

**Überleben und Differenzierung TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-  
transduzierter transplantierte neuraler  
Vorläuferzellen nach zerebraler Ischämie der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Mimount El Aanbouri

aus Ben Tayeb/Marokko

Göttingen 2009

D 7

Referent: Prof. Dr. Ralf Heinrich

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Jahn

Tag der mündlichen Prüfung:

---

# 1. Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Inhaltsverzeichnis</b>  | 1  |
| <b>2. Abkürzungsverzeichnis</b>   | 4  |
| <b>3. Einleitung</b>  | 7  |
| 3.1. Zerebrale Ischämie   | 7  |
| 3.1.1. Klinische Aspekte  | 7  |
| 3.1.2. Pathophysiologie der zerebralen Ischämie   | 8  |
| 3.1.2.1. Zusammenbruch des zellulären Energiestoffwechsels und<br>Produktion toxischer Zellmetabolite (Exzitotoxizität) | 9  |
| 3.1.2.2. Peri-Infarkt-Depolarisationen  | 9  |
| 3.1.2.3. Postischämische Inflammation   | 10 |
| 3.1.2.4. Postischämische Reperfusionsschäden  | 11 |
| 3.1.2.5. Programierter Zelltod (Apoptose)   | 12 |
| 3.2. Endogene Neurogenese des adulten ZNS   | 13 |
| 3.3. Ischämieinduzierte Aktivierung der endogenen Neurogenese   | 15 |
| 3.4. Verwendung exogener Zellen als neuronale Zellersatz-Therapie   | 16 |
| 3.5. Einsatz exogener adulter neuraler Vorläuferzellen nach zerebraler<br>Ischämie                                      | 18 |
| 3.6. Experimentelle Ansätze zur Resistenzerhöhung transplanteder NPC  | 19 |
| 3.7. Das antiapoptotische TAT-Fusionsprotein TAT-Bcl-x <sub>L</sub>   | 20 |
| <b>4. Zielsetzung</b>   | 22 |
| <b>5. Material und Methoden</b>   | 23 |
| 5.1. Methoden   | 23 |
| 5.1.1. Versuchstiere und Haltung  | 23 |
| 5.1.2. Präparation und Kultivierung von NPC   | 23 |
| 5.1.3. Passagieren der Neurosphären   | 24 |
| 5.1.4. Expression und Purifikation des rekombinanten<br>Fusionsproteins TAT-Bcl-x <sub>L</sub>                          | 26 |
| 5.1.5. Hypoxie-Hypoglykämie-Test (OGD)  | 26 |

---

|  |           |
|--|-----------|
| 5.1.6. Intrazellulärer Nachweis von TAT-Bcl-x <sub>L</sub> in transduzierten NPC <i>in vitro</i> | 27        |
| 5.1.7. Induktion einer transienten fokalen Ischämie der Maus                                     | 28        |
| 5.1.8. Stereotaktische intrastriatale Injektion von NPC  | 30        |
| 5.1.9. Experimentelle Gruppen  | 31        |
| 5.1.10. Proliferationsanalysen mit Hilfe des Marker BrdU   | 32        |
| 5.1.11. Immunhistochemische Analysen   | 32        |
| 5.1.12. Analyse von postischämischer Zellschädigung und neuronaler Dichte                        | 35        |
| 5.1.13. Analyse des postischämischen funktionellen Defizits                                      | 36        |
| 5.1.13.1. Corner Turn Test   | 36        |
| 5.1.13.2. Morris Water Maze  | 37        |
| 5.1.14. Statistik  | 37        |
| 5.2. Materialien   | 38        |
| 5.2.1. Chemikalien   | 38        |
| 5.2.2. Verbrauchsmaterialien   | 39        |
| 5.2.3. Primärantikörper  | 40        |
| 5.2.4. Sekundärantikörper  | 40        |
| 5.2.5. Medien, Puffer und Lösungen   | 40        |
| 5.2.6. Geräte  | 44        |
| <b>6. Ergebnisse</b>   | <b>45</b> |
| 6.1. Differenzierungsgrad kultivierter NPC   | 45        |
| 6.2. Neuroprotektiver Effekt von TAT-Bcl-x <sub>L</sub> auf NPC <i>in vitro</i>                  | 46        |
| 6.3. Überleben transplantierte NPC <i>in vivo</i>  | 48        |
| 6.4. Proliferation transplantierte NPC   | 50        |
| 6.5. Differenzierung transplantierte NPC   | 52        |
| 6.5.1. Differenzierung in neurale Vorläufer  | 52        |
| 6.5.2. Astrogliale Differenzierung   | 54        |
| 6.5.3. Neuronale Differenzierung   | 55        |
| 6.6. NPC-vermittelte Neuroprotektion nach zerebraler Ischämie                                    | 57        |
| 6.7. Verhaltenstests zur Analyse des post-ischämischen funktionellen Defizits                    | 59        |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.7.1. Corner Turn Test   | 59        |
| 6.7.2. Morris Water Maze  | 60        |
| 6.8. Analyse von NPC-induzierten Effekten auf die post-ischämische endogene Neurogenese | 62        |
| 6.8.1. Neurale Differenzierung der BrdU <sup>+</sup> proliferierender Zellen            | 63        |
| 6.8.2. Astrogliale Differenzierung  | 64        |
| 6.9. Neuroregenerativer Einfluss applizierter NPC                                       | 65        |
| <b>7. Diskussion</b>  | <b>69</b> |
| <b>8. Zusammenfassung/Summary</b>   | <b>79</b> |
| <b>9. Literaturverzeichnis</b>  | <b>83</b> |
| <b>10. Danksagung</b>   | <b>97</b> |
| <b>11. Erklärung</b>  | <b>98</b> |
| <b>12. Lebenslauf</b>   | <b>99</b> |

## 2. Abkürzungsverzeichnis

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>AK</b>               | Antikörper  |
| <b>ALS</b>              | Amyotrophe Lateralsklerose  |
| <b>AMPA</b>             | Alpha ( $\alpha$ )-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat ( $\alpha$ – <i>amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid</i> ) |
| <b>APS</b>              | Ammoniumperoxodisulfat  |
| <b>ATP</b>              | Adenosintriphosphat   |
| <b>BaCl</b>             | Bariumchlorid   |
| <b>BCA</b>              | Bicinchonin Säure ( <i>bicinchoninic acid</i> )   |
| <b>bFGF</b>             | basischer Fibroblastenwachstumsfaktor ( <i>basic fibroblast growth factor</i> )   |
| <b>BrdU</b>             | Bromodeoxyuridin  |
| <b>BSA</b>              | bovines Serumalbumin  |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b> | Kalziumchlorid ( <i>calcium chloride</i> )  |
| <b>CBF</b>              | zerebraler Blutfluss  |
| <b>CNPase</b>           | 2'-3'-zyklische Nukleotid Phosphodiesterase ( <i>2'-3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase</i> )  |
| <b>CoCl<sub>2</sub></b> | Cobalt(II)-chlorid  |
| <b>DAPI</b>             | 4'6-Diamidino -2-Phenylindol  |
| <b>Dcx</b>              | Doublecortin  |
| <b>Dks</b>              | Eselserum ( <i>donkey serum</i> )   |
| <b>DMEM</b>             | Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium ( <i>Dulbeccos's modified eagle medium</i> )  |
| <b>DMSO</b>             | Dimethylsulfoxid  |
| <b>DNA</b>              | Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )  |
| <b>DNase 1</b>          | Endonuklease, die DNA unspezifisch in Di-, Tri-, und Oligonukleotide mit 5'Phosphat- und 3'Hydroxylenden spaltet                          |
| <b>DTT</b>              | Dithiotreitol   |
| <b>ECL</b>              | <i>enhanced chemoluminescens</i>  |
| <b>EDTA</b>             | Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> )   |
| <b>EGF</b>              | epidermaler Wachstumsfaktor ( <i>epidermal growth factor</i> )  |
| <b>eIF</b>              | eukaryotischer Initiationsfaktor  |
| <b>EtOH</b>             | Ethanol   |

---

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>GDNF</b>                          | <i>glial cell-line derived neurotrophic factor</i>  |
| <b>GFAP</b>                          | saures Gliafaserprotein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )                                  |
| <b>GFP</b>                           | grün fluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i> ( <i>green fluorescent protein</i> )     |
| <b>HA</b>                            | Hämagglutinin   |
| <b>HBSS</b>                          | Hank's gepufferte Salzlösung ( <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> )                               |
| <b>HCl</b>                           | Salzsäure (37%ige Lösung von Chlorwasserstoff in Wasser)  |
| <b>HEPES</b>                         | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure  |
| <b>HIV</b>                           | humanes Immundefizienzvirus   |
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>               | destilliertes Wasser  |
| <b>HRP</b>                           | Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )  |
| <b>IgG</b>                           | Immunglobulin G   |
| <b>IHC</b>                           | Immunhistochemie  |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>        | Interleukin 1 $\beta$   |
| <b>KCl</b>                           | Kaliumchlorid   |
| <b>MCAo</b>                          | Okklusion der mittleren zerebralen Arterie ( <i>middle cerebral artery occlusion</i> )              |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b>              | Magnesiumchlorid  |
| <b>NaCl</b>                          | Natriumchlorid  |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>             | Natriumhydrogencarbonat   |
| <b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | Natriumdihydrogenphosphat   |
| <b>NeuN</b>                          | <i>neuronal nuclei</i>  |
| <b>NF<math>\kappa</math>B</b>        | Nuklärer Faktor kappa B ( <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> ) |
| <b>NGF</b>                           | Nervenwachstums Faktor ( <i>nerve growth factor</i> )   |
| <b>NGS</b>                           | Ziegenserum ( <i>normal goat serum</i> )  |
| <b>NMDA</b>                          | N-Methyl-D-Aspartat ( <i>N-methyl-D-aspartic acid</i> )   |
| <b>NO</b>                            | Stickstoffmonoxid   |
| <b>NPC</b>                           | neurale Vorläuferzellen ( <i>neural Progenitor cells</i> )  |
| <b>OGD</b>                           | Oxygen-Glucose-Deprivation  |
| <b>PAGE</b>                          | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| <b>PBS</b>                           | Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )                                 |
| <b>PCR</b>                           | Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )                                      |
| <b>Pen/Strep</b>                     | Penizillin/Streptomycin-Lösung  |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>ROI</b>   | <i>region of interest</i>   |
| <b>RMS</b>   | rostraler migratorischer Strom  |
| <b>RT</b>    | Raumtemperatur  |
| <b>rt-PA</b> | <i>recombinant tissue plasminogen activator</i>                                       |
| <b>SDS</b>   | Natriumdodezylsulfat  |
| <b>SSC</b>   | Standard Saline Zitrat ( <i>Standard Saline Citrate</i> )                             |
| <b>SVZ</b>   | Subventrikuläre Zone  |
| <b>TBS-T</b> | Tris-gepufferte Saline mit Tween20 ( <i>tris-buffered saline tween20</i> )            |
| <b>TAE</b>   | Tris/Acetat/EDTA-Puffer   |
| <b>TAT</b>   | Transkriptions Transaktivator des HI-Virus ( <i>transactivator of transcription</i> ) |
| <b>TEMED</b> | N,N,N,N-Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin   |
| <b>TNF</b>   | Tumor Nekrose Faktor  |
| <b>Tris</b>  | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethansulfonsäure  |
| <b>ZNS</b>   | zentrales Nervensystem  |

## 3. Einleitung

### 3.1. Zerebrale Ischämie

#### 3.1.1. Klinische Aspekte

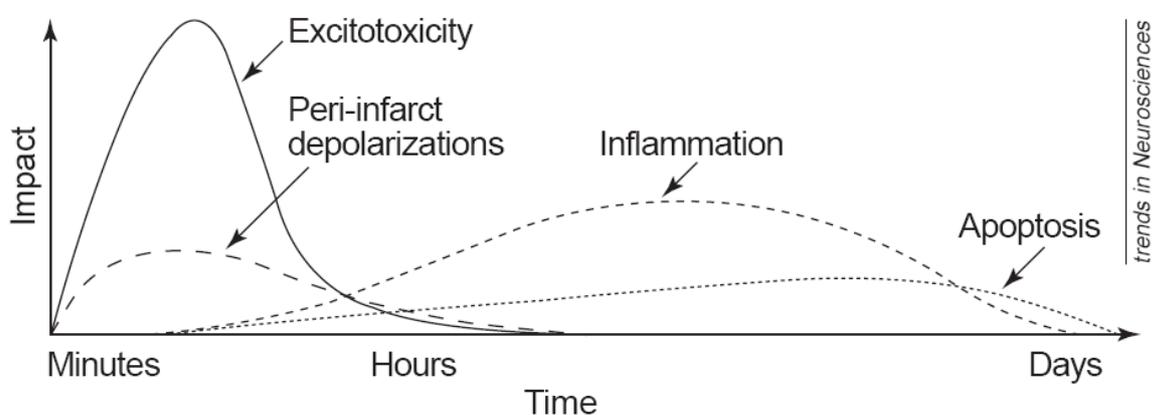
Die Inzidenz des akuten Schlaganfall beträgt in Deutschland ungefähr 200-300/100.00 Einwohner. Nach Herzerkrankungen und Krebsleiden ist er die dritthäufigste Todesursache und die häufigste Ursache für eine Langzeitbehinderung. Der Schlaganfall führt zu einem plötzlichen regionalen Mangel an Sauerstoff und energiereichen Phosphaten im Hirngewebe und geht mit einem irreversiblen Untergang von neuralem Gewebe einher. Grundsätzlich lassen sich zwei verschiedene pathophysiologische Entitäten des Schlaganfalls ableiten. In ca. 85% aller Schlaganfälle handelt es sich um einen so genannten ischämischen Hirninfarkt, der als Folge einer primären Minderperfusion des (peri-)neuronalen Gewebes – typischerweise auf dem Boden eines lokalen Gefäßthrombus bzw. embolus – auftritt. Hingegen lassen sich ca. 15% der Schlaganfälle als hämorrhagische Infarkte klassifizieren, welche auf so unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen wie beispielsweise eine primäre intrazerebrale Blutung, Subarachnoidalblutung oder Sinusvenenthrombose zurückgeführt werden können.

Akute therapeutische Strategien des ischämischen Schlaganfalls (zerebrale Ischämie), welcher Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, fußen derzeit auf zwei Säulen. Es sind dies zum einen der Versuch einer direkten Neuroprotektion und -regeneration des ischämischen Gewebes und zum anderen die unverzügliche Rekanalisation des okkludierten Gefäßes. Neuroprotektive und -regenerative Ansätze haben gegenwärtig noch einen experimentellen Charakter, und die Mehrzahl der bisher am Tiermodell erfolgreich durchgeführten Studien ließ sich nicht auf den Menschen übertragen [Alonso de Lecinana et al. 2005]. Die daher zur Zeit einzige verfügbare, kausale Therapie des ischämischen Schlaganfalls ist die unverzügliche Rekanalisation mit Hilfe von „recombinant tissue plasminogen activator“ (rt-PA) innerhalb eines definierten Zeitfensters von 3 bzw. 4½ h [Hacke et al., 2005 ; Broderick et al., 2002]. Jedoch profitieren nur ca. 3 Prozent aller Patienten von dieser Therapie, sei es aufgrund einer verspäteten Klinikeinweisung außerhalb

des Zeitfensters oder dem Vorliegen von Kontraindikationen [Rogalewski et al., 2006]. Weitere Studien der komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge des ischämischen Schlaganfalls sind daher nötig mit dem Ziel, neue therapeutische Strategien zu entwickeln.

