates X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid, 50 mg/ml in Dimethylformamid) der Firma Promega, Madison, USA angefärbt. Durch die β -Galaktosidase wird das Substrat X-Gal hydrolytisch gespalten. Die freiwerdenden Indoxyl-Reste werden unter Verbrauch von Sauerstoff zu einem unlöslichen blauen Farbstoff oxidiert. Dieser Farbstoff färbt die mit dem *lacZ*-Gen ausgestatteten neuralen Zellen an. Vor der Färbung wurden die Gehirne nach ihrer Entnahme aus der Maus fixiert. Hierzu wurden sie mindestens 12 h in PBS mit 2 % Paraformaldehyd (Sigma, Deisenhofen) und 0,2 % Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt) inkubiert. Nach vollständiger Entfernung des Fixativs durch Waschen mit PBS mit 0,1 % Tween 20 (Merck, Darmstadt) wurden die fixierten Gehirne in die X-Gal-Färbelösung überführt. Nach mindestens 24 h Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde mit der Herstellung von "Whole Mounts" begonnen. Wenn die Klärung der Gewebe nicht direkt anschließend durchgeführt wurde, wurden die Gehirne in der X-Gal-Färbelösung bei 4 °C aufbewahrt.

X-Gal-Mixer

20 mM K-Ferrozyanid

20 mM K-Ferrizyanid

2 mM $MgCl_2$

in PBS

Zur Herstellung der X-Gal-Färbelösung wurde das Substrat X-Gal (50 mg/ml in Dimethylformamid) im Verhältnis 1 : 50 zum X-Gal-Mixer zugegeben.

2.2.11.2 Klärung von murinen Geweben

Um überschüssige Färbelösung zu entfernen, wurden die Gehirne mit PBS gewaschen. Es folgte die Dehydrierung der Gewebe in einer aufsteigenden Methanolreihe von 30 %, 50 %, 80 % (je 1 h) und 100 % (2h) Methanol. Zur Klärung wurden die Gehirne in Benzylalkohol mit Benzylbenzoat (BABB, Benzylalkohol : Benzylbenzoat = 1 : 2, Sigma, Deisenhofen)

inkubiert. Nach 1,5 h waren die äußeren Gewebereiche klar. Um ein Eintrüben des Gewebes zu verhindern, wurde es im BABB aufbewahrt bis die photographische Dokumentation erfolgt war. Für eine nachfolgende Einbettung in Gefriermedium oder Paraffin wurden die geklärten Gewebe in einer absteigenden Methanolreihe wieder gewässert.

2.3 Tierexperimentelle Untersuchungen

2.3.1 Mäuse

Folgende Mausstämme wurden für die Injektionsversuche und als Kontrollen verwendet:

Stamm	Eigenschaften	Verwendungszweck
CD-1		Rezipienten von C17.2 NS Zellen; unbehandelt als negative Kontrollen
tg3-NMRI		unbehandelt als negative Kontrollen
Rosa26	transgen für <i>lacZ</i>	unbehandelt als positive Kontrollen

Die Versuchstiere stammten aus der GSF-Versuchstierhaltung. Die Haltung der Tiere erfolgte zu je 3-5 Mäusen in Makrolon-Käfigen Typ 2 in vollklimatisierten Stallräumen, die mit konstantem Tag-Nacht-Rhythmus beleuchtet wurden. Trinkwasser und Futter (Altromin GmbH, Lage) standen den Mäusen jederzeit unbegrenzt zur Verfügung. Die Genehmigung der Tierexperimente erfolgte durch die Regierung von Oberbayern (211-2531-56/96).

2.3.2 Transplantation neuraler Stammzellen durch intravenöse Injektion

Die Verteilung intravenös injizierter NS Zellen im Organismus wurde an Mäusen verschiedenen Geschlechts und Alters untersucht. Über eine laterale Schwanzvene wurden Suspensionen aus 1×10^6 bis 1×10^7 NS Zellen in 100 bis 200 μ l PBS appliziert. Zur intravenösen Injektion wurden subkonfluent gewachsene Kulturen neuraler Stammzellen verwendet, die in PBS vereinzelt und gewaschen worden waren. Die Injektion der

Zellsuspensionen erfolgte mit einer 1 ml Einmalspritze der Firma Braun, Melsungen mit einer 26 G \times 1/2, 0,45 \times 12 mm Kanüle (Braun, Melsungen). 29 Versuchstiere wurden ohne Anästhesie i.v. injiziert. Die Tiere wurden zur Injektion in einer Kriechröhre fixiert. Zur Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für das intravenös verabreichte Inoculum inhalierten 67 Mäuse unmittelbar vor der Injektion Diethyläther (Hoechst, Frankfurt am Main). Hierzu wurde die Maus in einen Ätherbehälter mit dem Luft/Anästhetikum-Gemisch gesetzt. Eine genaue Dosierung des Anästhetikums war nicht möglich. Bei Eintritt der Bewusstlosigkeit wurde das Tier zur intravenösen Injektion aus dem Behälter genommen.

2.3.3 Sektion von Mäusen

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Verabreichung des Inoculums wurden die Rezipienten durch CO₂-Begasung getötet. Bei der Sektion wurde aus der *Aorta abdominalis* mit 1,4 ml Gerinnungsröhrchen (Coagulation 9 NC/1,4 ml Monovette, Sarstedt, Nümbrecht) mit 26 G \times 1/2, 0,45 \times 12 mm Kanüle (Braun, Melsungen) bis zu 1 ml Blut gewonnen. Des Weiteren wurden Lungen, Milz, Gehirn und *Femora* entnommen. Bis zur Isolation von DNA aus den entnommenen Organen wurden diese bei -20 °C aufbewahrt. Für die Herstellung von Gewebeproben für Western Blot Analysen wurden die entsprechenden Gehirne in Gefriermedium (Reichert-Jung, Wiesloch) eingebettet und bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C asserviert. Die für die Klärung mit Hilfe von Benzylalkohol und Benzylbenzoat vorgesehenen Gehirne wurden sofort nach der Entnahme in 2 % Paraformaldehyd (Sigma, Deisenhofen), 0,2 % Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt) in PBS bei 4 °C fixiert. Die Knochenmarkentnahme aus den *Femora* erfolgte sofort nach der Autopsie.

Weiterverarbeitung muriner Gewebe

Gewebe	Weiterverarbeitung
Gehirn	DNA-Isolation für PCR
	Gefrierschnitte für WB
	X-Gal-Färbung und Klärung
Lungen	DNA-Isolation für PCR
Milz	DNA-Isolation für PCR
Blut	DNA-Isolation für PCR
<i>Femora</i>	Knochenmarkentnahme für Kultur

2.4 Statistische Auswertungen

Bei der Untersuchung verschiedener Gruppen von Versuchstieren wurden die Ergebnisse in sogenannten χ^2 -Vierfeldertafeln dargestellt.

	Ergebnis x	Komplementärereignis y
Stichprobe A	a	b
Stichprobe B	c	d

Die eine Gruppe von Versuchstieren zeichnete sich durch ein Merkmal A, die andere durch ein Merkmal B aus, oder eine Gruppe von Versuchstieren wurde der Behandlung A, die andere der Behandlung B unterzogen. Das Ergebnis war entweder der Nachweis von transplantierten NS Zellen (x) oder das Fehlen transplantierte Zellen (y).

In der χ^2 -Vierfeldertafel wurde die Signifikanz von Unterschieden ermittelt. Hierzu wurde ein zweiseitiger P-Wert errechnet. Wie allgemein üblich wurde für $p < 0,05$ ein signifikanter Unterschied zwischen den Stichproben A und B angenommen. Zeitliche Trends wurden mit Hilfe der logistischen Regression ermittelt.

Bei der statistischen Auswertung der Transwell-Kultur wurde der bedingte Test zum Vergleich zweier Poisson-Verteilungen durchgeführt. Die Ergebnisse des Versuchs lagen als Summen von durch die Poren der Membran gewanderten Zellzahlen vor. Die auf der Unterseite der Membran A gezählten Zellen waren unter anderen Bedingungen gewachsen als die auf der Unterseite der Membran B gezählten Zellen. Durch Ermittlung eines zweiseitigen P-Werts wurde geprüft, ob zwischen den auf der Unterseite der einzelnen Membranen gezählten Zellzahlen ein signifikanter Unterschied bestand oder nicht.

Alle statistischen Rechnungen wurden mit dem Programm SAS 6.12 (SAS Institute Inc. SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition. Cary, NC, USA: SAS Institute INC., 1990) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit einer Transplantation von C17.2 NS Zellen in das Gehirn von Mäusen durch i.v. Injektion untersucht. Mittels X-Gal-Färbung, PCR Amplifikation und Western Blot Analysen sollte der Nachweis der in das Gehirn eingewanderten Zellen erfolgen. Hierbei sollte auch die regionale Verteilung der i.v. injizierten NS Zellen im Gehirn berücksichtigt werden. Die Absiedelung der injizierten NS Zellen in den Organen des Organismus und ihr Verweilen im Blut sollte mit Hilfe der PCR analysiert werden. Die Relevanz von chemotaktischen Reizen für die Migration von NS Zellen sollte *in vitro* untersucht werden. Abschließend sollte versucht werden, die Transplantationseffizienz für das Gehirn durch Modulation der Permeabilität der BBB mit einer Ätherinhalationsnarkose zu steigern.

3.1 Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im X-Gal gefärbten und geklärten Gehirn

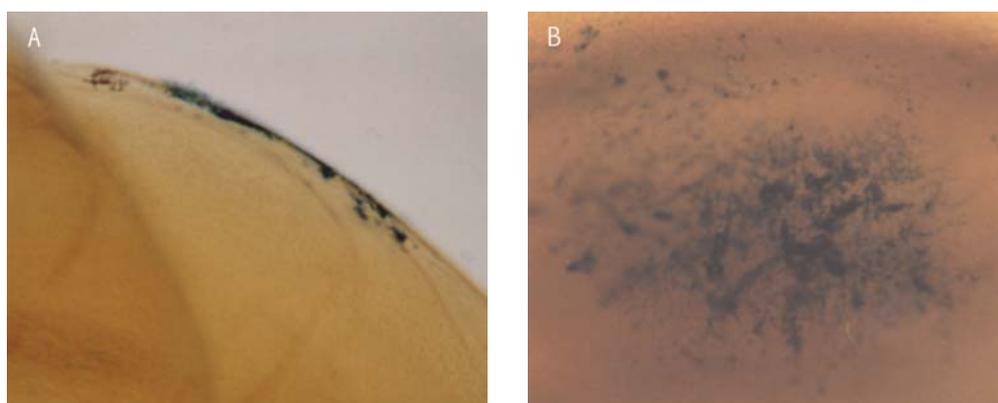
Die Versuchsmäuse waren zum Zeitpunkt der Injektion zwischen 3 und 5 Wochen alt. Sie erhielten über eine laterale Schwanzvene je 10^6 C17.2 NS Zellen in einer Suspension von 100 μ l PBS. Danach wurde das Gehirn auf das Vorhandensein der injizierten Zellen untersucht. Zunächst wurde die Anwesenheit von NS Zellen am X-Gal gefärbten und transparent gemachten murinen Gehirn nachgewiesen. Zur lichtmikroskopischen Darstellung der i.v. injizierten NS Zellen wurden die Gehirne von 23 Rezipienten „geklärt“ und C17.2 NS Zellen durch X-Gal-Färbung nachgewiesen (siehe Abb. 1).

Die Gehirne wurden auf das Vorhandensein von i.v. injizierten C17.2 NS Zellen jeweils 14 (5/6, 83 %), 19 (6/6, 100 %), 32 (2/6, 33 %) und 38 (5/5, 100 %) Tage nach der Injektion untersucht. In 18 der 23 geklärten Gehirne (78 %) wurden Areale mit X-Gal gefärbten Zellen gefunden.

Als Kontrollen wurden X-Gal “Whole Mounts“ von Gehirnen unbehandelter Rosa26 Mäuse hergestellt. Mäuse vom Stamm Rosa26 sind transgen für *lacZ*. Durch X-Gal-Färbung und Klärung konnte in den Gehirnen unbehandelter Rosa26 Mäuse eine generalisierte *lacZ*-

Expression sichtbar gemacht werden. Als Kontrolle für den Nachweis von C17.2 Zellen im X-Gal "Whole Mount" wurden Gehirne unbehandelter tg3-NMRI Mäuse verwendet. In diesen wurden nach der Entnahme an zwei verschiedenen Stellen je $1,4 \times 10^4$ C17.2 NS Zellen (7×10^5 Zellen/ml PBS) deponiert. Durch X-Gal-Färbung und Klärung gelang der Nachweis der nach der Dissektion deponierten C17.2 Zellen. Zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurden gleichzeitig Gehirne unbehandelter CD-1 Mäuse gefärbt und geklärt. In diesen konnten nach X-Gal-Färbung und Klärung keine Zellen mit blauem Präzipitat entdeckt werden. Abbildung 1 zeigt den Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im X-Gal gefärbten und transparent gemachten murinen Gehirn. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Abbildung 1: Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im X-Gal "Whole Mount" des ZNS



Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im X-Gal "Whole Mount" des murinen Gehirns. A: Seitensicht Großhirnrinde. B: Aufsicht Großhirnrinde.