### 3.1.2. Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Die nach einer zerebralen Ischämie auftretenden Schädigungen des Hirngewebes sind eine Folge komplexer pathophysiologischer Vorgänge, deren Verständnis in den letzten Jahren mit Hilfe zahlreicher *in vitro* und *in vivo* Modellsysteme entscheidend ergänzt werden konnte. Zu den relevanten Schädigungsmechanismen während und nach einer zerebralen Ischämie gehören die Exzitotoxizität, spontane Depolarisationen in der Peripherie des Infarktareals (Peri-Infarkt-Depolarisationen), die Inhibierung der Proteinsynthese, lokale Entzündungsreaktionen und der programmierte Zelltod (Apoptose). Diese Schädigungsmechanismen werden im Anschluss einzeln erläutert, obwohl sie nicht als isolierte sondern vielmehr als miteinander interagierende Mechanismen zu betrachten sind (Abb. 1).



**Abb. 1: Zeitliche Abfolge der pathophysiologischen Ereignisse nach zerebraler Ischämie.** Sehr früh nach einem fokalen Perfusionsdefizit kommt es durch Exzitotoxizität und Peri-Infarkt-Depolarisationen zu einem irreversiblen Untergang von Neuronen und Gliazellen. Im weiteren Verlauf kommt es nach Aktivierung von Mikroglia zu einer inflammatorischen Reaktion des Gewebes sowie dem Eintritt von initial subletal geschädigten Zellen in den apoptotischen Zelltod. Abbildung entnommen aus Dirnagl et al. (1999).

### **3.1.2.1. Zusammenbruch des zellulären Energiestoffwechsels und Produktion toxischer Zellmetabolite (Exzitotoxizität)**

Im Gegensatz zu den meisten anderen Geweben des Körpers beziehen Nervenzellen ihre Energie fast ausschließlich über den Stoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung, wohingegen die anaerobe Glykolyse zur Deckung des neuronalen Energiebedarfs nur eine äußerst geringe Rolle spielt. In Folge eines unterbrochenen zerebralen Blutflusses (CBF) kommt es in dem betroffenen Hirnareal zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff und Glukose. Ein anhaltender Abfall des CBF auf unter 20% des Normalwertes im Infarktzentrum führt zu einer irreversiblen Schädigung des zellulären Energiestoffwechsels. Bereits 4 Minuten nach einer kompletten globalen zerebralen Ischämie sind nahezu alle ATP-Reserven des Gehirns aufgebraucht [Krause et al., 1988]. Dies führt zunächst zu einem Funktionsverlust energieabhängiger Ionenpumpen mit dem Zusammenbruch der intra-/extrazellulären Ionengradienten und des Ruhemembranpotentials mit der Folge einer anoxischen Depolarisation von Neuronen und Gliazellen [Martin et al., 1994; Katsura et al., 1994]. Als Konsequenz dessen kommt es zu einer Aktivierung spannungs-abhängiger Kalziumkanäle mit einem sekundären Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  und einer Freisetzung exzitatorisch wirkender Aminosäuren, wie z.B. Glutamat, im synaptischen Spalt. Die Ansammlung exzitatorischer Aminosäuren im Extrazellularraum geht mit einer massiven Aktivierung ionotroper (NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren) und metabotroper Glutamatrezeptoren einher und führt zu einer sekundären Verstärkung des  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^{+}$  -Einstrom nach intrazellulär [Park et al., 1988; Lee et al., 1999]. Diese als Exzitotoxizität bezeichnete Schadenskaskade führt vor allem über die Generierung zelltoxischer Metabolite ( $\text{NO}$ , freie Sauerstoff-Radikale, Peroxynitrit) und die Zerstörung des Zytoskeletts zum Zusammenbruch des neuronalen Energiestoffwechsels mit sich anschließendem Verlust der Membranintegrität und damit zum nekrotischen Zelltod.

### **3.1.2.2. Peri-Infarkt-Depolarisationen**

Im Kerngebiet des ischämischen Infarktes kommt es aufgrund massiver Glutamat- und Kaliumfreisetzungen zu einer dauerhaften, sogenannten anoxischen

Depolarisation, da die Zellen im Infarktkern aufgrund des gestörten Energiestoffwechsels nicht in der Lage sind zu repolarisieren. Im Gegensatz dazu besitzen Zellen im Randgebiet des Infarktes, der Penumbra, aufgrund einer erhaltenen basalen Restperfusion des Gewebes, die Fähigkeit zu einer partialen Repolarisation. In Folge dessen sind die Zellen zu repetitiven De- und Repolarisationen in der Lage, welches zu einer zusätzlichen sekundären Erhöhung des Energiebedarfs führt. Die Häufigkeit dieser so genannten Peri-Infarkt-Depolarisationen korreliert dabei mit der Ausdehnung des Infarktareals [Mies et al., 1993]. Obwohl das Auftreten von Peri-Infarkt-Depolarisationen im Tierversuchsmodell wiederholt gezeigt werden konnte, so ist deren Existenz im Menschen noch nicht abschließend geklärt [Back et al., 2000].

### **3.1.2.3. Postischämische Inflammation**

In den ersten Minuten und Stunden nach einer zerebralen Ischämie sind neuronale und gliale Zellschädigung bzw. Zelltod fast ausschließlich Folge exzitotoxischer Ereignisse. Infolge dessen kommt es zur Induktion zusätzlicher Schadenskaskaden, die im weiteren Verlauf zur Ausdehnung des Infarktareals beitragen. Dazu gehören auch postischämische Entzündungsreaktionen, die u.a. über die von geschädigten Neuronen und Gliazellen exprimierten Mediatoren  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  vermittelt werden. Deren Synthese resultiert aus der Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise  $\text{NF}\kappa\text{B}$  [O'Neill et al., 1997], interferon regulatory factor-1 [Iadecola et al., 1999] und  $\text{STAT3}$  [Planas et al., 1996]. Deren Expression wird wiederum durch die als Folge exzitotoxischer Zellschädigung vermehrte Freisetzung freier Sauerstoffradikale und die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Aktivierung intrazellulärer second-messenger Systeme getriggert. Durch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie beispielsweise dem intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und verschiedenen Selectinen auf den Endothelzellen [Lindsberg et al., 1991; Haring et al., 1996; Zhang et al., 1998] nach Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  kommt es zu einer Diapedese von neutrophilen Granulozyten in das Hirngewebe. Über ähnliche Mechanismen folgen Monozyten und Makrophagen, deren Migration zum geschädigten Hirngewebe über die Expression von Chemokinen wie beispielsweise Interleukin-8 und monocyte chemoattractant protein-1 gesteuert wird. Auch Mikrogliazellen sind als hirneigene Zellen an den inflammatorischen Prozessen nach

einer zerebralen Ischämie beteiligt. Aktivierte Mikrogliazellen verschlimmern die postischämische Gewebeschädigung durch die Expression von Neurotoxinen (z.B. NO), reaktiven Sauerstoffmetaboliten und toxischen Prostanoiden. Des Weiteren spielt neben einer weiteren Reduktion der postischämischen Mikrozirkulation durch massenhaftes Einwandern neutrophiler Granulozyten [Del Zoppo et al., 1991] auch die gesteigerte Expression toxischer Entzündungsmediatoren wie beispielsweise der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch infiltrierende neutrophile Granulozyten, welche wiederum zur zellschädigenden Überproduktion von NO führt, eine für die Ausdehnung des Gewebeschadens wichtige Rolle [Forster et al., 1999].

#### **3.1.2.4. Postischämische Reperfusionsschäden**

Einen weiteren Schädigungsmechanismus stellt die nach spontaner oder therapeutischer Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes auftretende Reperfusionsschädigung dar. Diese Reperfusion trägt aber unter Umständen zur Ausweitung der Ischämie bedingten Gewebeschädigung bei. Die als wichtige zelluläre Schädigungsmechanismen der zerebralen Ischämie beschriebene Generierung freier Sauerstoffradikale (z.B.  $O_2^-$ ) und verstärkte Peroxynitrit-Produktion mit anschließender Lipidperoxidation und Membranschädigung werden durch eine Reperfusion eines über mehrere Minuten beträchtlichen ischämischen Hirnareals mit einer Perfusion von weniger als 20% des Normalwertes noch deutlich verstärkt [White et al., 2000]. Dieses auch als Reperfusionsschaden bezeichnete Phänomen führt trotz wiederhergestellter Energiezufuhr zu verstärktem Zelltod. Die erhöhte Empfindlichkeit der Neuronen gegenüber  $O_2$ -Radikalen wird sowohl über eine Defizienz des Enzyms Glutathionperoxidase als auch über eine verstärkte Freisetzung von Eisenionen durch benachbarte Zellen erklärt [Ushijima et al., 1986; Krause et al., 1987]. Die Akkumulation von Produkten der Lipidperoxidation in diesen Neuronen während der Reperfusion konnte mehrfach nachgewiesen werden [White et al., 1993; Hall et al., 1997; Yoshino et al., 1997]. Darüber hinaus wurde in den letzten Jahren wiederholt gezeigt, dass die Reperfusion des ehemals verschlossenen Gefäßes auch mit einer Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese einhergeht. Die Initiierung der Translation wird als komplexer Vorgang durch eukariontische Initiationsfaktoren (eIFs) gesteuert [White et al., 2000; DeGracia et al., 2002]. Eine Modifizierung dieser Faktoren verhindert während der frühen Reperfusion die Bildung

des Translations-Initiationskomplexes und damit die Proteinsynthese. Beispiele für diese Modifizierung finden sich u.a. in der Phosphorylierung einer Untereinheit des eIF2 durch eine aktivierte Kinase des endoplasmatischen Retikulums (PERK) [Pain, 1996; DeGracia et al., 2002] und der Calpain- oder Caspase-3 vermittelte Proteolyse von eIF4G [Neumar et al., 1998; DeGracia et al., 2002].

### **3.1.2.5 Programmierter Zelltod (Apoptose)**

Die Ergebnisse einer Vielzahl experimenteller Schlaganfallstudien der letzten Jahre führten zu dem Schluss, dass ein apoptotischer Zelltod zur Gewebeschädigung als Folge einer zerebralen Ischämie beiträgt. Die Form des Zelltodes einer Nervenzelle wird dabei durch Faktoren wie Dauer und Schwere der Ischämie sowie dem Differenzierungsgrad der betroffenen Zelle bestimmt [Leist et al., 1998]. Während nach einem permanenten oder lang andauerndem Gefäßverschluss mit ausgeprägter Minderperfusion des betroffenen Hirngewebes überwiegend ein nekrotischer Zelltod zur Gewebeschädigung führt, kommt es zumindest in tierexperimentellen Schlaganfallmodellen bei milderer Noxen mit kürzeren Ischämiezeiten und guter Reperfusion vor allem in der Penumbra überwiegend zum apoptotischen Zelltod [Li et al., 1995; Du et al., 1996; Dirnagl et al., 1999; MacManus et al., 2000]. Aufgrund der Tatsache, dass beide Formen des Zelltodes durch ein und den selben Stimulus, z.B. Glutamattoxizität, ausgelöst werden können und nach einer zerebralen Ischämie in verschiedenen Regionen (Infarktkern versus Penumbra) parallel auftreten, wird in der Literatur zunehmend von einem Apoptose-Nekrose Kontinuum gesprochen [Graham et al., 2001].

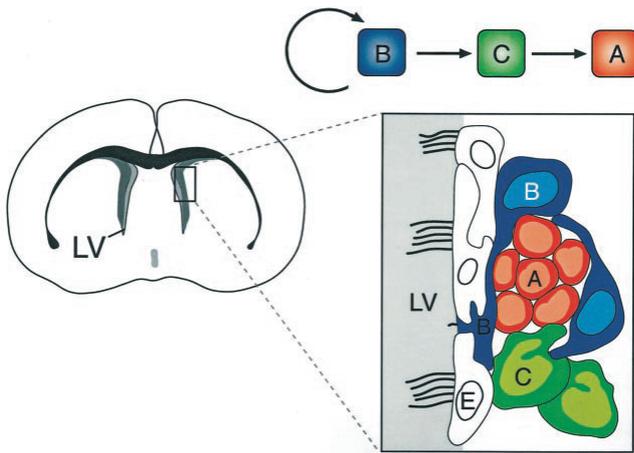
Als Vermittler des apoptotischen Zelltods spielen unter anderem die so genannten Caspasen, eine Gruppe von wenigstens 14 Cystein-Proteasen eine entscheidende Rolle [Thornberry et al., 2000; MacManus et al., 2000]. Von besonderer Bedeutung scheinen hierbei die Caspasen 1, 2, 3, 8 und 9 zu sein. Die Aktivierung der Caspasen kann grundsätzlich über zwei unterschiedliche Wege erfolgen. Bei der sogenannten rezeptorvermittelten oder extrinsischen Aktivierung kommt es durch Bindung eines Liganden (z.B. FAS-Ligand, TNF $\alpha$ ) an bestimmte membranständige Rezeptoren wie den FAS-, TNF- oder TRAIL- (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) Rezeptor zu einer Aktivierung von Caspase 8 und weiterer

intrazellulärer, apoptoseauslösender Signalkaskaden [Nagata et al., 1995; Hu et al., 1999].

Die rezeptorunabhängige oder intrinsische Aktivierung wird ausgelöst durch die Schädigung der inneren Mitochondrienmembran mit erhöhter Membranpermeabilität, als Folge von ATP-Defizienz, erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, anhaltende Zelldepolarisation und Azidose [MacManus et al., 2000; White et al., 2000]. Dies hat den Übertritt von Cytochrom C und pro-Caspase-9 in das Zytoplasma zur Folge, wo nach Komplexbildung mit APAF-1 (apoptosis-activating factor-1) über die Bildung eines sogenannten Apoptosoms aktivierte Caspase-9 freigesetzt wird [Cain et al., 2000]. Aktivierte Caspase-9 dient dann wiederum als Aktivator der Effektor-Caspasen 3,6 und 7, deren Aktivierung führt zu einer Degradation wichtiger Strukturproteine (z.B. Laminin, Actin, Fodrin) und DNA-Reparaturenzyme (z.B. PARP) sowie einer endonukleasenvermittelten DNA-Fragmentierung zum apoptotischen Zelltod führt.

### **3.2. Endogene Neurogenese des adulten ZNS**

Kein geringerer als Ramon y Cajal selbst begründete in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts die These, dass das adulte zentrale Nervensystem keinerlei regenerative Fähigkeiten nach Abschluss der Organogenese besitze [y Cajal, 1928]. Jedoch konnten Altman und Das bereits in den 1960-er Jahren zeigen, dass eine Neurogenese auch in umschriebenen Regionen des adulten Nagerhirns stattfindet [Altman und Das, 1965]. Erst dreißig Jahre später wurde dieses Phänomen der endogenen Regeneration von Nervenzellen im Gehirn adulter Säuger, nicht zuletzt bedingt durch die zunehmende Bedeutung der neurodegenerativen Erkrankungen, Ziel neuer Untersuchungen [Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Luskin, 1993; Menezes et al., 1995]. Diese zeigten, dass unter physiologischen Bedingungen eine endogene Neurogenese in wenigstens zwei unterschiedlichen Regionen des adulten ZNS stattfindet. Es sind dies die subventrikuläre Zone (SVZ; Abb. 2) der Seitenventrikel und die subgranuläre Zone des Gyrus dentatus (DG).



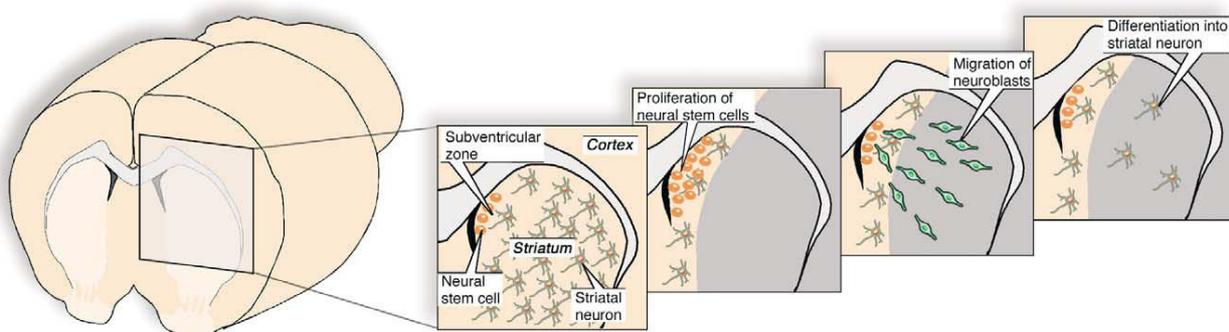
**Abb. 2: Organisation der SVZ.** Junge neuronale Zellen (A) bilden kettenartige Strukturen, die von astrozytären B-Zellen (blau) umhüllt werden. Assoziiert an die A Zellen sind hoch proliferative C-Zellen (grün). Die ependymalen Zellen (E) separieren die SVZ von den lateralen Ventrikeln (LV). Es wird angenommen, dass die B-Zellen ständig C-Zellen generieren, aus denen dann A-Zellen hervorgehen. modifiziert nach [Alvarez-Buylla et al., 2002 ]

Innerhalb der SVZ werden drei verschiedene Zelltypen unterschieden [Alvarez-Buylla et al., 2002 ]. Die primären neuronalen Progenitorzellen (NPC), auch als B-Zellen bezeichnet, besitzen strukturelle und funktionelle Merkmale von Astrozyten. Aus diesen gehen schnell proliferierende C-Zellen hervor, welche wiederum die so genannten A-Zellen (Neuroblasten) generieren. So entstandene Neuroblasten migrieren in langen röhrenartigen von Astrozyten umhüllten Strukturen, entlang des rostralen Migrationspfades (RMS) zum Bulbus olfactorius, wo sie zu muren Neuronen ausdifferenzieren [Garcia-Verdugo et al., 1998].

Wie eingangs bereits erwähnt lässt sich auch im Gyrus dentatus der Hippokampusformation, welcher eine entscheidende Rolle im Rahmen von Lern- und Gedächtnisprozessen zugeschrieben wird, eine endogene Neurogenese beobachten. Während der pränatalen Entwicklung des Hippokampus kommt es zur Entstehung einer sekundären Keimzone zwischen dem Hilus und der granulären Zellschicht, der sog. subgranulären Zone [Altman et al., 1990]. Von hier aus migrieren die neurale Vorläuferzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften lokal in den Gyrus dentatus, um dort zu muren Nerven ausdifferenzieren [Cameron et al., 1993]. Nur etwa 50% der neu gebildeten Vorläuferzellen überleben hierbei. Von diesen migrieren ca. 30% in die Körnerzellschicht, wovon wiederum sich etwa 50% schließlich zu Neuronen ausdifferenzieren. Nur 5-10% der neu gebildeten Zellen tragen somit netto zur adulten Neurogenese bei [Duman et al., 2001]. 1-3% der Progenitorzellen differenzieren hingegen zu Astrozyten. Die verbleibenden Zellen sind bis heute keinem entsprechenden Zelltyp zugeordnet worden.

### 3.3. Ischämieinduzierte Aktivierung der endogenen Neurogenese

Beinahe alle Formen von Hirnverletzungen steigern die Neurogenese im DG und der SVZ. So zeigten Jin et al. [2001] nach transienter und Zhang et al. [2001] nach permanenter fokaler Ischämie eine gesteigerte Neurogenese in der SVZ, die nach sieben Tagen ihr Maximum erreicht. In der ipsilateral zum Infarkt gelegenen SVZ scheint die Bildung neuer Zellen sogar noch erhöht [Arvidsson et al., 2002; Parent et al. 2002]. Es wurde außerdem eine starke Assoziation zwischen erhöhter Neurogenese und dem Zellersatz im verletzten Striatum beobachtet. Die neugebildeten Neuroblasten wandern dabei kettenartig, d.h. in Gruppen aus mehreren Zellen ins Schädigungsgebiet ein und reifen dort zu striatalen Neuronen aus [Arvidsson et al., 2002; Parent et al. 2002]. Obwohl einige der neugebildeten striatalen Neurone bis zu 6 Wochen nach MCAO überleben, sterben 80% von ihnen im Zeitraum von 2 bis 6 Wochen nach Ischämie wieder ab [Arvidsson et al., 2002]. Der Anteil an toten striatalen Neuronen, die durch neugebildete Neurone ersetzt werden, ist somit verschwindend gering und beträgt nur etwa 0,2%.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Neurogenese im Striatum nach zerebraler Ischämie.** Nach einer fokalen zerebralen Ischämie kommt es zu einem Verlust an striatalen und kortikalen Neuronen, dies führt zu einer vermehrten Proliferation der sich in der SVZ befindenden NPC, die als Neuroblasten ins geschädigte Gewebe migrieren und dort zu Neuronen ausdifferenzieren. aus [Kokaia et al., 2003]

Auch bei der globalen Ischämie konnte gezeigt werden, dass endogene Stammzellen in der Lage sind, die geschädigte Pyramidenzellschicht in der CA1-Region des Hippokampus teilweise zu regenerieren [Nakatomi et al., 2002; Schmidt et al.; 2002]. Die intraventrikuläre Applikation von FGF-2 und EGF innerhalb der ersten Tage nach

globaler Ischämie führte zu einer 40 %igen Regeneration der CA1-Pyramidenzellen nach 4 Wochen. Nakatomi et al. [2002] beschreiben weiterhin den posterioren Periventrikel als Herkunftsort der neugebildeten Pyramidenzellen, die nach Schädigung in die CA1-Region migrieren und sich dort zu elektrophysiologisch funktionsfähigen maturaen Neuronen entwickeln.

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Untersuchungen, dass endogene Vorläuferzellen zu einer partiellen neuronalen Regeneration in der Lage sind. Jedoch ist die Zahl dieser neu gebildeten Zellen äußerst gering, und eine differenzierte Therapie mit dem Ziel eines selektiven „Zellpoolings“ (z.B. durch Wachstumsfaktoren) erscheint bislang nicht ausreichend für eine vollständige Reparatur des geschädigten Areals [Parent et al., 1997; Baldauf et al., 2005].

### **3.4. Verwendung exogener Stammzellen als neuronale Zellersatz-Therapie**

Da die endogene Neurogenese funktionell von geringerer Bedeutung ist, rückte in den letzten Jahren zunehmend die Transplantation embryonaler und vor allem aber auch adulter Stammzellen als therapeutischer Ansatz in den wissenschaftlichen Fokus. So konnte die Behandlung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen bisher nur symptomatisch erfolgen. Dies könnte sich jedoch in Zukunft durch den Einsatz von Stammzellen ändern. Im folgenden Abschnitt soll nun eine kurze Übersicht über den Einsatz von Stammzellen an zwei ausgewählten Beispielen für neurodegenerative Erkrankungen des ZNS gegeben werden. Seit einigen Jahren wird die Transplantation von Stammzellen zur Behandlung von Morbus Parkinson und Amyotropher Lateralsklerose (ALS) durchgeführt. Morbus Parkinson ist eine progressive Erkrankung, die zur Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra führt. Die gegenwärtig angewandten Medikamente lindern nur eine die typischen Symptome der Krankheit, bekämpfen aber nicht ihre eigentliche Ursache. Die Zellsubstitution mit Hilfe von Stammzellen wird schon seit einigen Jahren am Tiermodell untersucht und wurde auch schon am Patienten getestet. Bereits Ende der 70er Jahre wurde erstmals von einer funktionellen Erholung im Tiermodell der Ratte berichtet. Nachdem solide Gewebsanteile aus dem fötalen ventralen Mesencephalon von Rattenembryonen in das geschädigte Striatum appliziert wurden, konnte eine Reinnervation des Striatums und eine verbesserte motorische Leistung der Tiere beobachtet werden [Björklund et al., 1979; Perlow et

al., 1979]. Während der letzten Jahre konnten wiederholt positive Effekte von Stammzell-Transplantation im Tiermodell gezeigt werden, so dass diese Therapie auch auf den Menschen übertragen wurde [Barker et al., 2004]. Die gegenwärtige Studienlage hierzu ist nach wie vor heterogen. Während initiale Arbeiten eine gesteigerte Dopaminsekretion transplanteder Zellen und somit einhergehend eine Reduktion klinischer Beschwerden zeigen [Piccini et al., 1999; Freeman et al., 1995; Kordower et al., 1995; Sawle et al., 1992], konnte Olanow et al. [2003] in einer Studie keine Verbesserungen nach Transplantation fötaler Zellen aus dem ventralen Mesencephalon vorweisen. Hinzu kommt, dass mutmaßlich nur etwa 5% der fötalen dopaminergen Neurone nach Transplantation überlebensfähig sind [Lindvall, 1994]. Patienten, die älter als 60 Jahre waren und einen Großteil des Patientenguts beim Morbus Parkinson darstellen, hatten keinerlei Nutzen von dieser Art der Therapie [Freed et al., 2001].

Die ALS ist eine chronische Erkrankung, die über eine Degeneration des ersten und zweiten Motorneurons im Gehirn bzw. Rückenmark zu einer progredienten Lähmung der Muskulatur unaufhaltsam durch Induktion einer respiratorischen Insuffizienz zum Tode führt. Eine Behandlung mit Medikamenten kann das Leben der Patienten zwar verlängern, jedoch die Krankheit nicht aufhalten. Eine auf Stammzellen basierende Therapie stellt daher eine interessante Möglichkeit für den Zellersatz bei ALS dar und wird bereits präklinisch und klinisch untersucht. Erste klinische Transplantationen an Patienten mit ALS wurden in den Jahren 2001 und 2003 durchgeführt [Janson et al., 2001; Mazzini et al.; 2003]. Während Janson et al. nach intrazerebroventrikulärer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen in drei ALS-Patienten keine funktionelle Verbesserungen beobachten konnten, berichten Mazzini et al. von einer verlangsamten Abnahme der Muskelkraft in den unteren Extremitäten bei vier von sieben Patienten nach Transplantation von mesenchymalen Stammzellen. Bei zwei Patienten wurde sogar eine geringfügige Zunahme der Muskelkraft beobachtet.

Der zusammenfassende Überblick demonstriert zwar, dass die Transplantation exogener Stammzellen als Zellersatzmöglichkeit, in den letzten Jahren Fortschritte gemacht hat, jedoch sind weitere Untersuchungen nötig, um eine auf den Menschen anwendbare und effektive Therapie zu entwickeln.

### 3.5. Einsatz exogener adulter neuraler Vorläuferzellen nach zerebraler Ischämie

Im Gegensatz zu z.B. Morbus Parkinson, bei dem eine verhältnismäßig homogene Population von Neuronen geschädigt wird, kommt es bei einem Schlaganfall zum Absterben einer Vielzahl verschiedener Zell-Phänotypen: Oligodendrozyten, Astrozyten und Endothelzellen in unterschiedlichen Hirnregionen. Bisher wurden auf der Suche nach einer geeigneten Zellart, die in der Lage ist ein geschädigtes Netzwerk zu rekonstruieren und läsionsbedingte Verhaltensdefizite zu mindern, eine Reihe verschiedenster Stammzelltypen getestet. Wie u.a. fötale Rattenzellen [Kelly et al., 2004; Mattsson et al., 1997; Grabowski et al., 1992], neurale Stammzellen der Maus [Modo et al., 2002; Veizovic et al., 2001], NT2- Zellen [Saporta et al., 1999; Borlongan et al., 1998], immortalisierte Zellen des Kleinhirns [Snyder et al., 1997], humane Nabelschnurblutzellen [Vendrame et al., 2004; Chen et al., 2001], hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark der Maus [Schwartz et al., 2008] sowie Progenitorzellen aus der SVZ der Ratte [Zhang et al., 2003]. NT2-Zellen wurden sogar bereits in klinischen Versuchen am Menschen getestet und führten zu motorischen Verhaltensverbesserungen [Kondziolka et al., 2000].

Bei einer regenerativen Zelltherapie sollten Zellen zum Einsatz kommen, die ein Minimum an Differenzierungsplastizität zeigen und in Neurone und Gliazellen differenzieren – eine Voraussetzung, die von adulten neuralen Vorläuferzellen erfüllt wird. Des Weiteren wird durch den Einsatz von adulten Vorläuferzellen auch die ethische Kontroverse, die bei einer Verwendung von embryonalen Stammzellen ein wichtiges Thema ist, vermieden. Durch die charakteristische Eigenschaft von embryonalen Stammzellen in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren besteht vor allem die Gefahr der Bildung von Tumoren (Teratome), die im Zusammenhang mit der Transplantation von embryonalen Stammzellen bei immundefizienten Mäusen beobachtet wurde [Thomson et al., 1998]. Eine solche Teratombildung wurde beim Einsatz von adulten NPC bisher nicht festgestellt.

Die Attraktivität von adulten NPC ergibt sich aus ihrer unbegrenzten Proliferationsfähigkeit und guten Kultivierbarkeit sowie ihrer Potenz, in alle Zelltypen des Gehirns auszudifferenzieren. Die Ausdifferenzierbarkeit in neurale Subtypen konnte *in vitro* und *in vivo* mehrfach belegt werden [Alvarez-Buylla et al., 1995; Cattaneo et al., 1990]. Diese hohe Differenzierungsplastizität der NPC ist essentiell für deren Integration in das ischämisch geschädigte Gewebe.

NPC sind in der Lage in Anwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF sich selbst zu erneuern [Craig et al., 1996, Gritti et al., 1999]. In Kultur bilden sie dreidimensionale, rundliche, sphärische Aggregate, die als Neurosphären bezeichnet werden [Bez et al., 2003]. Der Entzug der Wachstumsfaktoren oder aber auch die Zugabe von Serum in das Kulturmedium führt zu einem Ausdifferenzieren dieser Zellen in Astrozyten, Oligodendrozyten und auch in Neuronen [Doetsch et al., 1999; Kilpatrick et al., 1993]. Diese kultivierten NPC wurden bisher in nur wenigen experimentellen Studien nach zerebraler Ischämie eingesetzt [Zhang et al., 2003; Hicks et al., 2008]. Zhang et al. [2003] beschrieb eine Migration der transplantierten Zellen in Richtung des ischämischen Schadens, sowie einer Differenzierung in Neuronen, die sich im Empfängerhirn integrierten. Dennoch ist das Hauptproblem bei der Transplantation von NPCs in das ischämische Hirngewebe deren bis dato stark limitiertes Überleben nach Transplantation und eine damit verbundene unzureichende neuronale und gliale Differenzierung im Läsionsareal dar [Svendsen et al., 1996]. So waren zwei Monate nach Transplantation 99% der applizierten NPC abgestorben [Hicks et al., 2008].

### **3.6. Experimentelle Ansätze zur Resistenzerhöhung transplanteder NPC**

Aufgrund der ungenügenden Überlebensrate transplanteder NPC wurden in zahlreichen Untersuchungen verschiedene Versuchsansätze entwickelt, um deren therapeutisches Potential zu steigern. Hierzu wurde der protektive Effekt, der durch Sekretion bestimmter Faktoren ins geschädigte Gewebe mittels der applizierten NPC hervorgerufen wurde [Capone et al., 2007] zu Hilfe genommen. Verschiedene Arbeitsgruppen versuchten diese protektive Wirkung zu steigern, indem sie NPC über verschiedene Wege, wie z.B. durch genetische Veränderung oder die Einschleusung von viralen Vektoren, so zu modifizierten, dass die Zellen in der Lage waren einzelne Faktoren, wie z.B. die Wachstumsfaktoren GDNF [Kameda et al., 2007] oder NGF [Andsberg et al., 1998] vermehrt zu exprimieren, bevor die Zellen nach zerebraler Ischämie transplanteder wurden. Hier beobachtete man eine Abnahme des Infarktolumens im Vergleich zu nicht behandelten Tieren. Jedoch ist dieser Effekt unzureichend, da wie oben bereits beschrieben die längerfristige Überlebensrate der NPC äußerst gering ist und somit die Wirkung zeitlich begrenzt ist.