Tabelle 1. Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im murinen Gehirn

Tage nach Inj.	X-Gal-positive Gehirne
14	5/6 (83 %)
19	6/6 (100 %)
32	2/6 (33 %)
38	5/5 (100 %)
14 - 38	gesamt 18/23 (78 %)

Zur Klärung der Frage, ob der Nachweis i.v. injizierter C17.2 NS Zellen im Gehirn von Rezipienten in Abhängigkeit vom Zeitintervall zwischen Injektion der Zellen und Dissektion des Gehirns variierte, wurde der Test auf zeitlichen Trend mit Hilfe der logistischen Regression durchgeführt. Dieser ergab keine signifikante Varianz beim Nachweis der i.v. injizierten Zellen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Injektion ($p = 0,7139$). Die Wiederfindungsrate der i.v. injizierten C17.2 NS Zellen im Gehirn von Rezipienten-Mäusen nahm mit dieser Methode über den gesamten Untersuchungszeitraum pro Tag um 4 % ab.

3.2 Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im Gehirn durch PCR Amplifikation

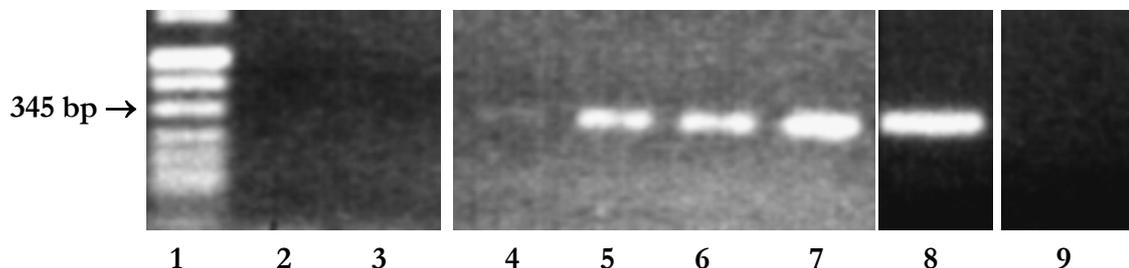
Zur Bestätigung der durch Klärung X-Gal gefärbter Gehirne erhaltenen Daten wurden PCR Analysen durchgeführt. Hierzu wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach i.v. Injektion von C17.2 NS Zellen DNA aus Hirngewebe isoliert, und durch PCR ein 345-bp Fragment des *lacZ*-Reportergens amplifiziert (siehe Abb. 2).

Mit Hilfe der PCR wurde in 39 von 73 untersuchten Gehirnen injizierter Mäuse (53 %) die *lacZ*-spezifische Sequenz detektiert. Die Rezipienten wurden in einem Zeitraum von 2 bis 28 Tagen nach der i.v. Injektion von NS Zellen untersucht. In der ersten Woche nach i.v. Injektion (Tag 2 bis Tag 7) wurden transplantierte NS Zellen in 27 von 30 analysierten Gehirnen (90 %) nachgewiesen, am Tag 14 in 4 von 34 untersuchten Gehirnen (12 %), am Tag 21 in 5 von 5 untersuchten Gehirnen (100 %) und am Tag 28 in 3 von 4 untersuchten Gehirnen (75 %).

Zur Kontrolle wurde DNA aus C17.2 NS Zellen und aus dem ZNS von Rosa26 Mäusen für die PCR Analyse isoliert. In beiden PCR-Reaktionsansätzen gelang die Amplifikation der 345-bp großen Sequenz des *lacZ*-Gens. Um falsch positive Ergebnisse durch die PCR auszuschließen, wurden die PCR Analysen der DNA aus Gehirnen i.v. injizierter Tiere gleichzeitig mit Kontrollen, die keine *lacZ*-spezifischen Gen-Sequenzen enthielten, durchgeführt. Als Kontrollen ohne *lacZ*-Gen dienten PCR-Reaktionsansätze ohne DNA, mit DNA aus dem ZNS unbehandelter CD-1 Mäuse und mit DNA aus dem Schwanzgewebe unbehandelter tg3-NMRI Mäuse. In diesen PCR-Reaktionsansätzen wurde keine *lacZ*-spezifische Sequenz amplifiziert. Abbildung 2 zeigt den Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in der PCR Analyse. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse der durchgeführten PCR Analysen

zusammen.

Abbildung 2: PCR-Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in murinen Gehirnen



DNA wurde aus der jeweils rechten Hemisphäre des Gehirns isoliert. Zur Amplifikation eines 345-bp Fragments des lacZ-Gens wurde 1 μ g der isolierten DNA zu einem PCR Reaktionsansatz gegeben. In 53 % (39/73) der nach i.v. Injektion von NS Zellen untersuchten Gehirne konnte eine 345 bp lange Sequenz detektiert werden. Position 1: DNA-Längenstandard (Boehringer, Mannheim). Position 2-3: Proben ohne DNA (negative Kontrollen). Position 4-6: DNA isoliert aus murinen Gehirnen eine Woche nach i.v. Injektion von NS Zellen (Tag 4 bis Tag 7). Position 7: DNA isoliert aus einem murinen Gehirn am Tag 14 nach i.v. Injektion von NS Zellen. Position 8: DNA isoliert aus dem Gehirn einer ROSA26 Maus (positive Kontrolle). Position 9: DNA isoliert aus dem Gehirn einer unbehandelten CD-1 Maus (negative Kontrolle).

Tabelle 2. Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im murinen Gehirn

Tage nach Inj.	Implantat positiv
2	2/2 (100 %)
3	12/13 (92 %)
4	3/4 (75 %)
6	4/4 (100 %)
7	6/7 (86 %)
14	4/34 (12 %)
21	5/5 (100 %)
28	3/4 (75 %)
2 - 28	gesamt 39/73 (53 %)

Zur Klärung der Frage, ob in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt nach i.v. Injektion

Unterschiede beim PCR-Nachweis der injizierten C17.2 Zellen im Gehirn auftraten, wurden die Daten hinsichtlich eines zeitlichen Trends überprüft. Hierbei konnte kein signifikanter zeitlicher Trend für die Implantation i.v. injizierter C17.2 Zellen in das murine Gehirn festgestellt werden ($p = 0,6673$). Bei diesem Test nahm die Nachweishäufigkeit i.v. injizierter C17.2 Zellen im Gehirn von Rezipienten-Mäusen pro Tag nach i.v. Injektion um 2 % ab. Beim Vergleich der Implantationsrate von i.v. injizierten C17.2 NS Zellen in das Gehirn in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt nach i.v. Injektion fiel die erniedrigte Nachweisrate der i.v. injizierten Zellen am Tag 14 nach i.v. Injektion auf. Dieser Effekt wurde im logistischen Regressionsmodell berücksichtigt und erwies sich im Vergleich zu den übrigen Daten als hochsignifikant ($p < 0,0001$).

3.2.1 Einfluss der Zahl injizierter Zellen auf die Implantation in das Gehirn

Die mittels PCR Amplifikation untersuchten Gehirne stammten von Mäusen, denen zwischen 10^6 und 10^7 C17.2 NS Zellen in einem Volumen von 100 bis 200 μl PBS i.v. verabreicht wurden. Die Implantation in das Gehirn wurde in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl verglichen. Bei 30 der 59 Versuchstiere (51 %), die mit 10^6 C17.2 NS Zellen in 100 μl PBS injiziert wurden, konnten mit der PCR Methode *lacZ*-spezifische Sequenzen im ZNS nachgewiesen werden. Die PCR Analyse dieser Gruppe von Versuchstieren erfolgte 2 (2/2), 3 (7/8), 4 (3/4), 7 (6/7), 14 (4/29), 21 (5/5) und 28 (3/4) Tage nach i.v. Injektion.

In 9 der 14 untersuchten Gehirne (64 %) von Tieren, denen 10^7 C17.2 NS Zellen in 200 μl PBS injiziert wurden, wurden *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert. Die Untersuchung der Gehirne erfolgte 3 (5/5), 6 (4/4) und 14 (0/5) Tage nach i.v. Injektion. Tabelle 3 gibt zusammenfassend den Transplantationserfolg in Abhängigkeit von der i.v. injizierten Zellzahl wieder.

Tabelle 3. Einfluss der i.v. injizierten Zellzahl auf die Implantation von NS Zellen ins Gehirn

Zellzahl	Implantat positiv
10 ⁶	30/59 (51 %)
10 ⁷	9/14 (64 %)
gesamt	39/73 (53 %)

Beim Vergleich der in Tabelle 3 dargestellten Daten in einer χ^2 -Vierfeldertafel wurde deutlich, dass durch eine Erhöhung der injizierten Zellzahl kein signifikant höherer Transplantationserfolg erreicht wurde ($p = 0,3682$).

3.2.2 Einfluss des Rezipientenalters auf die Implantation von NS Zellen in das Gehirn

Die Versuchstiere waren zum Zeitpunkt der Injektion von C17.2 NS Zellen zwischen 19 und 100 Tage alt. Um zu klären, ob eine erfolgreiche Transplantation von NS Zellen in das Gehirn durch i.v. Injektion vom Alter der Rezipienten abhängt, wurden die Versuchstiere in einzelne Altersgruppen unterteilt. Hierbei wurden Gruppen von 19 Tage alten, 26 bis 28 Tage alten, 40 Tage alten, 54 bis 56 Tage alten und 92 bis 100 Tage alten Mäusen unterschieden.

Bei jeder der untersuchten Altersgruppen (19 Tage, 26-28 Tage, 40 Tage, 54-56 Tage und 92-100 Tage) wurden mit Hilfe der PCR i.v. injizierte C17.2 NS Zellen im ZNS nachgewiesen. Bei den zum Zeitpunkt der Injektion 19 Tage alten Tieren wurden in allen 9 untersuchten Gehirnen (100 %) transplantierte NS Zellen detektiert. Die Untersuchung dieser Altersgruppe erfolgte 3 (n=5) und 6 (n=4) Tage nach i.v. Injektion von NS Zellen.

Bei den 26 bis 28 Tage alten Rezipienten wurden in 14 von 44 untersuchten Gehirnen (32 %) *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert. Der Nachweis erfolgte 3 (3/3), 4 (2/2), 14 (4/33), 21 (3/3) und 28 (2/3) Tage nach i.v. Injektion von NS Zellen.

Bei der Gruppe, die im Alter von 40 Tagen mit C17.2 NS Zellen transplantiert wurde,

wurden in 3 von 4 Gehirnen (75 %) *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert. Die Untersuchung der Gehirne erfolgte 14 (0/1), 21 (2/2) und 28 (1/1) Tage nach i.v. Injektion.

Bei den 54 bis 56 Tage alten Mäusen wurden bei 5 von 6 untersuchten Tieren (83 %) NS Zellen im ZNS nachgewiesen. Die PCR Analyse dieser Altersgruppe erfolgte 2 (2/2), 4 (1/2) und 7 (2/2) Tage nach i.v. Injektion.

Bei den im Alter zwischen 92 und 100 Tagen transplantierten Mäusen wiesen 8 von 10 untersuchten Tieren (80 %) in ihren Gehirnen *lacZ*-spezifische Sequenzen auf. Die Untersuchung erfolgte 3 (4/5) und 7 (4/5) Tage nach der i.v. Injektion von NS Zellen. Den Einfluss des Alters der mit C17.2 NS Zellen i.v. injizierten Mäuse auf den Nachweis der Zellen im ZNS gibt Tabelle 4 wieder.

Tabelle 4. Einfluss des Rezipientenalters auf die Implantation i.v. injizierter NS Zellen ins Gehirn

Alter in Tagen	Implantat positiv
19	9/9 (100 %)
26-28	14/44 (32 %)
40	3/4 (75 %)
54-56	5/6 (83 %)
92-100	8/10 (80 %)
19 - 100	gesamt 39/73 (53 %)

Um zu klären, ob eine erfolgreiche Transplantation von C17.2 NS Zellen in das ZNS durch i.v. Injektion vom Alter der Rezipienten abhing, wurden die in Tabelle 4 ermittelten Daten hinsichtlich eines Trends bezüglich des Alters der Versuchstiere untersucht. Es konnte kein signifikanter Trend der positiven Implantation i.v. injizierter Zellen im ZNS in Abhängigkeit vom Rezipientenalter festgestellt werden ($p = 0,3219$). Es ergab sich eine Abnahme der Implantation i.v. injizierter C17.2 NS Zellen in das murine Gehirn um 2 % pro Tag zunehmenden Versuchstieralters. Beim Vergleich der Implantationsrate von i.v. injizierten C17.2 NS Zellen in das Gehirn in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere fiel die erniedrigte Nachweisrate der i.v. injizierten Zellen im Gehirn bei der Gruppe der 26 bis 28

Tage alten Versuchstiere auf. Dieser Effekt wurde im logistischen Regressionsmodell berücksichtigt und erwies sich im Vergleich zu den übrigen Daten als signifikant ($p = 0,0017$).