### 3.7. Das antiapoptotische TAT-Fusionsprotein TAT-Bcl-x<sub>L</sub>

Ein interessanter Ansatz ist die Applikation von antiapoptotischen Proteinen wie z.B. Bcl-x<sub>L</sub> zur Verbesserung des Überlebens transplantiert NPC. Das Protein Bcl-x<sub>L</sub> spielt bei der Modulation und Inhibierung des apoptotischen Zelltodes eine wichtige Rolle. Proteine der Bcl-2 Familie, zu dem das 28 kD große, sich an der Mitochondrienmembran befindende Protein Bcl-x<sub>L</sub> zählt, können im Rahmen der intrinsischen Aktivierung hemmend oder verstärkend auf apoptotische Mechanismen einwirken. So verhindern die Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> den Austritt von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum und stabilisieren damit die Mitochondrienmembran, was wiederum den Austritt von Cytochrom C verhindert [Lam et al., 1994]. Entsprechend ihrer physiologischen Funktion führen Überexpression, Gendeletion oder Antagonisierung dieser Moleküle durch transgene Mäuse oder ein Fremdprotein exprimierende Viruspartikel, Knock-out Mäuse und Einsatz kurzer Nukleinsäurefragmente (Antisense-Oligonukleotide) zu einer Verminderung oder Verstärkung der ischämischen Gewebeschädigung. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von Bcl-2 in transgenen Mäusen [Martinou et al., 1994] und von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> mittels viraler Vektoren [Linnik et al., 1995; Lawrence et al., 1997; Wiessner et al., 1999] zu einer Reduktion der Infarktgröße nach fokaler zerebraler Ischämie führt.

Jedoch erfordert die Einschleusung eines therapeutischen Reagenz durch eine biologische Membran einige Voraussetzungen, die nicht immer gegeben sind. So genannte „protein transduction domains“ (PTD), wie z.B. das Protein „transactivator of transkription“ (TAT) des HI-Virus bieten die Möglichkeit diese Probleme zu umgehen [Dietz et al., 2004; Fischer et al., 2005]. Dieses aus 101 Aminosäuren bestehende Protein des HIV-1 ist nötig für die Replikation des Virus. Es ermöglicht die Verbreitung des HI-Virus im infizierten Organismus [Izmailova et al., 2003] und führt zum Absterben von nicht-infizierten T-Helferzellen [Yang et al., 2003]. Das Protein besteht aus fünf Domänen, wovon die vierte Domäne, die aus der basischen Sequenz RKKRRQRRR besteht [Jeang et al., 1999], wichtig für die Transduktion ist. Die erstmalige Verwendung des HIV TAT-Proteins als Transportprotein durch die Membran ist 1988 erfolgt [Frankel et al., 1988; Green et al., 1988]. Seitdem gab es multiple Anwendungen, auch als Fusionsproteine, die in der Lage waren die Blut-Hirn-Schranke zu durchqueren [Schwarze et al., 1999].

Unter *in vitro* Bedingungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem Fusionsprotein TAT-Bcl-x<sub>L</sub> zu einer höheren Resistenz von kultivierten Neuronen gegenüber einer durch Kalium- und Serumdeprivation induzierten Apoptose führt [Dietz et al., 2002] und auch primäre kortikale Neuronen zeigten nach einem durch Staurosporin induzierten Zelltod ein höheres Überleben [Cao et al., 2002]. Auch *in vivo* konnte eine TAT-Bcl-x<sub>L</sub> vermittelte Neuroprotektion in so verschiedenen Modellen wie dem MPTP-Parkinson-Modell [Dietz et al., 2008] und dem Experimentelle Autoimmune Enzephalitis (EAE) Modell der multiplen Sklerose [Diem et al., 2005] gezeigt werden.

Wie in der von unserer Arbeitsgruppe kürzlich veröffentlichten Studie gezeigt werden konnte, führt die systemische Applikation des Fusionsproteins TAT-Bcl-x<sub>L</sub> nach zerebraler Ischämie zu einem signifikanten Überleben endogener Vorläuferzellen [Doepfner et al., 2009]. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde in der vorliegenden Arbeit das anti-apoptotisch wirkende Protein TAT-Bcl-x<sub>L</sub> verwendet mit dem Ziel, das Überleben transplanteder NPC nach zerebraler Ischämie zu verbessern.

## 4. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung TAT-Bcl-x<sub>L</sub> vermittelter Effekte hinsichtlich Überleben und Differenzierung neuraler Vorläuferzellen nach Hypoxie- bzw. Ischämieinduktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Zunächst wurde *in vitro* der Frage nachgegangen, inwiefern die Behandlung mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> zu einer erhöhten Resistenz kultivierter NPC gegenüber einer hypoxisch-hypoglykämischen Noxe führt.

Außerdem wurde die Hypothese überprüft, ob die *in vitro* Transduktion von NPC mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> zu einer erhöhten Überlebensrate dieser Zellen nach Transplantation in das ischämische Striatum von C57BL/6N Mäusen führt. Es wurden Überleben, Migration und Differenzierung transduzierter Zellen im Vergleich zu unbehandelten/nativen Zellen immunhistochemisch untersucht. Des Weiteren wurden Effekte transduzierter/nativer NPC auf die post-ischämische endogene Neurogenese des adulten Nagerhirns untersucht.

Abschließend sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit die Behandlung mit nativen bzw. transduzierten NPC mit einer Neuroprotektion und einer Verminderung des funktionellen Defizits nach zerebraler Ischämie im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren einhergeht.

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Methoden

#### 5.1.1. Versuchstiere und Haltung

Alle Tierexperimente wurden gemäß der *European Communities Council Directive (86/609/EEC)* und gemäß den Richtlinien der Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

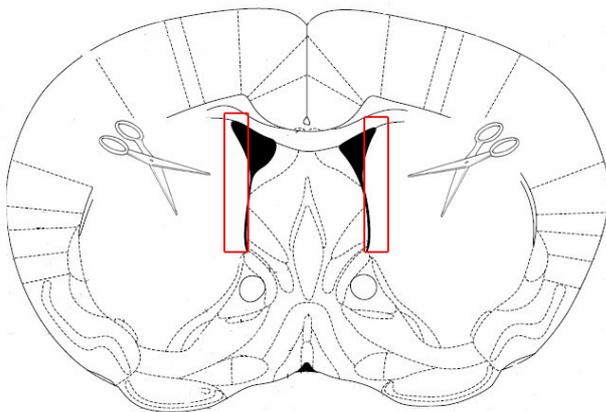
Die Induktion der transienten fokalen zerebralen Ischämie wurde an männlichen C57BL/6N Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland; 11-13 Wochen alt) durchgeführt. Zur Generierung von neuronalen Vorläuferzellen (NPC) wurden zum einen für *in vitro* Versuche 6-8 Wochen alte männliche C57BL/6N Mäuse (Charles River) sowie für *in vivo* Versuche transgene, GFP<sup>+</sup> Tiere (C57BL/6-Tg ACTB-EGFP, 10sb/J; JAX Laboratory, Bar Harbor, Maine; männlich, 6-8 Wochen alt) verwendet. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Tierlabor bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden und einer Raumtemperatur (RT) von 17-21 °C gehalten. Futter und Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

#### 5.1.2. Präparation und Kultivierung von NPC

NPC aus der Subventrikulärzone (SVZ) adulter Mäuse wurden nach einem modifizierten Protokoll von Rietze et al. [2006] präpariert und isoliert.

Die Tiere wurden mit einer Überdosis Isofluran schmerzlos getötet und anschließend dekapitiert. Das Gehirn wurde vorsichtig herauspräpariert und in kaltes, steriles PBS eingelegt. Sodann wurde das Gehirn in 2 mm dicke Scheiben geschnitten. Der SVZ-enthaltende Schnitt wurde in steriles PBS überführt und die SVZ beider Seiten (Abb. 4) unter mikroskopischer Kontrolle herausgetrennt und anschließend in ein Falcon-Röhrchen mit sterilem PBS (4°C) überführt. Pro Präparationsansatz wurden 4-5 Tiere verwendet. Die folgenden Schritte erfolgten zum Schutz vor Kontaminationen an einer Sterilbank. Zunächst wurde das PBS abgesaugt und die SVZ-Gewebestücke in vorgewärmtem Dissoziationsmedium resuspendiert und

anschließend bei 37°C im Wasserbad für 30 min inkubiert. Die Enzymreaktion wurde dann mit eiskalter Lösung #3 abgestoppt. Die Zellen und Gewebereste wurden durch einen 70 µm Filter filtriert, wobei das Gewebe mit dem Kolben einer 10 ml Spritze mechanisch durch das Netz gedrückt wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1500 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Pellet sorgfältig in eiskalter Lösung #2 resuspendiert und schließlich in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dieses wurde anschließend für 10 min bei 2000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt und das Pellet vorsichtig in eiskalter Lösung #3 resuspendiert und 7 min bei 1500 U/min und 4°C zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde dann der Überstand abgesaugt und das Pellet in frisch angesetzttem Neurosphärenmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und je 200.000-250.000 Zellen pro 35 mm-Schale ausgesät. Den Zellen wurden alle zwei Tage 2 µg/ml EGF und bFGF hinzugegeben.

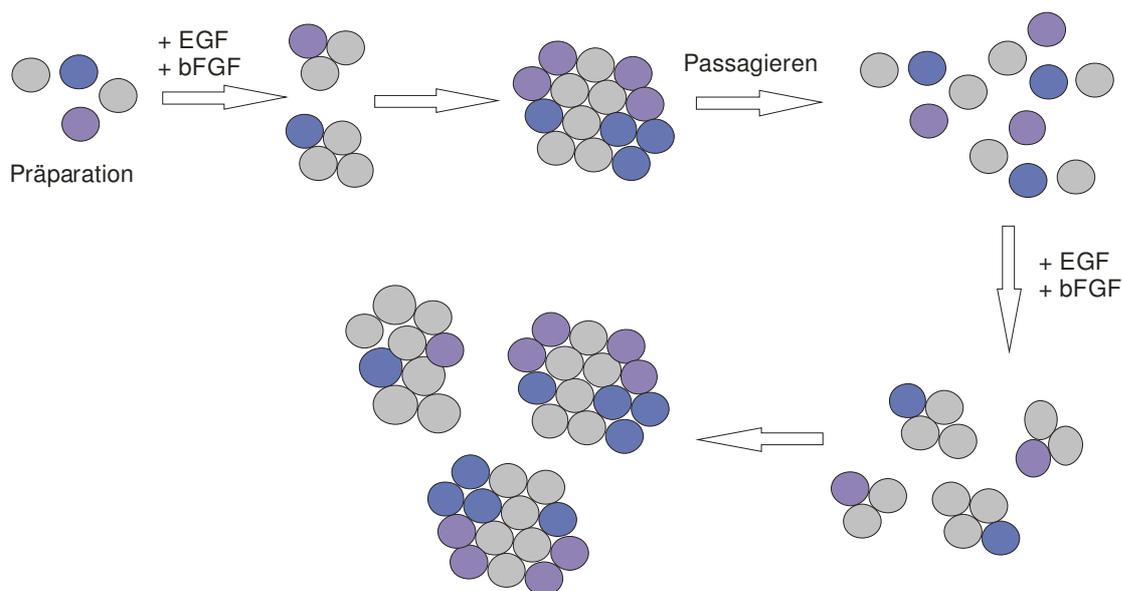


**Abb. 4: Schematische Darstellung der Subventrikulärzone mit Präparation von neuronalen Vorläuferzellen.** Der rot gekennzeichnete Bereich wurde ausgeschnitten, dissoziiert und anschließend die Einzelzell-Suspension in Kultur gegeben. (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2001)

### 5.1.3. Passagieren von Neurosphären

Durch Proliferation und Aggregation *in vitro* gehen aus den zuvor aus der SVZ isolierten NPC rundliche dreidimensionale Zellaggregate, sogenannte Neurosphären hervor [Bez et al., 2003]. Durch Passagieren werden die in diesem Zellverband liegenden NPC vereinzelt, anschließend wieder in Kultur gegeben, so dass wiederum neue Neurosphären entstehen (Abb. 5). Nach jeweils 7-10 Tagen wurden die

Neurosphären passagiert. Hierzu wurden die Neurosphären in einem Falcon-Röhrchen gesammelt und für 25 min zu Boden sinken gelassen. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und als konditioniertes Medium aufgehoben. Die Neurosphären wurden mit PBS gewaschen und bei 800 U/min für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in vorgewärmter Accutase-Lösung vorsichtig resuspendiert und bei 37°C im Wasserbad für 30-45 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit kalter Lösung #3 gestoppt und 7 min bei 800 U/min bei 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in frisch angesetzttem Neurosphärenmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde anschließend mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und je 200.000-250.000 Zellen pro 35 mm-Schale ausgesät, alle zwei Tage erfolgte der Zusatz von 2 µg/ml EGF und bFGF. Die NPC wurden nach Passage (P) 2-4 weiterverwendet.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Bildung von Neurosphären.** Nach der Präparation entstehen durch Proliferation und Aggregation einzelner Zellen oder Zellcluster durch Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF *in vitro* Neurosphären. Mittels Passagieren werden die einzelnen Zellen aus dem Neurosphärenverband enzymatisch gelöst und vereinzelt, anschließend wieder mit EGF und bFGF in Kultur gegeben. Aus den vereinzelteten Zellen entstehen wiederum durch Zugabe von EGF und bFGF sekundäre Neurosphären.

#### 5.1.4. Expression und Purifikation des rekombinanten Fusionsproteins TAT-Bcl-x<sub>L</sub>

Das Fusionsprotein aus der HIV Transduktions-Domäne (TAT) und des anti-apoptischen Proteins Bcl-x<sub>L</sub> (TAT-Bcl-x<sub>L</sub>) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Gunnar P. H. Dietz zur Verfügung gestellt.

Wie in Diem et al. (2005) beschrieben wurde zunächst durch PCR mit Hilfe der Primer 5'-cactgctcgagatgtctcagagcaaccgga-3' und 5'-cactggaattctcacttccgactgaagagtg-3' die Gehirn cDNA von C57BL/6J Mäusen amplifiziert. Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden in die *XhoI/EcoRI*-Restriktionsseiten eines TAT-HA Vektors kloniert. Die gesamte Expressionskassette beinhaltete jeweils die Sequenz für sechs Histidin-Reste. Schließlich erfolgte die Expression des rekombinanten Proteins in *E.coli*. Nach Lyse der Zellen wurde das Lysat in 8 M Harnstoff denaturiert bevor die Proteine durch Affinitätschromatographie aufgetrennt wurden. Die Identität der aufgereinigten Proteine wurde anschließend durch Western Blot bestätigt.

#### 5.1.5. Hypoxie-Hypoglykämie-Test (OGD)

Mit Hilfe des Hypoxie-Hypoglykämie-Tests (*Oxygen-Glucose-Deprivation*, OGD) werden Zellen durch einen kombinierten Sauerstoff-Glukose-Entzug geschädigt, wodurch *in vitro* die pathophysiologischen Vorgänge während einer zerebralen Ischämie imitiert werden können.

Um die protektive Wirkung von TAT-Bcl-x<sub>L</sub> auf NPC zu prüfen wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt. Zum einen wurden NPC für den Zeitraum von 4 h vor Beginn der OGD bis zum Ende der 24-stündigen „Reperusionszeit“ (normale Kulturbedingungen) mit dem Fusionsprotein inkubiert. Im zweiten Ansatz wurde TAT-Bcl-x<sub>L</sub> erst nach Beendigung der OGD hinzugegeben und anschließend ebenfalls unter Normalbedingungen für 24 h rekultiviert. In beiden Versuchsansätzen diente als Kontrollprotein TAT-HA.

Die passagierten Neurosphären wurden in glucosefreiem OGD-Medium resuspendiert und in einer 12-Well-Platte ausgesät. Je Versuchsbedingung wurde

entweder 1  $\mu\text{M}$  TAT-Bcl-x<sub>L</sub> oder als Negativ-Kontrolle 1  $\mu\text{M}$  TAT-HA hinzugegeben, einer weiteren Kontrolle wurde nichts weiter hinzugefügt. Anschließend wurde die 12-Well-Platte in einer hypoxischen Kammer (1% O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>) für 45 min inkubiert. Nach Ende der OGD wurde das glucosefreie Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in Neurosphärenmedium, dem dann wieder entweder 1  $\mu\text{M}$  TAT-Bcl-x<sub>L</sub> oder 1  $\mu\text{M}$  TAT-HA zugesetzt war, ausgesät. 24 h später wurde das Überleben der Zellen mit Hilfe eines LIVE/DEAD-Assays (Lonza; Basel, Schweiz) ausgewertet. In vitalen Zellen kommt es nach intrazellulärem Übertritt des nicht-fluoreszierenden, zellpermeablen Calcein AM (1  $\mu\text{M}$ ) durch Aktivierung intrazellulärer Esterasen zur Umwandlung von Calcein AM in das Fluorophor Calcein mit sekundärer Emission einer grünen Fluoreszenz. Hingegen kommt es in nicht vitalen Zellen aufgrund der verloren gegangenen Integrität der Plasmamembran zu einer DNA-Interkalation mit dem nicht-membranpermeablen EthD-1 (5  $\mu\text{M}$ ) und in Folge dessen zur Emission einer roten Fluoreszenz.

Am Fluoreszenzmikroskop wurden vitale und tote Zellen für alle Versuchsbedingungen ausgezählt. Dabei wurden die gefärbten Zellen je Bedingung auf fünf Objektträger gegeben. Am Fluoreszenzmikroskop wurden bei jedem Objektträger nach gleich bleibendem Schema 5 x 5 *Regions of Interest* (ROIs) definiert und die darin vorhandenen toten und lebenden Zellen ausgezählt. Aus den Werten wurden die Mittelwerte ermittelt und anschließend die jeweiligen prozentualen Anteile toter und vitaler Zellen berechnet.

#### **5.1.6. Intrazellulärer Nachweis von TAT-Bcl-x<sub>L</sub> in transduzierten NPC *in vitro***

Der Nachweis einer erfolgreichen Transduktion von kultivierten NPC mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> wurde mit Hilfe des Western Blot Verfahrens durchgeführt. Wie im ersten Versuchsansatz im OGD-Experiment wurden die NPC zunächst 4 h mit 1  $\mu\text{M}$  TAT-Bcl-x<sub>L</sub> inkubiert, als Kontrolle dienten Zellen die nicht mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellsuspensionen für 5 min bei 800 U/min (21°C) zentrifugiert, die Überstände entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (5 min, 800 U/min bei 21°C) wurde die Überstände abgenommen und anschließend die Zellpellets in je 500  $\mu\text{l}$  Lysepuffer

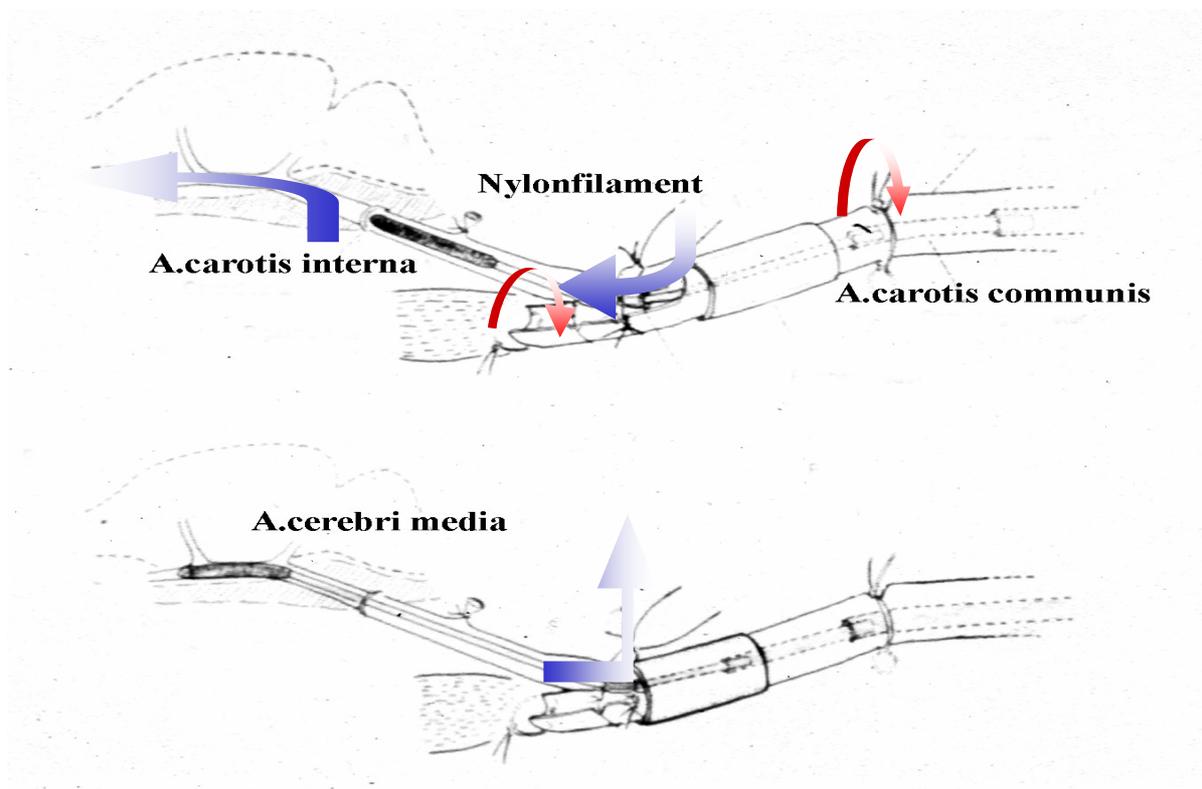
resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte dann für 30 min auf Eis. Die Zelllysate wurden aliquotiert (50 µl) und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Auftrennung der Proteine aus den Zelllysaten erfolgte über Gelelektrophorese. Hierzu wurden zunächst 25 µl jeder Probe mit 5 µl Ladepuffer für 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend auf ein 12% SDS-Gel, das mit einem 4 % SDS-Sammelgel überschichtet war aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 30 mA für etwa eine Stunde. Der anschließende Western Blot wurde gemäß den Herstellerangaben mit Hilfe des MiniProtean-Systems (Bio-Rad, München) ausgeführt. Dabei wurden die Proteine bei 100 V für eine Stunde bei 4 °C von dem SDS-Gel auf ein Nitrocellulosemembran (Whatmann, Dassel) transferiert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran für eine Stunde in 5% Milch in TBS-T inkubiert um Kreuzreaktionen des Antikörpers zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Anti-HA-Antikörper über Nacht bei 4 °C. Ungebundener Primärantikörper wurde durch Waschen der Membran mit TBS-T (3 x 5 min) und OKANO-Puffer (10 min) entfernt. Im nächsten Schritt wurde die Membran für 1 h bei RT mit einem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit TBS-T und Zugabe des Substrates für die Meerrettich-Peroxidase fand nun die Detektion des Antigen-Antikörper Konjugates mittels verstärkter Chemielumineszenz statt.

#### **5.1.7. Induktion einer transienten fokalen Ischämie der Maus**

Die Durchführung der Operation zur Induktion einer zerebralen Ischämie wurde von Herrn Dr. Thorsten R. Döppner ausgeführt. Hierbei wurde die Methode der Fadenokklusion der Arteria cerebri media (MCAO) angewendet. Das Versuchstier wurde durch eine Inhalationsnarkose bestehend aus Isofluran (1-1,5%), Distickstoffmonoxid (68,5-69%) und Sauerstoff (30%) betäubt und in Rückenlage fixiert. Als Kontrolle des Blutflusses diente die Laser-Doppler-Blutflussmessung. Zur Durchführung dieser wurde auf der linken Seite zwischen Mittellinie und linkem Ohr über der Schädelkalotte ein Schnitt durchgeführt und die Oberfläche der Schädelkalotte freipräpariert. Die Laser-Sonde wurde über dem Versorgungsgebiet

der linken Arteria cerebri media mit Hilfe eines Zweikomponentenklebers fixiert. Die Blutflussmessungen wurden während des gesamten Versuchs kontinuierlich angezeigt. Nach einem Schnitt im medianen Halsbereich wurde die linke Arteria carotis communis mit deren Aufzweigung in die Arteria carotis externa und interna freipräpariert. Die Arteriae carotis communis et externa wurden ligiert und die A. carotis interna mit Hilfe eines neurochirurgischen Clips (Aesculap, Deutschland) intermittierend verschlossen. Nach Inzision der A. carotis communis wurde der silikonbeschichtete Okklusionsfaden (Doccol, USA; Diameter 180-200  $\mu\text{m}$ ) eingeführt und der Clip entfernt. Der Okklusionsfaden wurde distal der Carotisauzweigung bis zur Abzweigung der A. cerebri media vorgeschoben (Abb. 6), bis ein Abfallen des initialen Dopplerflusssignals auf weniger als 30% des Ausgangswertes erreicht war. Nach 30 min wurde der Faden wieder herausgezogen, und für 10-15 min der Blutfluss und die Körpertemperatur mit Hilfe einer rektalen Sonde kontrolliert.

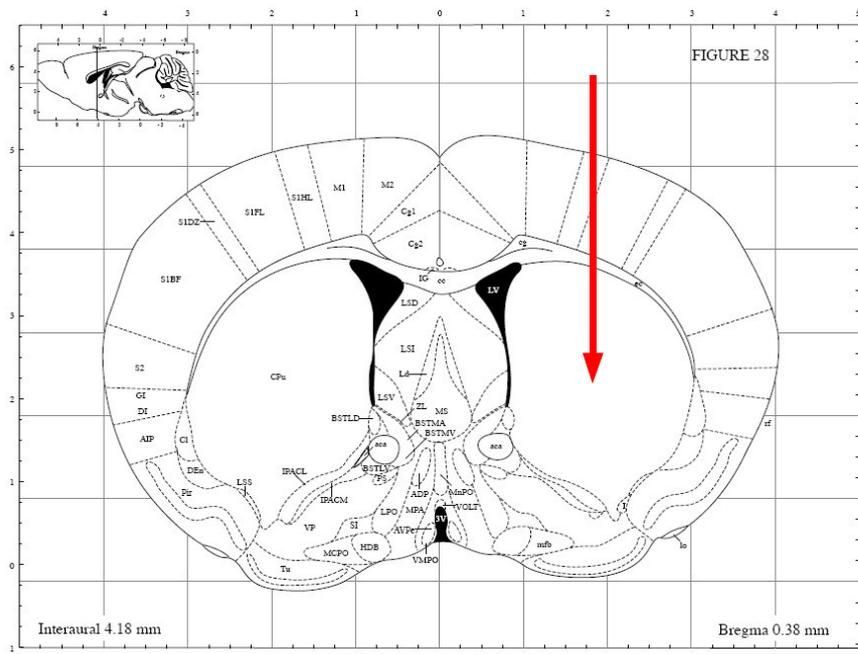


**Abb. 6: Fadenokklusionsmodell der transient zerebralen Ischämie.** Das Prinzip dieser Technik beruht in der intraluminalen transienten Okklusion des Blutflusses innerhalb der A. cerebri media (MCA). Dies wird erreicht, indem ein Nylonfaden nach Insertion in die linke A. carotis communis über die A. carotis interna bis in den proximalen Anteil der MCA nach

intrakraniell vorgeschoben wird. Die Blutzufuhr der MCA aus der A. carotis interna ist damit transient unterbrochen. Durch das Zurückziehen des Fadens wird die Reperfusion eingeleitet. Zur Kontrolle des intrazerebralen Blutflusses erfolgt während der gesamten Prozedur eine transkranielle Laser-Dopplerfluss-Messung über dem Stromgebiet der linken MCA.

#### **5.1.8. Stereotaktische intrastriatale Injektion von NPC**

Sieben Tage nach Induktion der zerebralen Ischämie wurden NPC stereotaktisch in das linke ischämische Striatum injiziert. Hierzu wurden Neurosphären nach P2-P4 passagiert und für die Versuchsgruppe der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelten NPC zunächst für 4 h mit 1 µM des Fusionsproteins inkubiert; nicht behandelte NPC wurden direkt nach der Passage injiziert. Die Narkose der Tiere erfolgte durch i. p. Injektion mit Ketamin (50 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (20 mg/kg Körpergewicht). Die Tiere wurden mit Hilfe einer stereotaktischen Apparatur fixiert, eine Hautinzision durchgeführt und Bregma freigelegt. Davon ausgehend wurde im Bereich der Injektionsstelle (AP +0,4 mm, ML -1,8 mm, DV -3,5 mm; s. Abb. 7) eine Bohrlochtrepantation mit Hilfe eines Diamantbohrers (Foredom, Colorado USA) durchgeführt. Die Injektion von 5 µl der Zellsuspension (100.000 Zellen/µl) erfolgte anhand einer Hamilton-Nadel (0,32 mm Diameter) mit einer Geschwindigkeit von 0,75 µl/min. Nach erfolgter Injektion wurde die Nadel zunächst für 5 min *in situ* belassen bevor sie wieder herausgezogen wurde.



**Abb. 7: Injektionslokalisierung transplanzierter NPC.** Die Transplantationsposition wurde so gewählt, dass NPC in die Mitte des ischämischen Striatums injiziert werden. (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2001).

### 5.1.9. Experimentelle Gruppen

Im Rahmen der Studie wurden drei Behandlungsgruppen mit je drei Überlebenszeitpunkten definiert. Diese waren wie folgt:

| PBS  | NPC nativ | NPC + TAT-Bcl-x <sub>L</sub> |
|------|-----------|------------------------------|
| 7 d  | 7 d       | 7 d                          |
| 14 d | 14 d      | 14 d                         |
| 28 d | 28 d      | 28 d                         |

Die stereotaktische Injektion erfolgte jeweils – wie oben bereits dargelegt – am Tag 7 nach zerebraler Ischämie. Pro Gruppe wurden n=5-7 Tiere verwendet.

### **5.1.10. Proliferationsanalysen mit Hilfe des Marker BrdU**

Zur weiteren Proliferationsanalyse sowohl der endogenen Neurogenese als auch exogen applizierter NPC wurde der Proliferationsmarker BrdU eingesetzt. BrdU wird als Thymidin Analogon während der semikonservativen Replikation in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut und kann mit Hilfe eines Antikörpers detektiert werden [Taupin, 2007]. Hierzu wurde den Tieren vom Tag 8 nach zerebraler Ischämie an bis zum jeweiligen Versuchsende BrdU in einer täglichen Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht i. p. appliziert.

### **5.1.11. Immunhistochemische Analysen**

Die durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten vollständig an Kryostatgeweben. Die Tiere wurden hierzu zu Versuchsende mit einer Überdosis einer 30%-igen Chloralhydrat-Lösung i. p. anästhesiert und zunächst mit 50 ml kaltem PBS, anschließend mit 50 ml kaltem 4%-igem Paraformaldehyd transkardial perfundiert. Dann wurde das Tier dekapitiert und das Gehirn entnommen. Perfusionsfixierte Gehirne wurden sofort nach der Entnahme nachfixiert. Hierzu wurden sie in 4% Paraformaldehyd-Lösung eingelegt und bei 4°C über Nacht fixiert. Sodann wurden die Gehirne in 30%iger Saccharoselösung bis zum Absinken auf den Gefäßboden bei 4°C gelagert. Die Gehirne wurden bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die PFA-fixierten und tiefgefrorenen Gehirne wurden mittels eines Kryostaten (Leica, Bensheim) geschnitten. Die Gehirne wurden mit Einbettmedium auf den Objekthalter aufgefroren und auf eine Dicke von 16 µm geschnitten (Objekttemperatur: -19°C; Kammertemperatur: -21°C). Die Schnitte wurden direkt auf Adhäsionsobjektträger aufgebracht. Nach dem Antrocknen der Schnitte auf den Objektträger bei RT wurden diese bei -80°C gelagert.