3.2.3 Einfluss des Geschlechts der Rezipienten auf die Implantation von NS Zellen in das Gehirn

Die Versuchstiere, denen C17.2 NS Zellen i.v. verabreicht wurden, waren weiblichen und männlichen Geschlechts. Um den Einfluss des Geschlechts der Rezipienten auf die Transplantation von C17.2 NS Zellen in das ZNS durch i.v. Injektion beurteilen zu können, wurden weibliche und männliche Versuchstiere mit der PCR Methode gesondert untersucht. Insgesamt stammten 31 der mit Hilfe der PCR untersuchten Gehirne von weiblichen, 33 von männlichen CD-1 Mäusen. 14 der 31 untersuchten weiblichen Gehirne (45 %) enthielten *lacZ*-spezifische Sequenzen nach der i.v. Injektion von C17.2 NS Zellen. In 16 der 33 männlichen Gehirne (48 %) wurden nach i.v. Injektion von C17.2 NS Zellen *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert. Zusammengefasst ergaben sich beim Vergleich der durch i.v. Injektion transplantierten murinen Gehirne hinsichtlich des Nachweises von transplantierten C17.2 NS Zellen in Abhängigkeit vom Geschlecht der Rezipienten keine signifikanten Unterschiede. Beim technischen Vergleich der in Tabelle 5 dargestellten Daten in einer χ^2 -Vierfeldertafel ergab sich ein Wert von $p = 0,7901$.

Tabelle 5. Einfluss des Geschlechts der Rezipienten auf die Implantation i.v. injizierter NS Zellen ins Gehirn

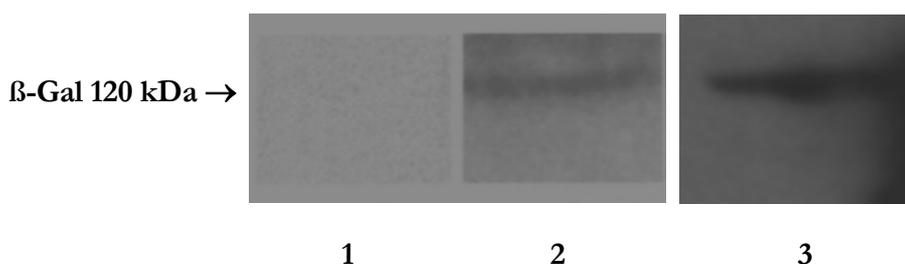
Geschlecht	Implantat positiv
weiblich	14/31 (45 %)
männlich	16/33 (48 %)
gesamt	30/64 (47 %)

3.3 Genexpression i.v. injizierter NS Zellen im Gehirn

Die Frage, ob nach i.v. Injektion NS Zellen im murinen ZNS zur Genexpression in der Lage sind, wurde durch die Western Blot Analyse geklärt. Das *lacZ*-Gen der C17.2 NS Zellen kodiert für das Enzym β -Galaktosidase. Dessen Expression kann im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen das Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 3).

Bei 4 Mäusen, bei denen jeweils in der rechten Hemisphäre des Gehirns mit Hilfe der PCR i.v. injizierte NS Zellen nachgewiesen wurden, wurde die linke Hemisphäre mit der Technik des Western Blottings analysiert. Auf diese Weise konnte in 3 der 4 untersuchten Gehirne (75 %), in denen mit der PCR Methode *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert wurden, eine durch die injizierten NS Zellen verursachte β -Galaktosidase Expression nachgewiesen werden. Diese Daten stammen von murinen Gehirnen, die innerhalb der ersten Woche nach i.v. Injektion neuraler Stammzellen untersucht wurden. Als negative Kontrolle wurde das Gehirn einer unbehandelten CD-1 Maus verwendet. Als positive Kontrolle diente das Gehirn einer Rosa26 Maus. Abbildung 3 zeigt den Nachweis von β -Galaktosidase im ZNS i.v. injizierter Mäuse.

Abbildung 3: Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im Western Blot



Western Blot Analyse muriner Gehirne. Für die Western Blot Analyse wurden jeweils die linken Hemisphären der Gehirne in Gefriermedium (Reichert-Jung, Wiesloch) eingebettet, in deren rechter Hemisphäre mit Hilfe der PCR Analyse i.v. injizierte NS Zellen nachgewiesen worden waren. Position 1: Lysat aus dem Gehirn einer unbehandelten CD-1 Maus (negative Kontrolle). Position 2: Lysat aus murinem Gehirn drei Tage nach Injektion von NS Zellen. Position 3: Lysat aus dem Gehirn einer Rosa26 Maus (positive Kontrolle).

3.4 Enzymhistochemischer Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm

Um die Verteilung der nach i.v. Injektion ins ZNS eingewanderten NS Zellen zu untersuchen, wurden Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm am X-Gal gefärbten und geklärten Gewebe gesondert betrachtet. Die Untersuchung der Gehirne erfolgte jeweils 19, 32 und 38 Tage nach i.v. Injektion der C17.2 NS Zellen. Durch X-Gal Färbung und nachfolgende Klärung konnten lichtmikroskopisch in 18 der 23 untersuchten murinen Gehirne (78 %) blau gefärbte Zellen gefunden werden (siehe Tabelle 1). Die i.v. injizierten NS Zellen waren auf Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm der rechten und linken Hemisphäre verteilt.

In der rechten Großhirnhemisphäre wurden die injizierten Zellen in 10 der 17 untersuchten Gehirne (59 %) nachgewiesen. Davon waren 19 Tage nach Injektion 5 von 6 "Whole Mounts" (83 %) im Bereich der rechten Großhirnhemisphäre positiv, 32 Tage nach Injektion keiner von 6 "Whole Mounts" (0 %) und 38 Tage nach Injektion alle 5 untersuchten "Whole Mounts" (100 %).

In der linken Großhirnhemisphäre waren transplantierte NS Zellen in 7 von 17 Gehirnen (41 %) vorhanden. Im einzelnen konnten die Zellen 19 Tage nach Injektion in 5 der 6 untersuchten linken Großhirnhemisphären (83 %) nachgewiesen werden; 32 Tage nach Injektion in 0 der 6 (0 %) und 38 Tage nach Injektion in 2 der 5 untersuchten linken Hemisphären (40 %).

In der rechten Hälfte des Kleinhirns wurden die injizierten Zellen in 2 der 17 untersuchten Gehirne (12 %) nachgewiesen. 19 Tage nach Injektion waren transplantierte Zellen in 2 von 6 untersuchten Kleinhirnen (33 %), an den Tagen 32 (n=6) und 38 (n=5) nach Injektion in keinem der untersuchten Kleinhirne nachweisbar.

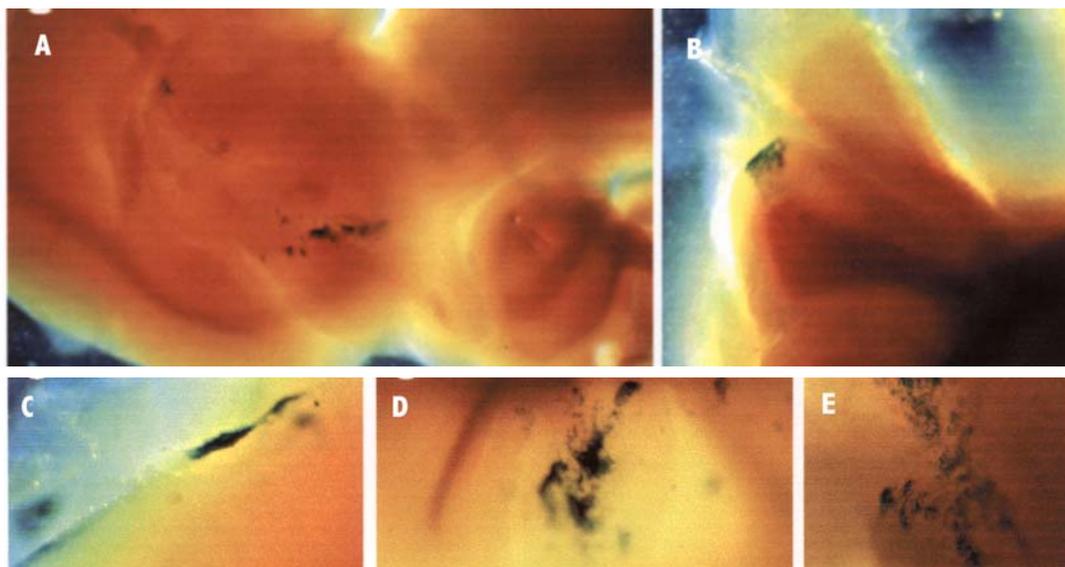
Die linke Hälfte des Zerebellums wies in 5 von 17 untersuchten Gehirnen (29 %) C17.2 NS Zellen auf. 19 Tage nach Injektion wurden transplantierte Zellen in 3 von 6 untersuchten Kleinhirnen (50 %), 32 Tage nach Injektion in 1 von 6 (17 %) und 38 Tage nach Injektion in 1 von 5 untersuchten linken Kleinhirnhemisphären (20 %) detektiert.

In der rechten Hälfte des Hirnstammes konnten in 1 von 17 untersuchten Gehirnen (6 %)

C17.2 NS Zellen 32 Tage nach i.v. Injektion enzymhistochemisch nachgewiesen werden. Am 19. und am 38. Tag nach Injektion zeigte keiner der 6 bzw. der 5 untersuchten "Whole Mounts" (0 %) NS Zellen.

Das linke Stammhirn war in 3 von 17 Gehirnen (18 %) positiv. 19 Tage nach i.v. Injektion waren 2 von 6 (33 %), 32 Tage nach i.v. Injektion 0 von 6 (0 %) und 38 Tage nach Injektion 1 von 5 (20 %) positiv. Abbildung 4 zeigt am X-Gal "Whole Mount" NS Zellen in den einzelnen Hirnabschnitten (Großhirn, Kleinhirn, Hirnstamm) nach i.v. Injektion. Die Tabellen 6a und 6b fassen die beschriebenen Ergebnisse zusammen.

Abbildung 4: NS Zellen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm am X-Gal "Whole Mount" nach i.v. Injektion



Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im X-Gal "Whole Mount" muriner Gehirne. A: Übersicht. B: Kleinhirn. C: Großhirnrinde. D: Großhirn. E: Hirnstamm.

Tabelle 6. Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm**6a.** Rechte Hemisphäre

Tage nach Inj.	X-Gal-positive Hirnabschnitte		
	Großhirn	Kleinhirn	Hirnstamm
19	5/6 (83 %)	2/6 (33 %)	0/6 (0 %)
32	0/6 (0 %)	0/6 (0%)	1/6 (17 %)
38	5/5 (100 %)	0/5 (0 %)	0/5 (0%)
19 - 38	gesamt 10/17 (59 %)	2/17 (12 %)	1/17 (6 %)

6b. Linke Hemisphäre

Tage nach Inj.	X-Gal-positive Hirnabschnitte		
	Großhirn	Kleinhirn	Hirnstamm
19	5/6 (83 %)	3/6 (50 %)	2/6 (33 %)
32	0/6 (0 %)	1/6 (17 %)	0/6 (0 %)
38	2/5 (40 %)	1/5 (20 %)	1/5 (20 %)
	gesamt 7/17 (41 %)	5/17 (29 %)	3/17 (18 %)

Auf eine statistische Überprüfung der Ergebnisse hinsichtlich signifikanter Unterschiede bei der Häufigkeit der Implantation i.v. injizierter C17.2 NS Zellen in den verschiedenen Hirnregionen und hinsichtlich zeitlicher Trends beim Nachweis der i.v. injizierten Zellen in den einzelnen Hirnregionen wurde verzichtet. Die Aussagekraft statistischer Untersuchungen wird durch die Abhängigkeit der untersuchten Parameter und die kleinen Fallzahlen limitiert.