Zur Analyse des Differenzierungsgrades sowohl exogen applizierter GFP<sup>+</sup> NPC wie auch endogener proliferierender BrdU<sup>+</sup>-Zellen wurde eine Tripel-Färbung mit Antikörpern (AK) gegen GFP, den Proliferationsmarker BrdU und gegen den

jeweiligen Differenzierungsmarker der verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Als Marker für Neuronen wurde NeuN, für Oligodendrozyten CNPase, für Astrozyten GFAP und für neurale Vorläuferzellen Nestin verwendet. Die Differenzierung der transplantierten GFP<sup>+</sup>-Zellen in immature neuronale Zellen wurde anhand einer GFP/Dcx Färbung untersucht. Hierzu wurden zunächst die zuvor auf Objektträgern getrockneten Kryoschnitte in 0,2% Citratpuffer in einer Mikrowelle aufgekocht und anschließend für 1h mit NGS/TBS-T geblockt. Die Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern (siehe Tab.1) erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

**Tab. 1: Immunhistochemische Analysen.** Dargestellt sind die für die immunhistochemischen Analysen verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Verdünnungskonzentrationen.

| <i>Antikörper</i>                | <i>Verdünnung</i> | <i>Inkubation</i>  |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|
| <b>NeuN/GFP/BrdU</b>             |                   |                    |
| 1.Tag:                           |                   |                    |
| 1 NeuN-AK                        | 1:1000            | Über Nacht bei 4°C |
| 1 GFP-AK                         | 1:2500            | Über Nacht bei 4°C |
| 2.Tag:                           |                   |                    |
| 1 Ziege-Anti-Maus Cy3            | 1:100             | 1 h bei RT         |
| 1 Ziege-Anti-Kaninchen Alexa 488 | 1:1000            | 1 h bei RT         |
| 1 BrdU-AK                        | 1:400             | Über Nacht bei 4°C |
| 3.Tag:                           |                   |                    |
| 1 Ziege-Anti-Ratte Cy5           | 1:200             | 1 h bei RT         |
| <b>CNPase/GFP/BrdU</b>           |                   |                    |
| 1.Tag:                           |                   |                    |
| 1 CNPase-AK                      | 1:400             | Über Nacht bei 4°C |
| 1 GFP-AK                         | 1:2500            | Über Nacht bei 4°C |
| 2.Tag:                           |                   |                    |
| 1 Ziege-Anti-Maus Cy3            | 1:100             | 1 h bei RT         |

---

|                        |                                |        |                     |
|------------------------|--------------------------------|--------|---------------------|
| 1                      | Ziege-Anti-Kaninchen Alexa 488 | 1:1000 | 1 h bei RT          |
| 1                      | BrdU-AK                        | 1:400  | Über Nacht bei 4 °C |
| 3.Tag:                 |                                |        |                     |
| 1                      | Ziege-Anti-Ratte Cy5           | 1:200  | 1 h bei RT          |
| <b>Nestin/GFP/BrdU</b> |                                |        |                     |
| 1.Tag:                 |                                |        |                     |
| 1                      | Nestin-AK                      | 1:500  | Über Nacht bei 4 °C |
| 1                      | GFP-AK                         | 1:2500 | Über Nacht bei 4 °C |
| 2.Tag:                 |                                |        |                     |
| 1                      | Ziege-Anti-Maus Cy3            | 1:100  | 1 h bei RT          |
| 1                      | Ziege-Anti-Kaninchen Alexa 488 | 1:1000 | 1 h bei RT          |
| 1                      | BrdU-AK                        | 1:400  | Über Nacht bei 4 °C |
| 3.Tag:                 |                                |        |                     |
| 1                      | Ziege-Anti-Ratte Cy5           | 1:200  | 1 h bei RT          |
| <b>GFAP/GFP/BrdU</b>   |                                |        |                     |
| 1. Tag:                |                                |        |                     |
| 1                      | GFAP-AK                        | 1:500  | Über Nacht bei 4 °C |
| 1                      | GFP-AK                         | 1:2500 | Über Nacht bei 4 °C |
| 2.Tag:                 |                                |        |                     |
| 1                      | Ziege-Anti-Ratte Cy5           | 1:200  | 1 h bei RT          |
| 1                      | Ziege-Anti-Kaninchen Alexa 488 | 1:1000 | 1 h bei RT          |
| 1                      | BrdU-AK                        | 1:400  | Über Nacht bei 4 °C |
| 3.Tag:                 |                                |        |                     |
| 1                      | Ziege-Anti-Maus Cy3            | 1:250  | 1 h bei RT          |

---

Am nächsten Tag fand nach mehrmaligem Waschen mit PBS die Inkubation für 1h bei RT mit den jeweiligen Sekundärantikörpern statt. Um Kreuzreaktionen der einzelnen AK zu verhindern wurde in einem weiteren Schritt die Inkubation mit dem BrdU-Antikörper in der folgenden Nacht bei 4 °C durchgeführt. Anschließend erfolgte nach dem Waschen mit PBS die Inkubation des entsprechenden Sekundärantikörpers für 1h bei RT. Nach Beendigung des Färbeprotokolls wurden

die Zellkerne mit einer DAPI-Lösung angefärbt. Nach Abschluss der entsprechenden Färbungen wurden zur quantitativen Auswertung jene koronaren Schnitte ausgewählt und zur Auswertung verwertet, die sich im anterior-posterioren Bereich des Stichkanals der Injektion befanden, d. h. einem Bereich von +0,24 mm bis +0,56 mm von Bregma. Ausgewertet wurden die Schnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop (20x Objektiv; Zeiss, Jena). Hierzu wurden jeweils in der linken ischämischen Hemisphäre die Gesamtzahl der GFP<sup>+</sup>- und BrdU<sup>+</sup>-Zellen manuell ausgezählt. Ebenso wurde verfahren bei der Bestimmung von Ko-Lokalisationen von GFP oder BrdU mit den jeweiligen Markern für die verschiedenen Zelltypen. Auch hier wurde die Gesamtzahl bestimmt und anschließend der prozentuale Anteil der gesamten GFP<sup>+</sup>- bzw. BrdU<sup>+</sup>-Zellen berechnet.

#### **5.1.12. Analyse von postischämischer Zellschädigung und neuronaler Dichte**

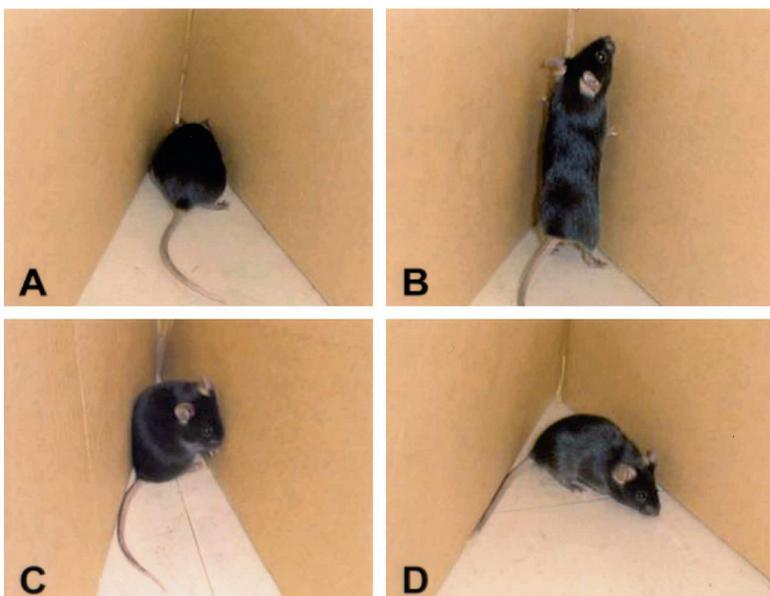
Postischämische Zellschädigungen wurden durch die TUNEL-Methode untersucht, hierbei kann mit Hilfe der terminalen Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) fragmentierte DNA in den Zellkernen dargestellt werden [Gavrieli, 1992]. Die TUNEL-Färbung erfolgte bei allen Gruppen 7 d nach stereotaktischer Injektion. Hierzu wurden zunächst die entsprechenden gefrorenen Objektträger getrocknet und mit EtOH:Eisessig nachfixiert, anschließend erfolgte eine Inkubation für 7 min bei 37°C mit Proteinase K. Danach wurden die Objektträger für 30 min bei RT in den TdT-Puffer gegeben, bevor die eigentliche Reaktion, die Übertragung von markierten Nukleotiden, in diesem Fall Biotin-dUTP, auf die freien 3'-OH-Gruppen fragmentierter DNA durch die TdT stattfand. Die Reaktion wurde mit SSC-Puffer abgestoppt und nach mehrmaligem Waschen mit PBS mit der Blocking Reagenz geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation für 2 h mit dem mit AlexaFluor594 konjugiertem Streptavidin und wurde am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Hierzu wurde die absolute Anzahl TUNEL<sup>+</sup>-Zellen in der linken ischämischen Hemisphäre bestimmt. Zur Bestimmung der neuronalen Dichte mit NeuN an Tag 28 nach stereotaktischer Injektion wurde wie oben angegeben die Färbung durchgeführt. Die Auswertung erfolgte dann am Fluoreszenzmikroskop, indem im Bereich des linken ischämischen Striatums 3 x 3 ROIs definiert wurden und die darin liegenden NeuN<sup>+</sup> Zellen

ausgezählt wurden. Ausgehend von diesen Werten wurde die Zahl pro mm<sup>2</sup> berechnet.

### 5.1.13. Analyse des postischämischen funktionellen Defizits

#### 5.1.13.1. Corner Turn Test

Zur Untersuchung des sensomotorischen Defizits nach einer zerebralen Ischämie wurde der Corner Turn Test verwendet. Dieser Test ist in der Lage auch geringe Schäden nach einer fokalen zerebralen Ischämie zu detektieren [Schallert, 2006]. Hierzu wurden die Tiere jeweils am Tag 7, 14, 21 und 28 nach stereotaktischer Injektion dem Test ausgesetzt. In zehn Durchgängen wird jedes Tier in die Versuchsanlage, bestehend aus zwei etwa 30 x 30 cm großen Platten, die in einem 30° Winkel aufgebaut sind (Abb. 8), platziert. Ein gesundes Tier läuft in die Ecke hinein und erhält einen sensorischen Reiz über die Schnurrhaare. Es folgt eine sekundäre motorische Antwort, und die Maus verlässt streng zufällig durch Links- oder Rechtsdrehung die Ecke. Eine transiente fokale zerebrale Ischämie führt zu einem ipsilateralen Verlassen der Ecke, d. h. bei einer linksseitigen Ischämie kommt es zu einer Präferenz der linksseitigen Drehung [Li, 2004; Zhang, 2002].



**Abb. 8: Analyse des sensomotorischen Defizits anhand des *Corner Turn Test*.** Die Maus wird in dem Versuchsaufbau mittig platziert und läuft in die Ecke hinein (A). Nach einem sensorischen Reiz dreht sich das Tier ipsilateral (hier rechts) zu der Schädigung (hier rechts) aus der Ecke (C) und läuft wieder heraus (D). [aus Zhang et al., 2002]

### **5.1.13.2. Morris Water Maze**

Als Verhaltenstest zur Untersuchung der kognitiven Fähigkeit (insbesondere Lernen und Gedächtnis) innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen wurde ein modifizierter „Morris Water Maze“ gewählt [Morris, 1984]. Dieser Test besteht aus einem runden, mit Wasser (20 °C) gefüllten Becken mit einem Durchmesser von 1 m und einer Höhe von 30 cm. In dem Becken befindet sich eine für die Maus nicht sichtbare Plexiglasplattform (11 x 11 cm; 1 cm unterhalb der Wasseroberfläche). Das Tier wurde an einer immer gleich bleibenden Stelle des Beckenrandes ins Wasser gelassen, und es wurde mit Hilfe eines computergesteuerten Systems (TSE Systems, Deutschland) die Zeit bis zum Erreichen der Plattform aufgezeichnet. Pro Durchgang musste die Plattform innerhalb von 90 sek erreicht werden. War die Plattform nach 90 sek. nicht erreicht, wurde das Tier manuell zur Plattform geleitet und dort für 30 sek belassen. Tiere, die die Plattform nicht erreicht haben, wurden als 90 sek. gewertet. Hierbei wurde jedes Tier am Tag 26 und 27 in jeweils vier Durchgängen am Morgen und am Abend getestet. Am Tag 28 fand in den ersten vier Durchgängen am Morgen ein so genannter „task-switch“ statt. Hierbei wurde die Plattform von der ursprünglichen Position entfernt und in einem anderen Quadranten des Beckens aufgestellt. In den darauf folgenden vier Durchgängen am Abend wurde die Plattform an die ursprüngliche Position wieder zurückgestellt.

### **5.1.14. Statistik**

Für die statistische Auswertung mittels One-Way-ANOVA-Test und anschließendem Bonferroni-Test wurde das Programm WinSTAT (Version 7.01.000) verwendet. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Als statistisch signifikant wurden  $p$ -Werte von  $\leq 0,05$  betrachtet.

## 5.2. Materialien

### 5.2.1. Chemikalien

|   |   |
|---|---|
| <b>Accutase</b>                                       | PAA, Pasching, Österreich   |
| <b>Acrylamid (40%) / 0,8% Bisacryl B27 Supplement</b> | Merck, Darmstadt, Deutschland<br>Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| <b>Biotin-16-dUTP</b>                                 | Roche, Mannheim, Deutschland  |
| <b>5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)</b>                  | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                               |
| <b>Bovines Serumalbumin (BSA)</b>                     | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                               |
| <b>Citronensäure-Monohydrat</b>                       | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                               |
| <b>di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat</b>            | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| <b>DMEM/Ham's F12</b>                                 | PAA, Pasching, Österreich   |
| <b>DNase</b>  | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                               |
| <b>Epidermal Growth Factor (EGF)</b>                  | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                                  |
| <b>Eselserum (Dks)</b>                                | PAA, Pasching, Österreich   |
| <b>Essigsäure / Eisessig</b>                          | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| <b>Ethanol (reinst)</b>                               | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| <b>Ethanol (vergällt)</b>                             | Chemie-Vertrieb Hannover, Deutschland                               |
| <b>Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)</b>          | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                                  |
| <b>Glucose 5%</b>                                     | B Braun, Melsungen, Deutschland                                     |
| <b>HBSS</b>   | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                                  |
| <b>HEPES 1M</b>                                       | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                                  |
| <b>Hyaluronidase</b>                                  | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                               |
| <b>Immersionsöl Immersol™ 518F</b>                    | Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland                                 |
| <b>Kaliumphosphat 99%</b>                             | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                               |
| <b>Kaliumchlorid</b>                                  | Merck, Darmstadt, Deutschland                                       |
| <b>Ketamin</b>  | Inresa, Freiburg, Deutschland                                       |
| <b>Kynurensäure</b>                                   | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland                               |
| <b>Mannitol</b>                                       | B Braun, Melsungen, Deutschland                                     |

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| <b>Methanol</b>                                     | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| <b>Natriumchlorid (fest)</b>                        | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| <b>Natriumchlorid 0,9 % (flüssig)</b>               | B Braun, Melsungen, Deutschland       |
| <b>Paraformaldehyd (PFA)</b>                        | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| <b>Penicillin/Streptomycin 100x<br/>(Pen/Strep)</b> | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland    |
| <b>Proteinase K</b>                                 | Qiagen, Hilden, Deutschland           |
| <b>Sterofundin</b>                                  | Braun, Melsungen, Deutschland         |
| <b>Stickstoff (Intern)</b>                          | (Universitätsmedizin Göttingen)       |
| <b>Teleostean Gelatine</b>                          | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| <b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan</b>              | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| <b>Triton X-100</b>                                 | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| <b>Trypsin</b>                                      | Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland |
| <b>TWEEN 20 (Polysorbat)</b>                        | Merck, Darmstadt, Deutschland         |
| <b>Xylazin 2%</b>                                   | Riemser, Greifswald, Deutschland      |
| <b>Ziegenserum (NGS)</b>                            | PAA, Pasching, Österreich             |

### 5.2.2. Verbrauchsmaterialien

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| <b>Reagiergefäße 0.5, 1.5 und 2 ml</b>   | Sarstedt, Nümbrecht              |
| <b>Tubes 15 ml, 50 ml</b>                | BD Falcon, Heidelberg            |
| <b>Pipettenspitzen</b>                   | Sarstedt, Nümbrecht              |
| <b>Zellkulturbedarf:</b>                 |                                  |
| <b>12- und 24-Well Platten</b>           | NUNC, Wiesbaden                  |
| <b>Petrischalen, 35 x 10 mm</b>          | BD Falcon, Heidelberg            |
| <b>Zellkulturschalen, 35 x 10 mm</b>     | BD Falcon, Heidelberg            |
| <b>Filter, 0.2 µm</b>                    | Sarstedt, Nümbrecht              |
| <b>Zellsieb, 70 µm Nylon</b>             | BD Falcon, Heidelberg            |
| <b>Pipetten 1, 5, 10, 25 ml</b>          | NUNC, Wiesbaden                  |
| <b>Sterilfilter Filtropur S, 0,20 µm</b> | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |

### 5.2.3. Primärantikörper

|  |  |
|--|--|
| Monoklonaler Antikörper Maus anti- <b>NeuN</b>     | Millipore, Massachusetts, USA              |
| Polyklonaler Antikörper Kaninchen anti- <b>GFP</b> | Abcam, Cambridge, UK                       |
| Monoklonaler Antikörper Maus anti- <b>CNPase</b>   | Millipore, Massachusetts, USA              |
| Monoklonaler Antikörper Maus anti- <b>Nestin</b>   | Millipore, Massachusetts, USA              |
| Monoklonaler Antikörper Ratte anti- <b>GFAP</b>    | Zymed, Kalifornien, USA                    |
| Polyklonaler Antikörper Ziege anti- <b>Dcx</b>     | Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA |
| Monoklonaler Antikörper Ratte anti- <b>BrdU</b>    | Abcam, Cambridge, UK                       |
| Monoklonaler Antikörper Maus-anti- <b>BrdU</b>     | Roche Diagnostics, Mannheim                |
| Monoklonaler Antikörper Maus-anti- <b>HA</b>       | Covance, Princeton, USA                    |

### 5.2.4. Sekundärantikörper

|   |       |                                      |
|---|-------|--------------------------------------|
| Alexa 488-konjugiertes anti-Ziege IgG     | Esel  | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland   |
| Cy3-konjugiertes anti-Kaninchen IgG       | Esel  | Jackson ImmunoResearch, Newmarket/UK |
| Cy3-konjugiertes anti-Maus IgG            | Ziege | Jackson ImmunoResearch, Newmarket/UK |
| Alexa 488-konjugiertes anti-Kaninchen IgG | Ziege | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland   |
| Cy5-konjugiertes anti-Ratte IgG           | Ziege | Abcam, Cambridge, UK                 |
| Peroxidase-konjugiertes anti-Maus IgG     | Ziege | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland   |
| Alexa 594-konjugiertes Streptavidin       |       | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland   |

### 5.2.5. Medien, Puffer und Lösungen

#### NPC -Präparation

|                     |                            |
|---------------------|----------------------------|
| Dissoziationsmedium | 13,3 mg Trypsin            |
|                     | 7 mg Hyaluronidase         |
|                     | 2 mg Kynurensäure          |
|                     | 200 µl DNase (10.000 U/ml) |
|                     | in 10 ml Lösung #1         |



1x TdT Puffer  
 500 mM Cacodylsäure Natriumsalz Monohydrat  
 1 mM CoCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM DTT  
 0,05% BSA

10x SSC (pH 7,0)  
 150 mM NaCl  
 300 mM NaCl  
 30 mM Natrium-Citrat

Blocking Reagenz  
 10% NGS  
 1% Teleostean Gelatine  
 0,3% Triton X-100  
 in PBS/ 1% BSA

### SDS-PAGE

Zell-Lysepuffer  
 50 mM Tris pH 8,0  
 150 mM NaCl  
 1% Triton

Sammelgel 4%  
 4 % (v/v) Acrylamid (40%) / 0,8% Bisacryl  
 25% (v/v) 0,5 M Tris (pH 6,8)  
 64% (v/v) dH<sub>2</sub>O  
 1% (v/v) APS (10%)  
 0,2% (v/v) TEMED

Trenngel 12 %  
 12% (v/v) Acrylamid (40%) / 0,8% Bisacryl  
 25% (v/v) 1,5 M Tris (pH 8,8)  
 45% (v/v) dH<sub>2</sub>O  
 6,6% (v/v) APS (10%)  
 1,3% (v/v) TEMED

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| Elektrophorese-Puffer (10x) | 250 mM<br>1,9 M Glycin<br>1,1% (v/v) SDS  |
| SDS-Sample Buffer (6x)      | 70% 4x Tris (pH 6,8)<br>30% (v/v) Glycerin<br>0,01% (v/v) SDS<br>600 mM DTT<br>8,33% (w/v) Bromphenolblau |

### Western Blot

|                          |  |
|--------------------------|--|
| Transfer-Puffer (pH 8,3) | 25 mM Tris<br>192 mM Glycin<br>20% Methanol                                    |
| TBS                      | 0,8% (w/v) NaCl<br>0,3% (w/v) Tris   |
| TBS-T                    | 0,01% (w/v) Tween 20 in TBS  |
| OKANO-Puffer (10x)       | 1 M Tris<br>1,9 M NaCl<br>0,5 M EDTA<br>5% (v/v) Triton X-100<br>10% (v/v) SDS |
| Blocklösung              | 5% Magermilchpulver in TBS-T   |

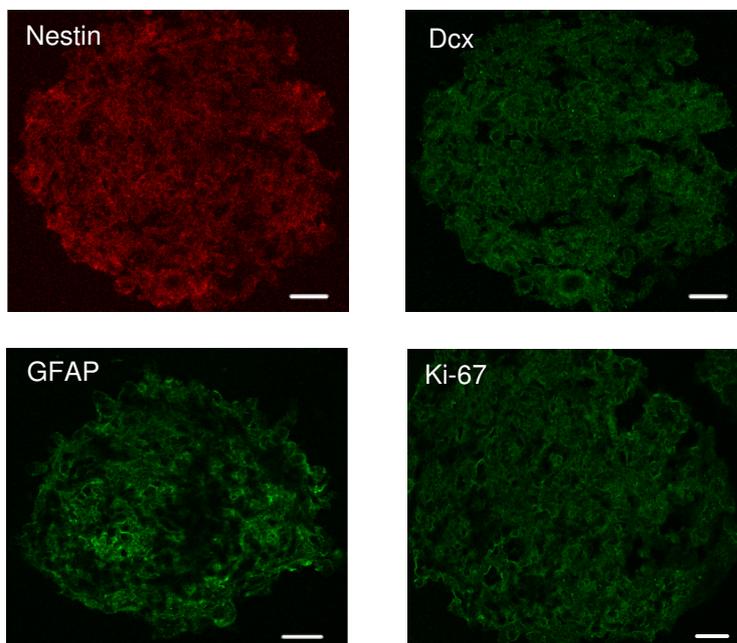
### **5.2.6. Geräte**

Soweit nicht anders angegeben, wurden Standardlaborgeräte der Firmen Biometra GmbH (Göttingen), Eppendorf (Hamburg), Heraeus (Hanau), Sartorius (Göttingen), Schütt (Göttingen), VWR (Darmstadt) und Zeiss (Jena) verwendet.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Differenzierungsgrad kultivierter NPC

NPC aus der subventrikulären Zone initiieren durch Proliferation und Aggregation in Kultur nach Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF die Generierung so genannter Neurosphären [Alvarez-Buylla et al., 1995]. Der Differenzierungsgrad dieser Neurosphären nach Passagierung (P0-P4) wurde nach Fixierung der Zellen immunhistochemisch auf verschiedene Marker untersucht. Während in allen Passagen keine neuronale (NeuN) respektive oligodendrozytäre (CNPase) Differenzierung detektierbar war, zeigten sich in den untersuchten Passagen die Neurosphären positiv für Nestin, den Marker für neurale Vorläuferzellen, Dcx (immature neuronale Zellen), GFAP (Astroglia) (Abb. 9) sowie den Proliferationsmarker Ki-67.

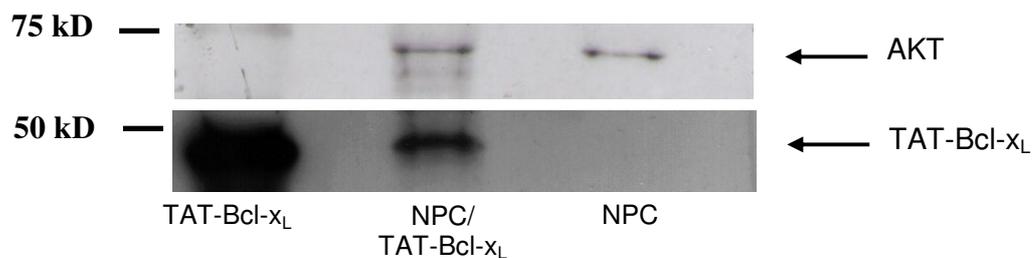


**Abb. 9: Differenzierungsgrad kultivierter Neurosphären.**

Kryoschnitte kultivierter Neurosphären (NPC) aus den Passagen 0-4 wurden immunhistochemisch gegen verschiedene Zellmarker gefärbt. Erkennbar ist, dass NPC positiv für den frühen neuronalen Marker Doublecortin (Dcx), für den astroglialen Marker GFAP und den Marker für neurale Vorläuferzellen (Nestin) sowie den Marker für proliferierende Zellen (Ki-67) sind. In der Abbildung dargestellt sind typische Beispiele aus verschiedenen Passagen. Skalierung 20  $\mu\text{m}$ .

## 6.2. Neuroprotektiver Effekt von TAT-Bcl-x<sub>L</sub> auf NPC *in vitro*

Unter *in vitro* Bedingungen sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern die Transduktion der NPC mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> zu einer erhöhten Resistenz dieser Zellen gegen hypoxisch-hypoglykämische Schädigungen führt. NPC wurden hierzu zunächst 4 h mit 1 µM TAT-Bcl-x<sub>L</sub> unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert und die Transduktionsrate mit Hilfe einer Western Blot Analyse gegen die Hämagglutinin-Sequenz (HA) des Fusionsproteins, die sich unter physiologischen Bedingungen in eukaryontischen Zellen nicht nachweisen lässt, überprüft (Abb. 10). Während in unbehandelten NPC HA nicht nachzuweisen war, konnte in den transduzierten NPC eine Bande auf Höhe des reinen TAT-Bcl-x<sub>L</sub> detektiert werden.

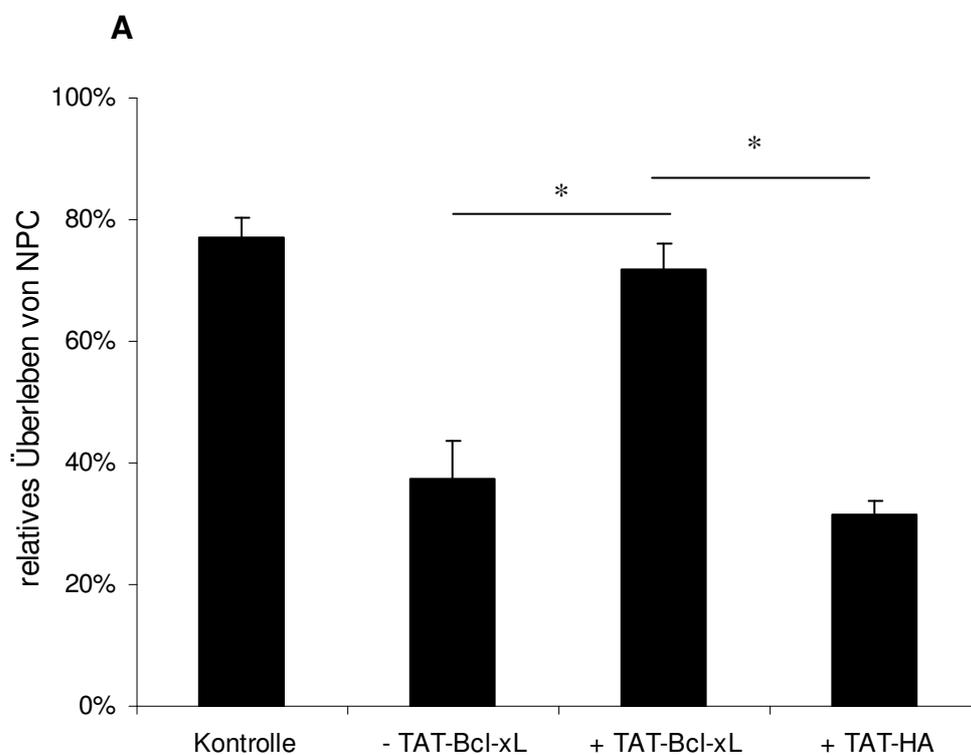


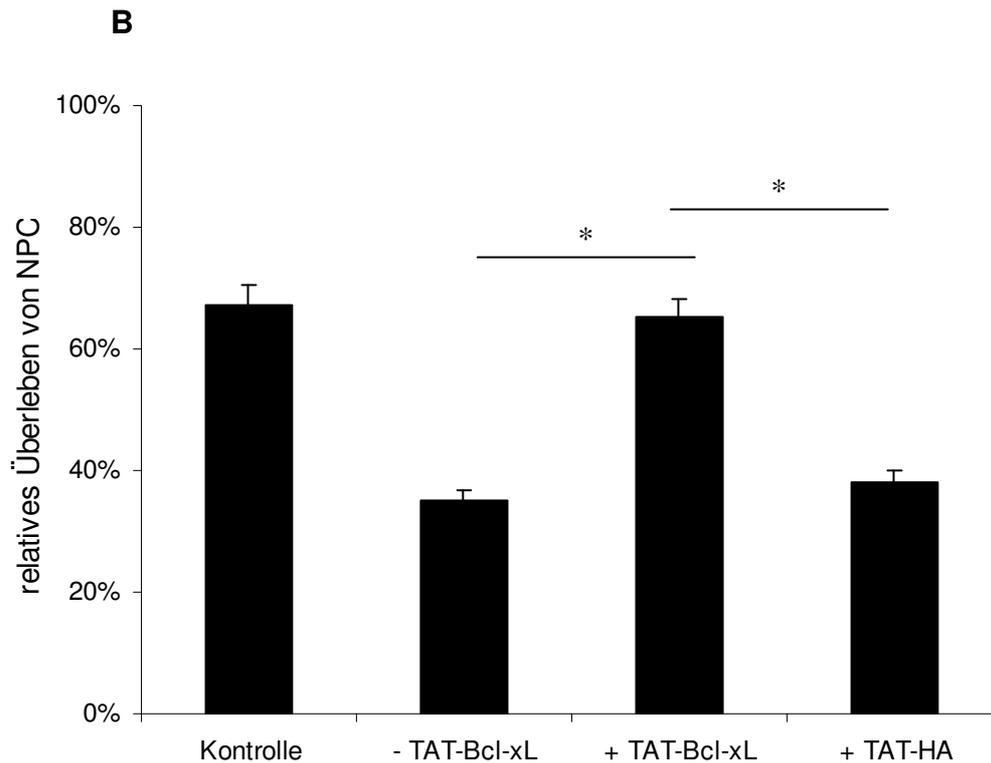
**Abb. 10: Nachweis von TAT-Bcl-x<sub>L</sub> in transduzierten NPC.** Die Western Blot-Analyse von NPC, die für 4 h mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> unter normalen Zellkulturbedingungen vorinkubiert wurden (NPC/TAT-Bcl-x<sub>L</sub>) und unbehandelten NPC wurde mit einem Antikörper gegen die Hämagglutininsequenz (HA) des Proteins durchgeführt; als Positiv-Kontrolle diente das reine Protein (TAT-Bcl-x<sub>L</sub>). Sowohl in der Positiv-Kontrolle als auch in den transduzierten NPC konnte TAT-Bcl-x<sub>L</sub> detektiert werden, während in den unbehandelten NPC das Protein nicht nachgewiesen werden konnte. Als Ladekontrolle diente Phosphokinase B (AKT).