3.5 PCR-Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm

Zur Evaluierung der regionalen Verteilung i.v. injizierter NS Zellen in den Gehirnen injizierter Mäuse wurde DNA für die PCR Analyse getrennt aus Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm isoliert. Die PCR Analyse wurde für jeden einzelnen dieser Hirnabschnitte gesondert durchgeführt. Die Untersuchung der Gehirne erfolgte innerhalb der ersten Woche nach i.v. Injektion der C17.2 NS Zellen. Es wurde jeweils die rechte Hemisphäre analysiert. Mit dieser Methode wurden in 9 von 14 untersuchten Großhirnen (64 %), in 1 von 14 untersuchten Kleinhirnen (7 %) und in 9 von 14 untersuchten Stammhirnen (64 %) *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert. Die Ergebnisse der PCR Analysen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7. Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm

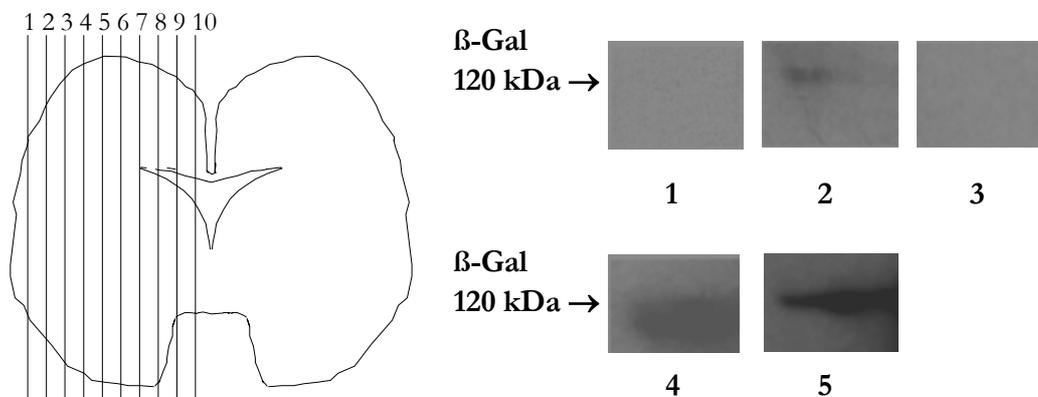
Hirnregion	Implantat positiv
Großhirn	9/14 (64 %)
Kleinhirn	1/14 (7 %)
Hirnstamm	9/14 (64 %)

3.6 Lokalisation i.v. injizierter NS Zellen innerhalb der Großhirnhemisphäre

Um die regionale Verteilung der i.v. injizierten NS Zellen innerhalb der Hemisphäre des Großhirns zu bestimmen, wurden koronare und sagittale Kryostatschnitte der Gehirne angefertigt (siehe Abb. 5). Jeweils 400 µm dicke koronare oder sagittale Hirnschnitte wurden im Western Blot separat auf die Expression von β-Galaktosidase untersucht. Hierfür wurde jeweils die linke Hemisphäre von Gehirnen verwendet, bei denen in der rechten Hemisphäre durch die PCR *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert worden waren. In 3 von 4 auf diese Weise untersuchten Gehirnen (75 %) konnte β-Galaktosidase Expression festgestellt werden. Diese fand sich in den kortikalen, oberflächlichen Schnitten der analysierten Gehirne. Diese Daten stammen von Gehirnen innerhalb einer Woche nach der Transplantation von NS Zellen. Abbildung 5 zeigt die Western Blot Analyse eines murinen Gehirns am Beispiel sagittaler Hirnschnitte.

Abbildung 5: Nachweis i.v. injizierter NS Zellen durch Western Blot sagittaler Hirnschnitte

A) Schnittbereiche 1-10 (schematisch) **B)** Western Blot Analyse sagittaler Hirnschnitte



Western Blot Analyse muriner Gehirne. Für die Western Blot Analyse wurden jeweils die linken Hemisphären der Gehirne in Gefriermedium (Reichert-Jung, Wiesloch) eingebettet, in deren rechter Hemisphäre mit Hilfe der PCR Analyse i.v. injizierte NS Zellen nachgewiesen worden waren. A: Darstellung der sagittalen Hirnschnitte mit schematischer Einteilung der Schnittbereiche 1-10. B: Ergebnis der Western Blot Analyse eines sagittal geschnittenen murinen Gehirns 3 Tage nach i.v. Injektion von NS Zellen. Position 1: Lysat aus dem Gehirn einer unbehandelten CD-1 Maus (negative Kontrolle). Position 2: Lysat aus sagittalem Hirnschnitt 10. Position 3: Lysat aus sagittalem Hirnschnitt 5. Position 4: Lysat aus sagittalem Hirnschnitt 3. Position 5: Lysat aus dem Gehirn einer Rosa26 Maus (positive Kontrolle).

3.7 Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in Blut, Lunge und Milz von Rezipienten durch PCR Amplifikation

Die über eine laterale Schwanzvene der Mäuse injizierten NS Zellen mussten zur Ansiedlung im Gehirn mit dem Blutstrom zum Herzen und von dort in den großen Kreislauf transportiert werden. Durch PCR Analysen von Blut, Lunge und Milz wurde exemplarisch die Verteilung von i.v. injizierten Zellen außerhalb des ZNS ermittelt. Hierbei wurden entsprechend dem Untersuchungszeitpunkt nach i.v. Injektion von C17.2 NS Zellen einzelne Gruppen von Versuchstieren gebildet. Unterschieden wurden Tiere, die an den Tagen 2-7, am Tag 14, am Tag 21 und am Tag 28 nach i.v. Injektion untersucht wurden.

Insgesamt konnten zirkulierende NS Zellen im Blut von 30 von 74 untersuchten Mäusen (41 %) nachgewiesen werden. 2 bis 7 Tage nach Injektion wurde bei 16 von 23 Mäusen

(70 %) in Blutproben eine *lacZ*-spezifische Sequenz amplifiziert; am Tag 14 bei 5 von 42 (12 %) und an den Tagen 21 und 28 bei allen 5 bzw. 4 untersuchten Mäusen (100 %).

Bei der DNA Analyse der Lunge wurden die i.v. injizierten NS Zellen insgesamt in 24 von 81 untersuchten Organen (30 %) nachgewiesen. 2 bis 7 Tage nach i.v. Injektion waren 5 von 30 Lungen (17 %) positiv, am Tag 14 nach Injektion 10 von 42 Lungen (24 %) und an den Tagen 21 und 28 alle 5 bzw. 4 untersuchten Lungen (100 %).

Bei der PCR Analyse von DNA aus der Milz konnte die 345-bp Region des *lacZ*-Reportergens in 7 von 33 untersuchten Milzen (21 %) amplifiziert werden; 2 bis 7 Tage nach der Injektion in 2 von 12 Milzen (17 %), am Tag 14 in 1 von 4 (25 %), am Tag 21 in allen 4 untersuchten Milzen (100 %) und am Tag 28 in 0 von 3 untersuchten Milzen (0%). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nach Untersuchungszeitpunkten getrennt in Tabelle 8 dargestellt. Zum Vergleich wurden zusätzlich die PCR-Daten für den Nachweis i.v. injizierter NS Zellen im Gehirn (siehe Tab. 2) eingefügt.

Tabelle 8. Verteilung i.v. injizierter NS Zellen im Organismus der Maus

Tage n. Inj.	PCR-Nachweis der <i>lacZ</i> -Sequenz			
	Gehirn	Blut	Lunge	Milz
2-7	27/30 (90 %)	16/23 (70 %)	5/30 (17 %)	2/12 (17 %)
14	4/34 (12 %)	5/42 (12 %)	10/42 (24 %)	1/4 (25 %)
21	5/5 (100 %)	5/5 (100 %)	5/5 (100 %)	4/4 (100 %)
28	3/4 (75 %)	4/4 (100 %)	4/4 (100 %)	0/3 (0 %)
gesamt	39/73 (53 %)	30/74 (41 %)	24/81 (30 %)	7/33 (21 %)

Die bezüglich der Verteilung i.v. injizierter C17.2 NS Zellen im Organismus der Maus ermittelten Daten wurden mit Hilfe der χ^2 -Vierfeldertafel untereinander verglichen. Hierbei ergab sich ein signifikant häufigerer Nachweis der i.v. injizierten C17.2 NS Zellen im Gehirn der Rezipienten als in ihrer Lunge ($p = 0,0030$) oder Milz ($p = 0,0029$). Die Daten für Blut und Milz befanden sich im Grenzbereich der Signifikanz ($p = 0,0565$) für einen höheren Nachweis der i.v. injizierten NS Zellen im Blut der Rezipienten im Vergleich zur Milz. Der Vergleich der übrigen Daten ergab keine signifikanten Unterschiede.

Auf die Ermittlung eines zeitlichen Trends beim Nachweis i.v. injizierter NS Zellen in den einzelnen Organen des murinen Organismus wurde wegen der kleinen Fallzahlen verzichtet.

3.8 Untersuchung des Migrationsverhaltens von NS Zellen auf chemotaktische Einflüsse

Die Klärung der Frage, ob unterschiedliche, gewebespezifische chemotaktische Reize für die Ansiedlung von transplantierten NS Zellen in den Organen und Geweben der Maus eine Rolle spielen, erfolgte mit Hilfe einer hierfür etablierten *in vitro* Kultur. Dazu wurden jeweils 10^5 NS Zellen in FluoroBlok Membraneinsätzen über Proteinextrakten muriner Organe und Zellkulturen kultiviert (siehe Kap. 2.2.12). Die durch die FluoroBlok Membraneinsätze in Richtung der Proteinextrakte oder Zellkulturen gewanderten Zellen wurden gezählt.

In den einzelnen Transwell-Kulturen wurden jeweils C17.2 NS Zellen in DMEM mit 15 % Serum kultiviert. In den Vertiefungen unterhalb der FluoroBlok Membranen befanden sich

- verschiedene Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (200 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml BSA),
- Proteinextrakte aus murinen Gehirnen (200 µg/ml und 500 µg/ml Protein aus ZNS),
- Proteinextrakte aus murinem Lungengewebe (200 µg/ml und 500 µg/ml Protein aus Lungengewebe) oder
- Proteinextrakte aus murinem Lebergewebe in verschiedenen Konzentrationen (200 µg/ml und 500 µg/ml Protein aus Lebergewebe).

Außerdem wurde das Migrationsverhalten der C17.2 NS Zellen gegenüber einer Primärzellkultur aus murinem Knochenmark geprüft.

Zur Ermittlung des Migrationsverhaltens von C17.2 NS Zellen in Abhängigkeit von gewebespezifischen chemotaktischen Reizen wurden von jeder Transwell-Kultur insgesamt 6

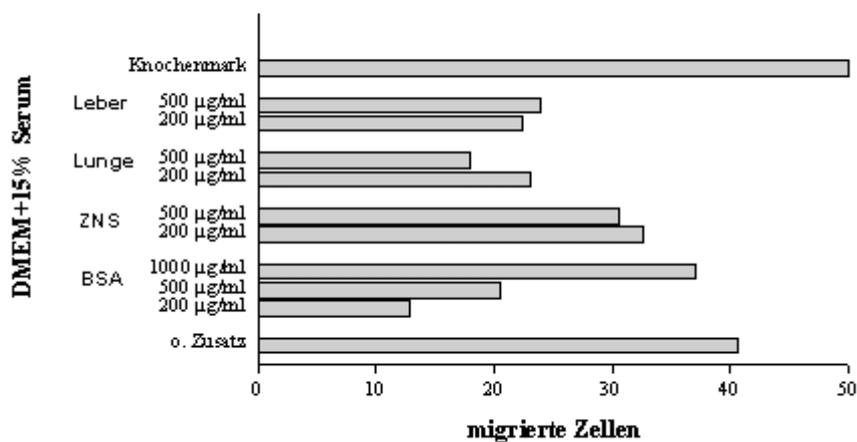
Ansätze angelegt. Die Zahl der durch die Poren der Transwell-Membran gewanderten Zellen wurde als Summe dieser 6 Ansätze ermittelt. Die so erhaltenen Zellzahlen wurden im bedingten Test zum Vergleich zweier Poisson-Verteilungen hinsichtlich signifikanter Steigerungen bzw. Erniedrigungen in Abhängigkeit von den in die Vertiefungen unter den Transwell-Membranen gegebenen Proteinextrakten muriner Organe oder Zellkulturen miteinander verglichen.

Im Folgenden ist die Anzahl der durch die Poren der Transwell-Membranen gewanderten Zellen angeführt, die sich als Summe aus 6 Ansätzen der einzelnen Transwell-Kulturen ergab (Tabelle 9). In Abbildung 6 sind die *in vitro* ermittelten Daten graphisch dargestellt.

Tabelle 9. Migrationsverhalten von C17.2 NS Zellen in der Transwell-Kultur

Zell-/Proteinzusatz zu DMEM mit 15 % Serum	Summe der migrierten Zellen
ohne Zusatz	244
200 µg/ml BSA	77
500 µg/ml BSA	163
1000 µg/ml BSA	286
200 µg/ml Proteinextrakt ZNS	213
500 µg/ml Proteinextrakt ZNS	212
200 µg/ml Proteinextrakt Lunge	138
500 µg/ml Proteinextrakt Lunge	129
200 µg/ml Proteinextrakt Leber	159
500 µg/ml Proteinextrakt Leber	153
Primärkultur aus KM	343

Abbildung 6: Chemotaxis von C17.2 NS Zellen *in vitro*



Transwell-Kultur muriner NS Zellen gegenüber Proteinextrakten aus murinen Organen und einer Primärzellkultur aus Knochenmark. Zur Ermittlung des Migrationsverhaltens von NS Zellen wurden jeweils 10^5 NS Zellen in DMEM mit 15 % Serum in FluoroBlok Membraneinsätzen der Firma Falcon, Heidelberg über Proteinextrakten muriner Organe und Zellkulturen kultiviert. Die durch die FluoroBlok Membraneinsätze in Richtung der Proteinextrakte oder Zellkulturen gewanderten Zellen wurden gezählt.

Ob signifikante Änderungen des Migrationsverhaltens von C17.2 NS Zellen gegenüber verschiedenen Proteinextrakten und Medienzusätzen vorliegen, wurde mit dem bedingten Test zum Vergleich zweier Poisson-Verteilungen geprüft. Hochsignifikant war hierbei die Steigerung der Migrationsrate der über der Primärkultur aus Knochenmark gewachsenen Zellen im Vergleich zu den über DMEM mit 15 % Serum gewachsenen Zellen ($p > 0,0001$). Hochsignifikant niedrigeres Migrationsverhalten von C17.2 NS Zellen wurden für die Kulturen festgestellt, die über dem Zusatz von 200 µg/ml bzw. 500 µg/ml Proteinextrakt aus Lunge oder Leber gewachsen waren, im Vergleich mit der Kultur, die über DMEM mit 15 % Serum gewachsen war ($p < 0,0001$). Ein Zusatz von 200 µg/ml bzw. 500 µg/ml BSA zu DMEM mit 15 % Serum ergab im Vergleich zu DMEM mit 15 % Serum allein eine signifikant niedrigere Migration ($p < 0,0001$). Die niedrigere Migration von C17.2 NS Zellen bei einem Zusatz von 1000 µg/ml BSA zu DMEM mit 15 % Serum war gegenüber der Wirkung von DMEM mit 15 % Serum nicht signifikant ($p = 0,0683$). Der Zusatz von 200 µg/ml Protein aus ZNS zu DMEM mit 15 % Serum ergab keine signifikante Verringerung der Anzahl der durch die Poren der Transwell-Membran gewanderten Zellen

im Vergleich zu DMEM mit 15 % Serum allein ($p = 0,1474$). Die Anzahl der in der Kultur mit 500 $\mu\text{g/ml}$ Proteinextrakt aus ZNS durch die Poren der FluoroBlok Membran gewanderten Zellen war gegenüber der in der Kultur mit DMEM mit 15 % Serum nicht signifikant verringert ($p = 0,1343$).

Beim Vergleich der chemotaktischen Wirkungen der Proteinzusätze untereinander ergaben sich signifikante Steigerungen der Migration für die Kulturen mit Zusatz von 200 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 500 $\mu\text{g/ml}$ Proteinextrakt aus murinem ZNS im Vergleich zu den Kulturen mit denselben Konzentrationen an Proteinzusatz aus muriner Lunge ($p < 0,0001$). Der Zusatz von 200 $\mu\text{g/ml}$ Protein aus murinem ZNS steigerte die Anzahl der durch die Poren der Transwell-Membran gewanderten Zellen im Vergleich zu einem Zusatz von 200 $\mu\text{g/ml}$ Protein aus muriner Leber signifikant ($p = 0,0051$). Ebenfalls signifikant erhöht waren die ermittelten Zellzahlen bei Zusatz von 500 $\mu\text{g/ml}$ Protein aus murinem ZNS im Vergleich zu einem Zusatz von 500 $\mu\text{g/ml}$ Protein aus muriner Leber zu DMEM mit 15 % Serum ($p = 0,0020$).

3.9 Einfluss einer Äthernarkose auf die Transplantation von NS Zellen ins ZNS durch i.v. Injektion

Um in das ZNS gelangen zu können, müssen i.v. injizierte Zellen die Blut-Hirn-Schranke, die die Blutbahn vom Extrazellularraum des ZNS trennt, überqueren. Zur Klärung der Frage, ob sich die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für die i.v. injizierten C17.2 NS Zellen durch Inhalation von Diethyläther modulieren lässt, wurden zwei Gruppen von Versuchstieren gebildet. Die eine Gruppe ($n=44$) wurde in Vollnarkose behandelt und inhalierte vor und während der i.v. Injektion von C17.2 NS Zellen Diethyläther. Die andere Gruppe ($n=29$) erhielt keine anästhetische Behandlung. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der i.v. Injektion von C17.2 NS Zellen wurde zum Nachweis der injizierten Zellen DNA aus dem Hirngewebe der Rezipienten-Mäuse isoliert und eine *lacZ*-spezifische PCR Analyse durchgeführt.

Bei den ohne anästhetische Behandlung i.v. injizierten Mäusen wurden insgesamt in 5 von 29 untersuchten Gehirnen (17 %) *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert. An den Tagen 3-4 konnten in allen 5 Gehirnen (100 %) C17.2 NS Zellen nachgewiesen werden. Am Tag 14 wurden in 0 von 24 untersuchten Gehirnen *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert (0 %).

Bei den Tieren, die Diethyläther inhalierten, wurden in 34 von 44 untersuchten Gehirnen (77 %) *lacZ*-spezifische Sequenzen nachgewiesen. Davon konnten 2-7 Tage nach Injektion in 22 von 25 untersuchten Gehirnen (88 %) injizierte NS Zellen nachgewiesen werden. Nach 14 Tagen wurde in 4 von 10 (40 %) und nach 21 Tagen in 5 von 5 untersuchten Gehirnen (100 %) DNA transplantiert Zellen nachgewiesen. 28 Tage nach i.v. Injektion wurden in 3 der 4 untersuchten Gehirne (75 %) injizierte Zellen festgestellt. Die Daten sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10. Modulation der ZNS-Transplantation i.v. injizierter NS Zellen mit Diethyläthernästhesie

Tage nach Inj.	ZNS-Implantation	
	mit Anästhesie	ohne Anästhesie
2	2/2 (100 %)	NU ^a
3	9/10 (90 %)	3/3 (100 %)
4	1/2 (50 %)	2/2 (100 %)
6	4/4 (100 %)	NU ^a
7	6/7 (86 %)	NU ^a
14	4/10 (40 %)	0/24 (0 %)
21	5/5 (100 %)	NU ^a
28	3/4 (75 %)	NU ^a
2 - 28	gesamt 34/44 (77 %)	5/29 (17 %)

^aNicht untersucht

Beim Vergleich der Transplantationseffizienz i.v. injizierter NS Zellen mit und ohne Inhalation von Diethyläther mit der χ^2 -Vierfeldertafel wurde für die unter Äthernarkose injizierten Tiere eine signifikante Steigerung der Transplantationseffizienz gegenüber den ohne Anästhesie injizierten Tieren festgestellt ($p < 0,0001$).

3.10 Einfluss einer Äthernarkose auf die Verteilung i.v. injizierter NS Zellen im murinen ZNS

Um einen Einfluss der Inhalationsnarkose mit Diethyläther auf die regionale Verteilung der i.v. injizierten NS Zellen in den Gehirnen der Rezipienten festzustellen, wurden die entnommenen Gehirne in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm aufgeteilt. Aus den Hirnregionen wurde getrennt DNA isoliert und mit der PCR Methode auf die Anwesenheit von *lacZ-Sequenzen* untersucht. Für diese Analysen wurden ausschließlich Gehirne verwendet, die den Rezipienten-Mäusen innerhalb der ersten Woche (Tag 3 bis 6) nach i.v. Injektion entnommen wurden.

Bei den ohne Anästhesie injizierten Mäusen wurden in 0 von 5 untersuchten Großhirnen (0 %) *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert. Die PCR Analyse wurde 3 (0/3) und 4 (0/2) Tage nach i.v. Injektion durchgeführt. In 1 von 3 Kleinhirnen konnten am Tag 3 nach Injektion C17.2 Zellen nachgewiesen werden, 4 Tage nach Injektion in 0 von 2. Ohne Anästhesie injizierte NS Zellen wurden in 5 von 5 untersuchten Stammhirnen (100 %) detektiert, davon waren 3 am Tag 3 nach Injektion und 2 am Tag 4 nach Injektion positiv.

Bei den unter Vollnarkose injizierten CD-1 Mäusen wurden in 9 von 9 untersuchten Großhirnen (100 %) *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert, davon waren 5 am Tag 3 und 4 am Tag 6 nach i.v. Injektion positiv. Die C17.2 NS Zellen konnten in 0 von 9 untersuchten Kleinhirnen detektiert werden, wobei die Untersuchung am Tag 3 (0/5) und 6 (0/4) nach i.v. Injektion stattfand. Die NS Zellen wurden in 4 von 9 untersuchten Stammhirnen (44 %) nachgewiesen. Davon waren am Tag 3 nach Injektion 0 von 5 (0 %) und am Tag 6 4 von 4 (100 %) positiv.

Die durch i.v. Injektion von C17.2 NS Zellen mit und ohne Ätheranästhesie ermittelte Transplantationseffizienz ist in den Tabellen 11 und 12 dargestellt.

Tabelle 11. Transplantation i.v. injizierter NS Zellen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm ohne Ätheranästhesie

Tage nach Inj.		Implantat positiv		
		Großhirn	Kleinhirn	Hirnstamm
3		0/3 (0 %)	1/3 (33 %)	3/3 (100 %)
4		0/2 (0 %)	0/2 (0 %)	2/2 (100 %)
3 - 6	gesamt	0/5 (0 %)	1/5 (20 %)	5/5 (100 %)

Tabelle 12. Transplantation i.v. injizierter NS Zellen in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm mit Ätheranästhesie.

Tage nach Inj.		Implantat positiv		
		Großhirn	Kleinhirn	Hirnstamm
3		5/5 (100 %)	0/5 (0 %)	0/5 (0%)
6		4/4 (100 %)	0/4 (0 %)	4/4 (100 %)
3 - 6	gesamt	9/9 (100 %)	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)

Die Aussagekraft statistischer Untersuchungen wird durch die Abhängigkeit der untersuchten Parameter und die kleinen Fallzahlen limitiert. Eine statistische Berechnung wurde deshalb nicht durchgeführt

3.11 Zusammenfassung der Ergebnisse

Nach i.v. Injektion in die laterale Schwanzvene konnten C17.2 NS Zellen im Gehirn von Mäusen nachgewiesen werden. In Abständen von 2 bis 38 Tagen nach Injektion von 10^6 bis 10^7 C17.2 NS Zellen wurde das Gehirn der behandelten Mäuse auf das Vorhandensein von injizierten Zellen untersucht. Einflussfaktoren wie das Zeitintervall zwischen Injektion der Zellen und Dissektion der Gehirne, die Anzahl injizierter Zellen, das Alter und Geschlecht der Rezipienten-Mäuse wurden bei der Bestimmung der Transplantationsrate berücksichtigt. Im Rahmen der PCR Analysen erwies sich der am Tag 14 nach i.v. Injektion erniedrigte Nachweis von NS Zellen im Gehirn im Vergleich zu den übrigen Daten als hochsignifikant (siehe Kap. 3.2). Ebenso fiel der bei der Gruppe der 26 bis 28 Tage alten Versuchstiere signifikant erniedrigte Implantationserfolg auf (siehe Kap. 3.2.2). Weder die Anzahl injizierter Zellen (siehe Kap. 3.2.1) noch das Geschlecht der Rezipienten-Mäuse (siehe Kap. 3.2.3) hatten einen Einfluss auf den Transplantationserfolg.

Nach welchem Muster sich die durch i.v. Injektion transplantierten NS Zellen im Gehirn verteilen, wurde durch gesonderte Analyse von Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm am X-Gal gefärbten und transparent gemachten Gewebe und in der PCR untersucht. Die injizierten Zellen konnten mit beiden Techniken in allen genannten Hirnabschnitten nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.4 und Kap. 3.5). Die Analyse koronarer und sagittaler Hirnschnitte im Western Blot ergab eine Implantation der Zellen in den kortikalen, oberflächlichen Abschnitten der Gehirne (siehe Kap. 3.6).

Die Verteilung der injizierten NS Zellen auf die Organe des murinen Organismus und ihr Verweilen im Blut wurde mit Hilfe der PCR analysiert (siehe Kap. 3.7). Es ergab sich ein signifikant häufigerer Nachweis der injizierten NS Zellen im Gehirn der Rezipienten als in ihrer Lunge oder Milz. Im Blut der Rezipienten konnten die C17.2 NS Zellen signifikant häufiger nachgewiesen werden als in der Milz.

Ob für die Migration von NS Zellen in die einzelnen Körperregionen chemotaktische Reize verantwortlich sind, wurde mit Hilfe eines hierfür etablierten *in vitro* Modells untersucht (siehe Kap. 3.8). Hochsignifikante hemmende Effekte auf die Migration von NS Zellen konnten für Proteinextrakte aus Lunge oder Leber festgestellt werden. Die Hemmung der

Migration von NS Zellen durch BSA war signifikant. Beim Vergleich der chemotaktischen Wirkungen der Proteinzusätze untereinander ergaben sich signifikante Steigerungen beim Migrationsverhalten der NS Zellen für Proteinextrakte aus murinem ZNS verglichen mit Proteinextrakten aus muriner Lunge oder Leber.

Die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke für die i.v. injizierten Zellen konnte durch eine Inhalationsanästhesie mit Diethyläther signifikant gesteigert werden (siehe Kap. 3.9). Die regionale Verteilung der i.v. injizierten Zellen wurde durch die Ätheranästhesie insofern beeinflusst, dass die NS Zellen bei Injektion ohne Inhalationsnarkose vor allem im Hirnstamm nachgewiesen wurden, bei Injektion mit Inhalationsnarkose vor allem im Großhirn (siehe Kap. 3.10).

4 DISKUSSION

4.1 Transplantation von neuronalen Stammzellen als Therapieansatz

Neurale Stammzellen sind in der Lage, sich nach Transplantation in das umgebende Hirngewebe zu integrieren. Dies wurde u.a. durch zahlreiche Studien mit Primärkulturen aus neuralem Gewebe gezeigt (Gage FH et al., *Neuron* 6 (1991) 1-12). Primäre Zellkulturen aus dem embryonalen Hippokampus proliferierten nicht nur *in vitro*, sondern vermehrten und differenzierten sich auch nach Transplantation in das hippokampale Gewebe adulter Säuger (Gage FH et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 11879-11883). Daraus ergibt sich die Möglichkeit der Substitution von Hirngewebe durch Transplantation von primären neuronalen Stammzellen oder von immortalisierten Stammzelllinien. Auch die in dieser Arbeit verwendeten C17.2 NS Zellen integrierten sich nach direkter Injektion in das Gehirn neugeborener und adulter Mäuse in das umliegende Hirngewebe und differenzierten sich entsprechend ihrer zytologischen Umgebung (Snyder EY et al., *Cell* 68 (1992) 33-51).

Für eine erfolgreiche gentherapeutische Anwendung immortaler neuronaler Stammzellen ist eine dauerhafte Expression der in die Zellen inserierten Gene nötig. Dass C17.2 NS Zellen dazu in der Lage sind, wurde anhand des *lacZ*-Gens von *E. coli* nachgewiesen. Versuchstiere zeigten noch 22 Monate nach Transplantation von NS Zellen eine hohe β -Galaktosidase Aktivität im Gehirn (Snyder EY et al., *Cell* 68 (1992) 33-51). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch i.v. Injektion und Transplantation der Zellen in das ZNS von Mäusen bestätigt. Im gesamten Zeitraum von 2 bis 38 Tagen nach der i.v. Injektion, in dem die mit C17.2 NS Zellen transplantierten Tiere analysiert wurden, konnten die injizierten NS Zellen aufgrund der durch das *lacZ*-Gen kodierten β -Galaktosidase Expression im Gehirn der murinen Rezipienten nachgewiesen werden. An den letzten Untersuchungszeitpunkten gelang dies in allen 5 untersuchten Gehirnen auf lichtmikroskopischer Ebene.

4.2 Transplantation durch i.v. Injektion

Bei den bislang beschriebenen Transplantationsmodellen wurden Zellen direkt in die Ventrikel oder in das Hirngewebe injiziert (Benninger Y et al., *Brain Pathol.* 10 (2000) 330-341; Campbell K et al., *Neuron* 15 (1995) 1259-1273; Snyder EY et al., *Cell* 68 (1992) 33-51; Yandava

BD et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 7029-7034). Eine Transplantation von Zellen in das ZNS ist jedoch auch durch i.v. Injektion möglich. So konnten hämatopoietische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark nach allogener Injektion in die Schwanzvene adulter Mäuse in multiplen Regionen des Gehirns (Kortex, Hippokampus, Thalamus, Hirnstamm und Kleinhirn) nachgewiesen werden (*Eglitis MA et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997) 4080-4085*). In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch C17.2 NS Zellen durch i.v. Injektion in das ZNS erwachsener Mäuse transplantiert werden können. Die Migration der i.v. injizierten NS Zellen aus dem Blut in das Gehirn der Rezipienten erfolgte innerhalb weniger Tage und wurde bereits am zweiten Tag nach der Injektion im ZNS der Empfänger nachgewiesen (siehe Kap. 3.2). Die Zellen waren dabei auf alle Regionen des Gehirns (Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm) verteilt und persistierten dort (siehe Kap. 3.4).

Die Stammzelltransplantation in das ZNS durch i.v. Injektion erscheint im Vergleich zur direkten i.c. Injektion vorteilhafter. Bei der i.c. Injektion muss die Schädelkalotte des Rezipienten perforiert werden, was beim Neugeborenen aufgrund der Weichheit des Gewebes noch eher praktikabel erscheint, beim Erwachsenen jedoch mit erheblicher Traumatisierung einhergeht. Auch die Gefahr der Verletzung anatomischer Strukturen ist bei der i.c. Injektion erhöht. Dagegen ist die Transplantation durch i.v. Injektion einfacher durchzuführen. Beim murinen Rezipienten wurden die C17.2 NS Zellen in PBS suspendiert und über eine laterale Schwanzvene injiziert.

In unserem Labor konnte bestätigt werden, dass sich C17.2 NS Zellen nach i.c. Injektion im ZNS dauerhaft ansiedeln (*Kramer-Haemmerle S et al., AIDS Res. Hum. Retroviruses 17 (2001) 597-602*). Für therapeutische Zwecke ist bei generalisierten zentralnervösen Störungen eine Dissemination transplantierte Zellen auf das gesamte Gehirn notwendig. Erst durch Migration i.c. injizierter Zellen vom Ort der Injektion in das umliegende Gewebe kann eine Verteilung im ZNS erreicht werden. Da die Wanderung neuronaler Zellen innerhalb des Gehirns beim Säugetier stark regional begrenzt ist (*Goldman SA et al., Trends Neurosci. 21 (1998) 107-114*), erscheint die durch den Blutstrom erreichte natürliche Dissemination i.v. injizierter Zellen im Gehirn für therapeutische und wissenschaftliche Zwecke sinnvoller.

4.2.1 Blut-Hirn-Schranke als limitierender Faktor bei der Transplantation von Zellen in das ZNS durch i.v. Injektion

Um in das Hirngewebe einzuwachsen zu können, müssen i.v. injizierte Zellen die Blut-Hirn-Schranke (*blood-brain barrier*, BBB) überqueren. Das Gefäßsystem des Gehirns ist das anatomische Substrat der BBB. Die Barrierefunktion wird vor allem durch die *tight junctions* zwischen den Endothelzellen der Hirnkapillaren aufrechterhalten. Sie verhindern die parazelluläre Diffusion hydrophiler Substanzen (*Brightman MW et al., J. Cell Biol. 40 (1969) 648-677; Reese TS et al., J. Cell Biol. 34 (1967) 207-217*). In den Gehirnen aller Vertebraten gibt es eine BBB. Sie entsteht sehr früh während der Entwicklung des ZNS. Schon für den murinen Embryo ist eine Trennung des ZNS vom systemischen Kreislauf beschrieben (*Bauer H et al., Dev. Brain Res. 86 (1995) 317-325*).

4.2.1.1 Modulation der Permeabilität der BBB

Die Permeabilität der BBB kann durch Infusion hypertonischer Lösungen (*Rapoport SI, Ciba. Found. Symp. 56 (1978) 237-255; Shivers RR, Brain Res. 170 (1979) 509-522*), durch Hitzeeinwirkung (*Wijsman JA et al., Acta Neuropathol. 86 (1993) 49-54*) oder Pharmaka (*Bartus RT et al., Exp. Neurol. 142 (1996) 14-28; Carlsson C et al., Acta Neuropathol. 41 (1978) 125-129; Sanovich E et al., Brain Res. 705 (1995) 125-135; Sarker MH et al., J. Physiol. 507.3 (1998) 909-918*) moduliert werden. Desweiteren kann die Durchgängigkeit der BBB auch durch die Inhalation von Diethyläther erhöht werden (*Fedorov EA, Eksp. Khir. Anesteziol. 13 (1968) 80-83; Titov NS et al., Eksp. Khir. Anesteziol. 3 (1974) 51-53*). Dies konnte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Kap. 3.9). Ein Teil der Rezipienten inhalierte vor und während der Injektion der Zellen Diethyläther (n = 44). Bei dieser Gruppe von Versuchstieren war die durch i.v. Injektion von NS Zellen im Gehirn erreichte Transplantationseffizienz (34/44, 77 %) signifikant erhöht gegenüber den nicht anästhesierten Tieren (5/29; 17 %) ($p < 0,0001$). Unter Ätheranästhesie konnten zu jedem Untersuchungszeitpunkt zwischen Tag 2 und 28 injizierte Zellen im Gehirn der Rezipienten nachgewiesen werden. Bei den ohne Anästhesie injizierten Tieren fiel auf, dass zwar in der ersten Woche nach Injektion C17.2 NS Zellen im Gehirn nachgewiesen werden konnten (5/5), jedoch nicht mehr nach 14 Tagen (0/24). Diese Beobachtung erklärt sich möglicherweise daraus, dass sich die über den Blutstrom in das Gehirn transportierten Zellen zunächst auf das Kapillarsystem des Gehirns verteilen, bevor sie über die BBB in das Gewebe migrieren. Es liegt nahe, dass bei der DNA-Isolation und anschließenden PCR Amplifikation aus innerhalb der ersten Woche nach i.v. Injektion entnommenen Gehirnen

nicht nur in das Gehirngewebe integrierte C17.2 NS Zellen nachgewiesen wurden, sondern auch solche Zellen, die sich im Kapillarsystem verfangen und die BBB noch nicht überquert hatten. Mit zunehmendem Zeitintervall von der Injektion bis zur Sektion konnten die im Kapillarnetz verweilenden NS Zellen vom Phagozytensystem der Maus abgeräumt werden. Bei der 14 Tage nach Injektion erfolgten DNA-Isolation konnten deshalb nur noch die in das Hirngewebe übergetretenen NS Zellen nachgewiesen werden. Hierbei öffnete möglicherweise die Inhalationsnarkose mit Äther den i.v. injizierten C17.2 NS Zellen die BBB und verstärkte somit den Übertritt aus dem Blutgefäßsystem in das Hirngewebe.

4.2.2 Zusätzliche Einflüsse auf die Transplantationseffizienz neuraler Stammzellen

Der Vergleich der durch die PCR Analyse ermittelten Daten ergab keine signifikanten Unterschiede bei der Häufigkeit der Detektion i.v. injizierter NS Zellen im ZNS in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt. Statistisch wurde zwar ein absteigender Trend beobachtet, wobei mit jedem Tag nach der i.v. Injektion die Nachweishäufigkeit injizierter Zellen um 2 % abnahm. Dies erwies sich jedoch als nicht signifikant und ist am besten durch Absterben und Phagozytose noch im Blut zirkulierender NS Zellen zu erklären (siehe Kap. 4.2.1). Beim Vergleich der Daten fiel die am Tag 14 nach i.v. Injektion stark erniedrigte Anzahl transplantierte NS Zellen im Gehirn der untersuchten Rezipienten auf. Der im statistischen Regressionsmodell berücksichtigte Effekt für den Tag 14 war hochsignifikant ($p < 0,0001$). Dieser Effekt erklärt sich aus dem Versuchsaufbau und ist auf die Inhalationsnarkose mit Diethyläther und nicht auf das Zeitintervall nach i.v. Injektion zurückzuführen. Denn zur Klärung der Frage, ob in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt nach i.v. Injektion Unterschiede bei der Nachweishäufigkeit der injizierten C17.2 NS Zellen im Gehirn auftraten, wurden Gehirne von Tieren analysiert unabhängig davon, ob die Rezipienten zur Steigerung des Transplantationserfolgs eine Äthernarkose erhalten hatten oder nicht. Bei näherer Betrachtung ergab sich, dass in der Gruppe der am Tag 14 nach i.v. Injektion untersuchten Tiere 10 Rezipienten-Mäuse mit Inhalation von Diethyläther injiziert worden waren, jedoch 24 Versuchstiere bei der Injektion keine Narkose erhalten hatten. Bei den 10 mit Anästhesie injizierten Tieren konnten in 40 % der untersuchten Gehirne *lacZ*-spezifische Sequenzen nachgewiesen werden. Bei den ohne Anästhesie injizierten Tieren konnten in keinem Fall *lacZ*-spezifische Sequenzen amplifiziert werden. Die Anästhesie mit Äther erhöht die Permeabilität der BBB signifikant, die Migration der injizierten NS Zellen aus dem Blut in das ZNS ist demzufolge erleichtert. Der

signifikant erniedrigte Transplantationserfolg in der zweiten Untersuchungswoche ist möglicherweise nicht auf den Untersuchungszeitpunkt zurückzuführen, sondern darauf, dass 24 der insgesamt 34 injizierten Versuchstiere keine die Permeabilität der BBB steigernde Behandlung mit Äther erhalten hatten.

Das Rezipientenalter hatte keinen Einfluss auf die Transplantationseffizienz. Dies wurde in 5 verschiedenen Altersgruppen nachgewiesen: 19 Tage, 26 bis 28 Tage, 40 Tage, 54 bis 56 Tage und 92 bis 100 Tage. Mit jedem Tag zunehmenden Alters der Versuchstiere nahm die relative Zahl der Zellen im ZNS um 2 % ab. Dieser Trend war jedoch nicht signifikant.

Da die BBB sehr früh während der Entwicklung des ZNS entsteht und schon beim murinen Embryo das ZNS vom Blutstrom trennt (*Bauer H et al., Dev. Brain Res. 86 (1995) 317-325*), wirkt sich das Alter der Rezipienten nicht auf die Permeabilität der BBB aus. Bei den 26 bis 28 Tage alten Mäusen wurde jedoch verglichen mit den 19, 54 bis 56 und 92 bis 100 Tage alten Versuchstieren eine signifikant erniedrigte Anzahl i.v. injizierter Zellen im ZNS nachgewiesen ($p = 0,0017$). Die in dieser Gruppe erniedrigte Nachweishäufigkeit erklärt sich aus dem Versuchsaufbau und ist auf die Inhalationsnarkose mit Diethyläther und nicht auf das Alter der Rezipienten-Mäuse zurückzuführen. Denn zur Klärung der Frage, ob in Abhängigkeit vom Alter der Rezipienten-Mäuse Unterschiede beim Transplantationserfolg i.v. injizierter C17.2 NS Zellen im Gehirn auftreten, wurden Gehirne von Tieren analysiert unabhängig davon, ob letztere eine Äthernarkose erhalten hatten. In der Gruppe der zum Zeitpunkt der Injektion 26 bis 28 Tage alten Rezipienten ($n = 44$) wurden insgesamt 34 Tiere ohne Inhalation von Diethyläther injiziert. Bei diesen Mäusen konnten nur in 5 (15 %) C17.2 NS Zellen nachgewiesen werden. Bei 10 der Tiere aus der Gruppe der 26 bis 28 Tage alten Rezipienten erfolgte die i.v. Injektion unter Ätheranästhesie. Bei 9 von diesen konnten transplantierte Zellen detektiert werden (90 %). Die aus den Gruppen der 19 Tage, 40 Tage, 54 bis 56 Tage und 92 bis 100 Tage alten Tiere stammenden Rezipienten-Mäuse erhielten alle eine Äthernarkose. Somit kann die sich im Vergleich der einzelnen Altersgruppen der Versuchstiere ergebende signifikante Verringerung bei der Nachweishäufigkeit i.v. injizierter C17.2 Zellen im ZNS für die Gruppe der 26 bis 28 Tage alten Rezipienten-Mäuse als Effekt der fehlenden Behandlung mit Diethyläther und nicht als Auswirkung des Alters der Versuchstiere erklärt werden.

Zusammenfassend ließ sich der Transplantationserfolg von i.v. injizierten C17.2 NS Zellen im Gehirn durch Variation der Parameter Zeitintervall zwischen Injektion und Dissektion

des Gehirns, Alter und Geschlecht der Rezipienten-Mäuse und Anzahl injizierter Zellen nicht modulieren. Die im logistischen Regressionsmodell ermittelten signifikanten Effekte für den Tag 14 nach i.v. Injektion (siehe Kap. 3.2) und für die Gruppe der 26 bis 28 Tage alten Versuchstiere (siehe Kap. 3.2.2) lassen sich durch die permeabilitätssteigernde Wirkung des Diethyläthers auf die BBB erklären.

4.2.2.1 Kritische Betrachtung der Analysen

Die sich im statistischen Regressionsmodell ergebenden signifikant erniedrigten Transplantationserfolge für den Tag 14 nach i.v. Injektion („Tag 14 Effekt“) bzw. für die Gruppe der 26 bis 28 Tage alten Tiere sind erstaunlich. Sie weisen bei näherer Betrachtung auf verschiedene Schwachpunkte beim experimentellen Aufbau und der Durchführung der Analysen hin.

Durch die geringe Gesamtzahl an Versuchstieren ($n = 96$) wird die Aussagekraft statistischer Untersuchungen stark eingeschränkt. Es ergibt sich eine Abhängigkeit der verschiedenen untersuchten Parameter. So könnte man beispielsweise den für die Gruppe der 26 bis 28 Tage alten Versuchstiere beobachteten signifikant erniedrigten Nachweis von injizierten C17.2 NS Zellen im ZNS auch alleine als logische Folge des „Tag 14 Effekts“ erklären, ohne die eigentliche Ursache, nämlich die fehlende Inhalationsnarkose mit Diethyläther (s. Kap. 4.2.2) zu berücksichtigen. Denn 33 der insgesamt 44 zum Zeitpunkt der i.v. Injektion mit NS Zellen 26 bis 28 Tage alten Rezipienten wurden 14 Tage nach der Injektion auf das Vorhandensein der Zellen im ZNS untersucht. Dagegen wurde nur eines der insgesamt 29 Tiere der übrigen Altersgruppen (19, 54 bis 56 und 92 bis 100 Tage) am Tag 14 nach der Injektion analysiert. Der für den Tag 14 nach Injektion von NS Zellen signifikant erniedrigte Transplantationserfolg („Tag 14 Effekt“), der durch eine fehlende Inhalationsnarkose erklärbar ist, führt wegen der Abhängigkeit der untersuchten Parameter gleichzeitig auch zu einem signifikant erniedrigten Transplantationserfolg bei den 26 bis 28 Tage alten Versuchstieren, da diese zum Großteil (33/44, 75 %) am Tag 14 nach der i.v. Injektion untersucht wurden.

Auch was den zeitlichen Versuchsaufbau angeht, können Erklärungen für den „Tag 14 Effekt“ gefunden werden. Die im zeitlichen Verlauf der experimentellen Arbeit zuerst durchgeführten Analysen beschränken sich fast ausschließlich auf das Wiederfinden i.v. injizierter Zellen am Tag 14 nach Injektion. Die Experimente zum Nachweis der i.v.

injizierten Zellen zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten (2, 3, 4, 6, 7, 21 und 28 Tage nach i.v. Inj.) wurden erst später im zeitlichen Verlauf der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Somit weist der „Tag 14 Effekt“ möglicherweise auf experimentelle Probleme hin, die sich aufgrund mangelnder Erfahrung und Übung vor allem zu Beginn der praktischen Arbeiten manifestierten. Denn der Umgang mit den Versuchstieren, die Injektionstechnik sowie die Zellkulturmethoden verbesserten sich mit zunehmender Zahl an untersuchten Tieren. Dieser Übungseffekt hat vermutlich positive Auswirkungen auf das Wiederfinden der injizierten Zellen, was sich möglicherweise in den im zeitlichen Verlauf der vorliegenden Arbeit später durchgeführten Experimenten zeigt.

Um die Aussagekraft der experimentell erhobenen Daten zu verbessern, wäre es von Vorteil gewesen, den verschiedenen Analysen, einen im Aufbau ähnlichen Versuch vorzuschalten. Dadurch wären möglicherweise auch einige der Probleme, die sich vor allem bei der statistischen Auswertung und Interpretation der erhobenen Daten ergaben, umgangen worden. So wäre möglicherweise ein sich auf die Analysen auswirkender Übungseffekt in einem Vorversuch vorweggenommen worden. Außerdem hätte ein Vorversuch unter Umständen ermöglicht, die Zahl der für die verschiedenen Experimente benötigten Versuchstiere im Voraus besser einschätzen zu können, um dann durch Bildung einzelner Versuchstiergruppen Abhängigkeiten der untersuchten Parameter zu vermeiden.

4.3 Verteilung von NS Zellen im Organismus nach i.v. Injektion

Analog zum Transplantationsmodell mit Stammzellen aus dem Knochenmark (*Eglitis MA et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94 (1997) 4080-4085*) konnten injizierte NS Zellen nicht nur in allen untersuchten Gehirnregionen, sondern auch im Blut, in der Lunge und in der Milz der Rezipienten nachgewiesen werden. Was die NS Zellen letztendlich in das Gehirn lockt, bleibt offen. Dass eine höhere Affinität der C17.2 NS Zellen zu neuralem Gewebe als zu pulmonalem oder lienalem Gewebe besteht, konnte aus den ermittelten Daten entnommen werden. Insgesamt konnten die transplantierten Zellen bei 39 von 73 untersuchten Tieren (53 %) im Gehirn nachgewiesen werden. Dies war signifikant häufiger als in der Lunge (24/81, 30 %) oder in der Milz (7/33, 21 %).

Im Blut (41 %) der Rezipienten konnten NS Zellen doppelt so häufig nachgewiesen werden

wie in der Milz (21 %). Dieser Unterschied war zwar nicht signifikant ($p = 0,0565$), unterstreicht aber einerseits die Funktion der Milz als Organ, das für die Sequestration von Zellen verantwortlich ist. Andererseits wird dadurch, dass in der 4. Woche nach i.v. Injektion ein Nachweis von C17.2 NS Zellen im Blut von Rezipienten-Mäusen noch möglich war (30/74, 41 %), nahegelegt, dass ein Abräumen der injizierten im Blut zirkulierenden Zellen durch Makrophagen nicht zwingend erfolgt.

Ein Verweilen injizierter NS Zellen im Blut über einen Zeitraum von mehreren Wochen hinaus erklärten Bjornson et al. (*Bjornson CRR et al., Science 283 (1999) 534-537*) dadurch, dass sich NS Zellen nicht nur in verschiedene neurale Zellformen, sondern auch in hämatologische Zellen differenzieren können. Nach systemischer Injektion konnten NS Zellen das vorher durch subletale Bestrahlung zerstörte blutbildende Gewebe ersetzen und sich in reife Blutzellen differenzieren. Wenn man davon ausgeht, dass die i.v. injizierten C17.2 NS Zellen nicht nur zu einer Differenzierung in Zellen des ZNS sondern auch zu einer Differenzierung in Zellen des Blutes in der Lage sind, überrascht der Nachweis der für die injizierten NS Zellen spezifischen *lacZ*-Sequenz auch vier Wochen nach i.v. Injektion im Blut nicht.

Die zielgerichtete Absiedlung von NS Zellen im Gehirn ist noch weitgehend unklar. *In vitro* Untersuchungen (siehe Kap. 3.8) zeigten jedoch eine erhöhte Affinität der NS Zellen zu Proteinen aus dem ZNS im Vergleich mit Proteinen aus Lunge oder Leber. Auch gegenüber der Primärkultur aus Knochenmark konnte eine gesteigerte Migration von C17.2 NS Zellen beobachtet werden. Diese gegenüber Knochenmark erhöhte Affinität der C17.2 NS Zellen ist ein Hinweis darauf, dass von den in der Primärkultur lebenden Knochenmarkzellen auf die C17.2 NS Zellen chemotaktisch wirkende Faktoren produziert wurden, welche die verstärkte Wanderung der C17.2 NS Zellen durch die Poren der FluoroBlok-Membran bewirkten. Die zur Untersuchung der Chemotaxis verwendeten Proteinzusätze aus ZNS, Lunge und Leber wurden durch Lysierung und damit Zerstörung des jeweiligen Gewebes gewonnen. Es ist anzunehmen, dass bei der Herstellung der Proteinextrakte vorhandene Chemokine eventuell ebenfalls zerstört wurden. Dennoch kann man davon ausgehen, dass chemotaktische Faktoren die Zellen aktiv ins ZNS locken.

Es bleibt zu untersuchen, ob die durch Wachstumsfaktoren wie PDGF (*platelet-derived growth factor*) oder IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) ausgelösten chemotaktischen Bewegungen neuraler Stammzellen (*Forsberg-Nilsson K et al., J. Neurosci. Res. 53 (1998) 521-530; Goldman SA*

et al., Trends Neurosci. 21 (1998) 107-114) innerhalb des ZNS auch für die Organverteilung i.v. injizierter NS Zellen von Bedeutung sind. Die Wanderung von Zellen muss als komplexer Vorgang gesehen werden, bei dem das Erkennen von Signalen durch zelleigene Rezeptoren ebenso eine Rolle spielt wie deren Interpretation durch die Maschinerie der Zelle. Ob für das Einwandern von NS Zellen aus dem Blut in das Gehirn dieselben Mechanismen von Bedeutung sind, die die Migration neuraler Zellen innerhalb des ZNS bewirken, bleibt zu klären. Zusammenfassend ergaben sich durch die Chemotaxis-Experimente deutliche Hinweise, dass für die i.v. injizierten C17.2 NS Zellen eine verstärkte Tendenz zur Migration in das Gehirn besteht.

4.4 Ausblick

Diese und andere Studien zeigen, dass immortalisierte multipotente NS Zellen nach Transplantation integrale Bestandteile der zentralnervösen Zytoarchitektur werden und als Vehikel für exogene Faktoren in das ZNS dienen können. Deswegen und aufgrund ihres neuralen Ursprungs eignen sich NS Zellen hervorragend für therapeutische Zwecke im Sinne einer Zell- und Gewebesubstitution als auch als „drug delivery“ Modell. Letzteres konnte mit retroviralen Vektoren erfolgreich nachgewiesen werden (*Whitemore SR et al., Mol. Neurobiol. 12 (1996) 13-38*), wodurch der Transfer therapeutischer Gene in das Gehirn und ihre stabile Expression möglich wurde (*Fisher LJ et al., Neuron 6 (1991) 371-380*). Nach Transplantation wurden die Zellen schnell in das umgebende Hirngewebe integriert und passten sich der zytoarchitektonischen Umgebung an (*Snyder EY et al., Cell 68 (1992) 33-51*). Die Differenzierung der transplantierten Zellen konnte im Tiermodell funktionelle und strukturelle Defekte ausgleichen (*Crang AJ et al., J. Neuroimmunol. 40 (1992) 243-254; Snyder EY et al., Nature 374 (1995) 367-370; Fisher LJ et al., Neuron 6 (1991) 371-380*). Mit der Methode, NS Zellen durch i.v. Injektion in das Gehirn zu transplantieren, ergibt sich eine einfache Möglichkeit des Gentransfers in das ZNS. Durch die mit dem Blutstrom ermöglichte Dissemination der i.v. injizierten Zellen im Gehirn ist weiterhin die Voraussetzung für einen globalen substantiellen und funktionellen Ersatz von Hirngewebe gegeben. Die Absiedlung der i.v. injizierten Zellen erfolgte in Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm, wenn auch die Zellen nur in den oberflächennahen, kortikalen Regionen nachgewiesen werden konnten.

Mit dem Transfer von Genen in NS Zellen und ihre anschließende Transplantation ins ZNS

wird die Expression fremder Gene, die von therapeutischem oder wissenschaftlichem Interesse sind, im Gehirn möglich. Auf diese Weise ergeben sich neue Strategien bei der Therapie von primären und sekundären Defektzuständen des ZNS. So könnte eine Transplantation therapeutischer Genprodukte in das Gehirn durch i.v. Injektion von NS Zellen wichtig werden für die Therapie von Erkrankungen, die aufgrund der Barrierefunktion der BBB auf systemisch verabreichte therapeutische Substanzen nicht ansprechen. Zusammen mit der modulierten Permeabilität der BBB könnte die hier vorgestellte Methode zum Zell- und Gentransfer ins ZNS durch ihre Einfachheit und Effektivität für wissenschaftliche und therapeutische Anwendungen im Rahmen der ZNS Pathogenese eine wichtige Rolle spielen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit zeigt am Beispiel von C17.2 NS Zellen, die CD1 Mäusen im Alter von 19 bis 100 Tagen über eine laterale Schwanzvene verabreicht wurden, eine Möglichkeit des Gentransfers ins ZNS. Anhand des *lacZ*-Reportergens und seiner Genprodukte werden injizierte NS Zellen im gesamten Untersuchungszeitraum von 2 bis 38 Tagen nach i.v. Injektion im murinen Gehirn wiedergefunden. Der Nachweis der injizierten Zellen erfolgt mittels X-Gal-Färbung, PCR Amplifikation und Western Blot Analysen.

Durch eine Inhalationsanästhesie mit Diethyläther wird die Permeabilität der BBB und somit die Migrationsrate der i.v. injizierten Zellen ins ZNS erhöht. Der Transplantationserfolg ist unabhängig von der Anzahl der injizierten Zellen und vom Geschlecht der Rezipienten-Mäuse.

Bei den durchgeführten Analysen wurde die regionale Verteilung der nach i.v. Injektion in die zentralnervöse Substanz integrierten C17.2 NS Zellen berücksichtigt. Es ergibt sich eine Verteilung der Zellen auf die kortikalen, oberflächlichen Abschnitte von Großhirn, Kleinhirn und Hirnstamm. Verglichen mit den Organen Lunge und Milz des murinen Organismus und dem Verweilen im Blut ist der Nachweis der i.v. injizierten Zellen im ZNS erhöht. In einem *in vitro* Modell zeigt sich anhand von Proteinextrakten aus dem murinen ZNS eine erhöhte Affinität von C17.2 NS Zellen zu zentralnervösem Gewebe.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Studie am Beispiel der C17.2 NS Zellen zeigen, dass eine Integration transplanteder NS Zellen in die zentralnervöse Zytoarchitektur möglich ist. Hierbei stellt die i.v. Injektion eine einfache und effektive Methode der Transplantation dar. Durch genetische Modifikation der i.v. verabreichten Zellen wird der Transfer fremder Gene in das Gehirn möglich, was künftig im Rahmen der ZNS Pathogenese von therapeutischer oder wissenschaftlicher Relevanz sein kann.

6 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BABB	Benzylalkohol mit Benzylbenzoat
BBB	<i>blood-brain barrier</i> , Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
DANN	<i>desoxyribo-nucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EGL	<i>external germinal layer</i> , äußere Germinalzone
FKS	fötales Kälberserum
HS	<i>horse serum</i> , Pferdeserum
i.c. Injektion	intrakranielle Injektion
IL	Interleukin
Inj.	Injektion
i.v. Injektion	intravenöse Injektion
Kap.	Kapitel
KM	Knochenmark
NGF	<i>nerve growth factor</i> , neuronenspezifischer Wachstumsfaktor
NS Zellen	neurale Stammzellen
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RM	Rückenmark
SCF	<i>stem cell factor</i> , Stammzellfaktor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>shi</i> Maus	<i>shiverer</i> Maus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
WB	Western Blot

X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

7 LITERATURVERZEICHNIS

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

Bandyopadhyay, P.K. and Temin, H.M. Expression of a complete chicken thymidine kinase gene inserted in a retrovirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 4 (1984) 749.

Bartus, R.T., Elliott, P.J., Dean, R.L., Hayward, N.J., Nagle, T.L., Huff, M.R., Snodgrass, P.A. and Blunt, D.G. Controlled modulation of BBB permeability using the bradykinin agonist RMP-7. *Exp. Neurol.* 142 (1996) 14-28.

Bauer, H., Sonnleitner, U., Lametschwandtner, A., Steiner, M., Adam, H. and Bauer, H.C. Ontogenic expression of the erythroid-type glucose transporter (Glut 1) in the telencephalon of the mouse: correlation to the tightening of the blood-brain barrier. *Dev. Brain Res.* 86 (1995) 317-325.

Benninger, Y., Marino, S., Hardegger, R., Weissmann, C., Aguzzi, A. and Brandner, S. Differentiation and histological analysis of embryonic stem cell derived neural transplants in mice. *Brain Pathol.* 10 (2000) 330-341.

Bjornson, C.R.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C. and Vescovi, A.L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283 (1999) 534-537.

Brightman, M.W. and Reese, T.S. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* 40 (1969) 648-677.

Campbell, K., Olsson, M. and Bjorklund, A. Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron* 15 (1995) 1259-1273.

Carlsson, C. and Johansson, B.B. Blood-brain barrier dysfunction after amphetamine administration in rats. *Acta Neuropathol.* 41 (1978) 125-129.

Crang, A.J., Franklin, R.J.M., Blakemore, W.F., Noble, M., Barnett, S.C., Groves, A., Trotter, J. and Schachner, M. The differentiation of glial cell progenitor populations following transplantation into non-repairing central nervous system glial lesions in adult animals. *J. Neuroimmunol.* 40 (1992) 243-254.

Eglitis, M.A. and Mezey, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 4080-4085.

Fedorov, E.A. Permeability of the hemato-encephalic and hemato-ophthalmic barriers to diethyl ether. *Eksp. Khir. Anesteziol.* 13 (1968) 80-83.

Fisher, L.J., Jinnah, H.A., Kale, L.C., Higgins, G.A. and Gage, F.H. Survival and function of intrastrially grafted primary fibroblasts genetically modified to produce L-Dopa. *Neuron* 6 (1991) 371-38.

Forsberg-Nilsson, K., Behar, T.N., Afrakhte, M., Barker, J.L. and McKay, R.D.G. Platelet-derived growth factor induces chemotaxis of neuroepithelial stem cells. *J. Neurosci. Res.* 53 (1998) 521-530.

Frederiksen, K. and McKay, R.D.G. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells *in vivo*. *J. Neurosci.* 8 (1988) 1144-1151.

Gage, F.H. and Fisher, L.J. Intracerebral grafting: a tool for the neurobiologist. *Neuron* 6 (1991) 1-12.

Gage, F.H., Coates, P.W., Palmer, T.D., Kuhn, H.G., Fisher, L.J., Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Suhr, S.T. and Ray, J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 11879-11883.

Gage, F.H., Ray, J. and Fisher, L. Isolation, characterization and use of stem cells from the

CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 18 (1995) 159-192.

Goldman, S.A. and Luskin, M.B. Strategies utilized by migrating neurons of the postnatal vertebrate forebrain. *Trends Neurosci.* 21 (1998) 107-114.

Hatten, M.E. Central nervous system neuronal migration. *Annu. Rev. Neurosci.* 22 (1999) 511-39.

Joyner, A., Keller, G., Phillips, R.A. and Bernstein, A. Retrovirus mediated transfer of a bacterial gene into mouse haematopoietic progenitor cells. *Nature* 305 (1983) 556.

Kramer-Haemmerle, S., Kohleisen, B., Hohenadl, C., Shumay, E., Becker, I., Erfle, V., Schmidt, J. HIV type 1 nef promotes neoplastic transformation of immortalized neural cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17 (2001) 597-602.

Land, H., Chen, A.C., Morgenstern, J.P., Parada, L.F. and Weinberg, R.A. Behavior of *myc* and *ras* oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 1917-1925.

Lois, C. and Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 2074-2077.

Luciw, P.A. and Leung, N.J. Mechanisms of retrovirus replication. In *"The Retroviridae"*, Levy, J.A. (Ed.), Plenum Press, New York (1992) 159-298.

Martinez-Serrana, A. and Bjorklund, A. Ex vivo nerve growth factor gene transfer to the basal forebrain in presymptomatic middle-aged rats prevents the development of cholinergic neuron atrophy and cognitive impairment during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 1858-1863.

Molineaux, S.M., Engh, H., de Ferra, F., Hudson, L. and Lazzarini, R.A. Recombination within the myelin basic protein gene created the dysmyelinating shiverer mouse mutation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7542-7546.

Rapoport, S.I. Osmotic opening of the blood-brain barrier. *Ciba. Found. Symp.* 56 (1978) 237-255.

Reese, T.S. and Karnovsky, M.J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34 (1967) 207-217.

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

Ryder, E.F., Snyder, E.Y. and Cepko, C.L. Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J. Neurobiol.* 21 (1990) 356-375.

Sanovich, E., Bartus, R.T., Friden, P.M., Dean, R.L., Le, H.Q. and Brightman, M.W. Pathway across blood-brain barrier opened by the bradykinin agonist RMP-7. *Brain Res.* 705 (1995) 125-135.

Sarker, M.H., Easton, A.S. and Fraser, P.A. Regulation of cerebral microvascular permeability by histamine in the anaesthetized rat. *J. Physiol.* 507.3 (1998) 909-918.

Shivers, R.R. The effect of hyperglycemia on brain capillary permeability in the lizard, *Anolis carolinensis*. A freeze-fracture analysis of blood-brain barrier pathology. *Brain Res.* 170 (1979) 509-522.

Skoff, R.P. Gliogenesis in rat optic nerve: astrocytes are generated in a single wave before oligodendrocytes. *Dev. Biol.* 139 (1990) 149-168.

Snyder, E.Y. and Flax, J.D. Transplantation of neural progenitor and stem-like cells as a strategy for gene therapy and repair of neurodegenerative diseases. *Mental Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 1 (1995) 27-38.

Snyder, E.Y., Deitcher, D.L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartwig, E.A. and Cepko, C.L. Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 68 (1992) 33-51.

Snyder, E.Y., Taylor, R.M. and Wolfe, J.H. Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* 374 (1995) 367-370.

Svendsen, C.N., Caldwell, M.A., Shen, J., ter Borg, M.G., Rosser, A.E., Tyers, P., Karmioli, S. and Dunnett, S.B. Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 148 (1997) 135-146.

Tabin, C.J., Hoffman, J.W., Goff, S.P. and Weinberg, R.A. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector in transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 2 (1982) 426.

Titov, N.S. and Saliaev, V.N. Distribution, permeability of the hemato-encephalic barrier, elimination of inhalation anaesthetics from the brain. *Eksp. Khir. Anesteziol.* 3 (1974) 51-53.

Weiss, S., Dunne, C., Hewson, J., Wohl, C., Wheatley, M., Peterson, A.C. and Reynolds, B.A. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J. Neurosci.* 16 (1996) 7599-7609.

Weiss, S., Reynolds, B.A., Vescovi, A.L., Morshead, C., Craig, C.G. and van der Koy, D. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *J. Neurosci.* 16 (1996) 7599-7609.

Whittemore, S.R. and Snyder, E.Y. Physiological relevance and functional potential of central nervous system-derived cell lines. *Mol. Neurobiol.* 12 (1996) 13-38.

Wijsman, J.A. and Shivers, R.R. Heat stress affects blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase in mice. *Acta Neuropathol.* 86 (1993) 49-54.

Yandava, B.D., Billingham, L.L. and Snyder, E.Y. "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated *shiverer* mouse brain. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 7029-7034.

8 DANKSAGUNG

Mein Dank richtet sich an erster Stelle an die Herrn Professoren Dr. V. Erfle und Dr. J. Schmidt. Herrn Prof. V. Erfle danke ich dafür, dass ich diese Arbeit in dem von ihm geleiteten Institut für Molekulare Virologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit anfertigen durfte. Herrn Prof. J. Schmidt danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Seinen Rat und seine Erklärungen weiß ich noch immer zu schätzen.

Ein besonderer Dank richtet sich an meine Kollegin Frau Dr. S. Kramer-Haemmerle, die mir in allen Fragen zur Seite stand und sich sehr zeitintensiv praktisch und theoretisch mit dieser Arbeit auseinandersetzte und diese unterstützte.

Ebenso danke ich allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Virologie und im besonderen der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. J. Schmidt, deren Zusammenarbeit ich sehr schätzte.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der durchgeführten Experimente möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Dr. H. Scherb vom Institut für Biomathematik und Biometrie bedanken. Seine Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit erleichterten mir die Auswertungen sehr.

Für ihre Geduld und menschliche Unterstützung während des Entstehens dieser Dissertation danke ich meiner Familie und meinen Freunden, insbesondere meiner langjährigen Freundin Katharina Kranzer.