Zur Induktion einer Hypoxie-Hypoglykämie wurden NPC für 45 min in einer luftdichten Kammer (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>; 37°C) inkubiert. Einige Zellen wurden bereits 4 h vor Beginn des OGD mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduziert (Abb. 11 A), während andere Zellen erst nach Ende der OGD mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelt wurden (Abb. 11 B). Als Kontrollen dienten nicht behandelte (-TAT-Bcl-x<sub>L</sub>), mit TAT-HA inkubierte (+ TAT-HA) wie auch unter normalen, d. h. unter nicht hypoxisch-hypoglykämischen Bedingungen inkubierte Zellen. Nach Durchführung des OGD wurden die Zellen für

24 h unter normalen Zellkulturbedingungen rekultiviert und das Ausmaß der Zellschädigung mit Hilfe eines auf Fluoreszenzfarbstoffen basierenden LIVE/DEAD-Assays analysiert. Die Überlebensrate der mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-transduzierten NPC war mit 71,9% vergleichbar mit der Überlebensrate jener NPC, die unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert wurden (Kontrolle 77,0%). Hingegen wiesen NPC, denen entweder TAT-HA bzw. nichts hinzugesetzt wurde, eine Überlebensrate von 31,6% bzw. 37,2% aufwiesen. Somit konnte ein signifikanter Unterschied zwischen TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-behandelten und unbehandelten bzw. TAT-HA-behandelten NPC festgestellt werden.

Im zweiten Versuchsansatz wurden die NPC zunächst 45 min einer OGD ausgesetzt und erst danach während der „Reperusionszeit“ (der Kultivierung unter Normalbedingungen) von 24 h mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> bzw. TAT-HA behandelt und anschließend mit dem LIVE/DEAD Assay ausgewertet. Auch in diesem Fall war ein signifikanter Unterschied zwischen TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-transduzierten NPC (65,1%) und unbehandelten NPC (34,9%) bzw. TAT-HA behandelten NPC (37,9%) zu erkennen.



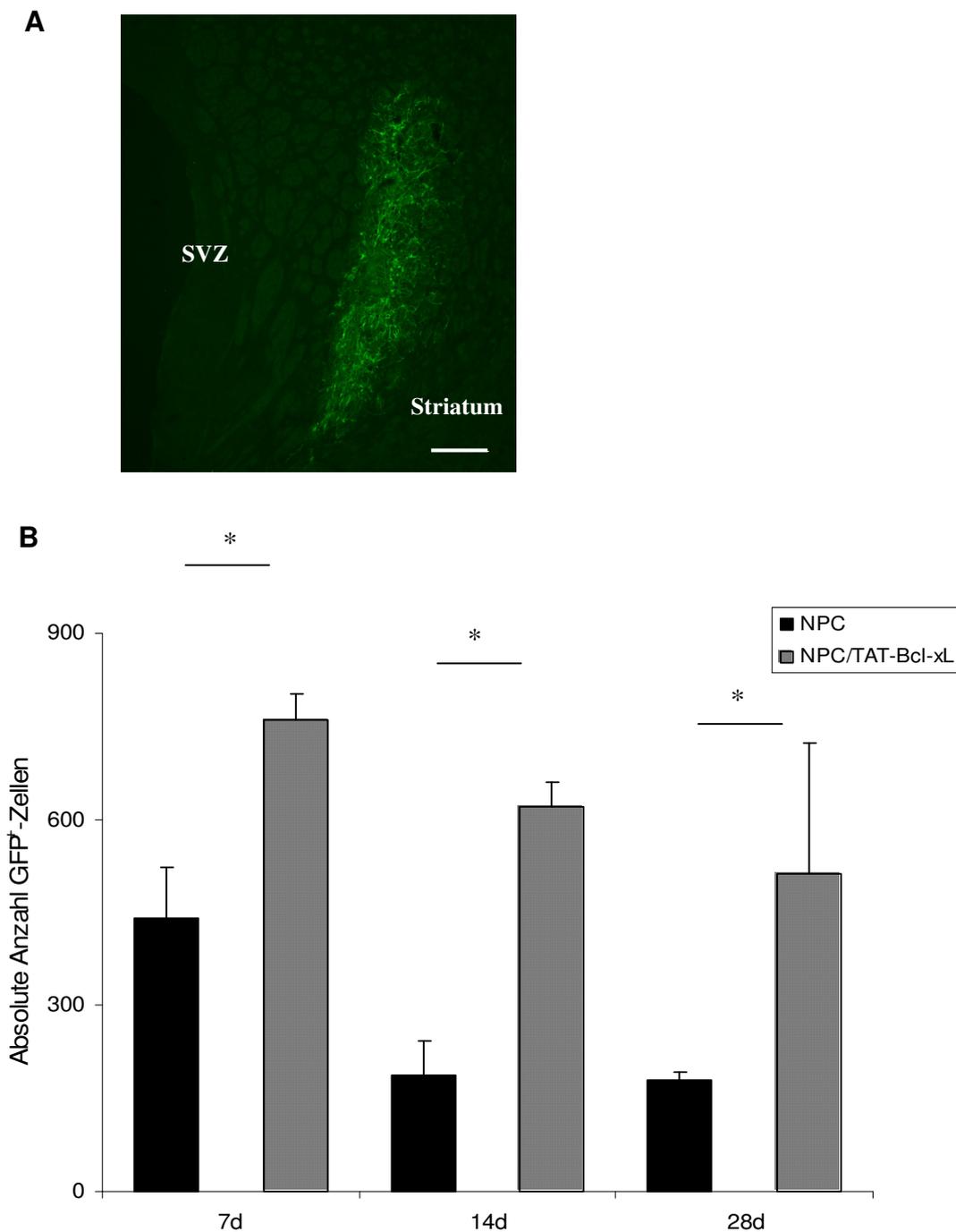


**Abb. 11: Neuroprotektiver Effekt von TAT-Bcl<sub>xL</sub> auf neurale Vorläuferzellen *in vitro*.** (A) Mit TAT-Bcl<sub>xL</sub> oder TAT-HA vorinkubierte (4 h) neurale Vorläuferzellen (NPC) bzw. unbehandelte/native NPC wurden einer Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD) ausgesetzt, indem sie in glukosefreies Medium gegeben und für 45 min in einer hypoxischen Kammer (1% O<sub>2</sub>) inkubiert wurden. 24 h später wurde die Überlebensrate mit Hilfe eines LIVE/DEAD-Assays ausgewertet. Als Kontrolle dienten Zellen, die unter normalen Zellkulturbedingungen (glukosehaltiges Medium, 20% O<sub>2</sub>) kultiviert wurden. (B) NPC wurden zunächst einer Hypoxie-Hypoglykämie (45 min) ausgesetzt und dann anschließend für 24 h unter Zugabe von 1 μM TAT-Bcl<sub>xL</sub>, 1 μM TAT-HA oder nichts (-TAT-Bcl-x<sub>L</sub>) unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte die Auswertung wie oben. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

### 6.3. Überleben transplanteder NPC *in vivo*

Nachdem ein TAT-Bcl-x<sub>L</sub> vermittelter neuroprotektiver Effekt *in vitro* gezeigt werden konnte, sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-transduzierte NPC auch *in vivo* ein höheres Überleben haben. Hierzu wurden GFP<sup>+</sup>-NPC, wie zuvor in den *in vitro* Versuchen beschrieben, für 4 h mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub>

inkubiert und am Tag 7 nach Induktion einer zerebralen Ischämie in das linke ischämische Striatum transplantiert. Nach einer Überlebenszeit von 7, 14 und 28 Tagen post injectionem wurden GFP<sup>+</sup>-NPC immunhistochemisch hinsichtlich Anzahl und Migrationsverhalten analysiert (Abb. 12). Wenngleich es in allen Behandlungsgruppen zu einer progredienten Abnahme der Zellzahl über die Zeit kam, so fand sich doch zu allen Untersuchungszeitpunkten eine signifikant höhere Anzahl von GFP<sup>+</sup>-NPC in der TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-Gruppe (Abb. 12 B).



**Abb. 12: Analyse transplantierte nativer und TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-transduzierter NPC.**

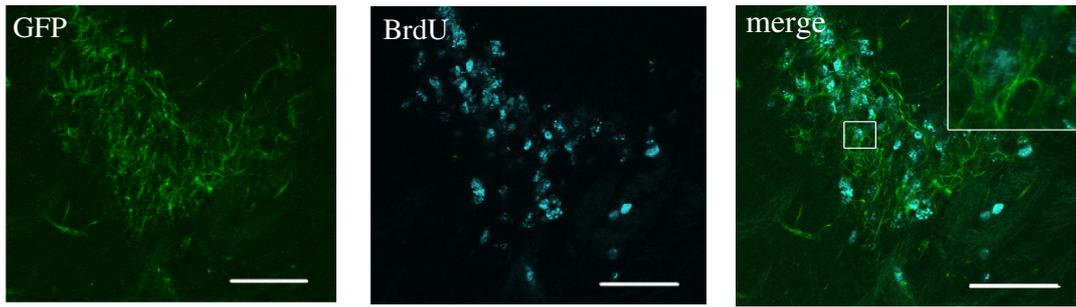
(A) Während einzelne transplantierte NPC in einem Zeitraum von bis zu 28 Tagen eine Migrationstendenz zum ischämischen Areal zeigten, verblieb die Mehrzahl der Zellen im ehemaligen Injektionsareal. Skalierung 200 µm. (B) Das Überleben von transplantierten neuronalen Vorläuferzellen, die 7 Tage nach einer 30 min Ischämie injiziert wurden, wurde 7 d, 14 d und 28 d nach Injektion untersucht. Injiziert wurden unbehandelte (NPC) und mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> (NPC/TAT-Bcl-x<sub>L</sub>) vorbehandelte Zellen. TAT-Bcl-x<sub>L</sub> vorbehandelte NPC hatten zu allen untersuchten Zeitpunkten ein signifikant höheres Überleben im Vergleich zu unbehandelten Zellen. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

**6.4. Proliferation transplantierte NPC**

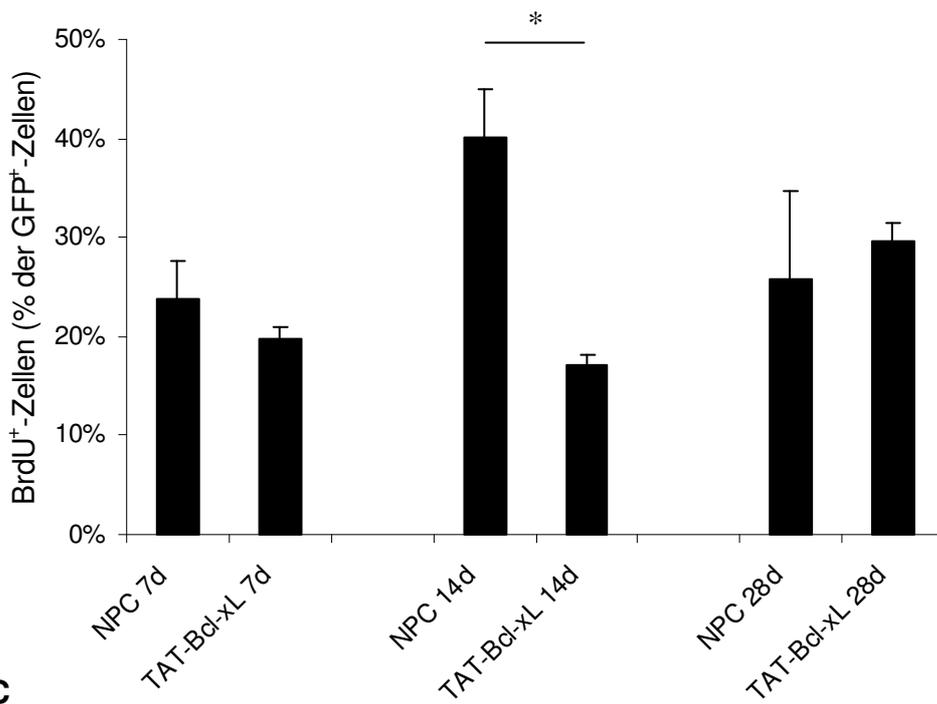
Zur Beurteilung der Proliferationsaktivität von GFP<sup>+</sup> NPC wurde den Tieren einen Tag nach stereotaktischer Injektion (Tag 8 nach Ischämie) bis zum Versuchsende, bzw. bis Tag 21 post injectionem (28 d Gruppen), täglich der Proliferationsmarker BrdU verabreicht. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurde zunächst der relative Anteil an BrdU<sup>+</sup> Zellen unter den GFP<sup>+</sup> NPC bestimmt (Abb. 13 B).

Während bei den frühen Gruppen (7 d) sowohl in der Gruppe der unbehandelten NPC als auch der TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-behandelten NPC der Anteil an BrdU<sup>+</sup> NPC in beiden Gruppen bei etwa 20% lag und somit keinen signifikanten Unterschied aufwies, zeigte sich in den 14 d Gruppen ein signifikanter Unterschied. So konnte bei unbehandelten NPC ein Anteil von über 40% BrdU<sup>+</sup> NPC festgestellt werden, wohingegen bei TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-behandelten NPC der relative Anteil an BrdU<sup>+</sup> Zellen bei 17% lag. Zu den späten Zeitpunkten (28 d) ließen sich hingegen keine signifikanten Unterschiede herausarbeiten. Da jedoch die absolute Anzahl GFP<sup>+</sup> Zellen innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen signifikant unterschiedlich war (s.o.), wurde zusätzlich die absolute Anzahl an BrdU<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen ermittelt (Abb. 13 C). Hier ist zu allen untersuchten Zeitpunkten zwischen den Gruppen der unbehandelten und TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelten NPC ein signifikanter Unterschied zu sehen.

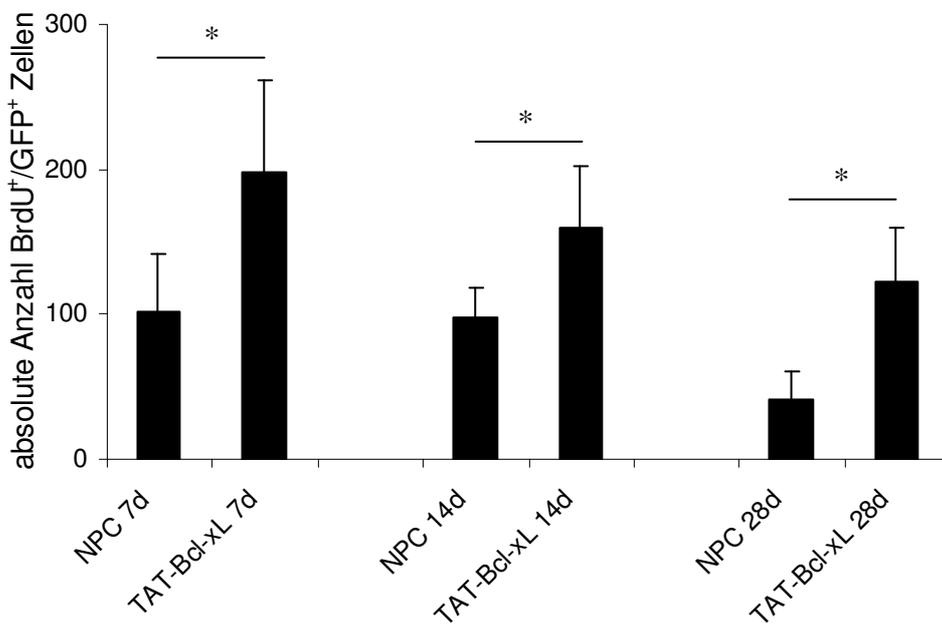
**A**



**B**



**C**



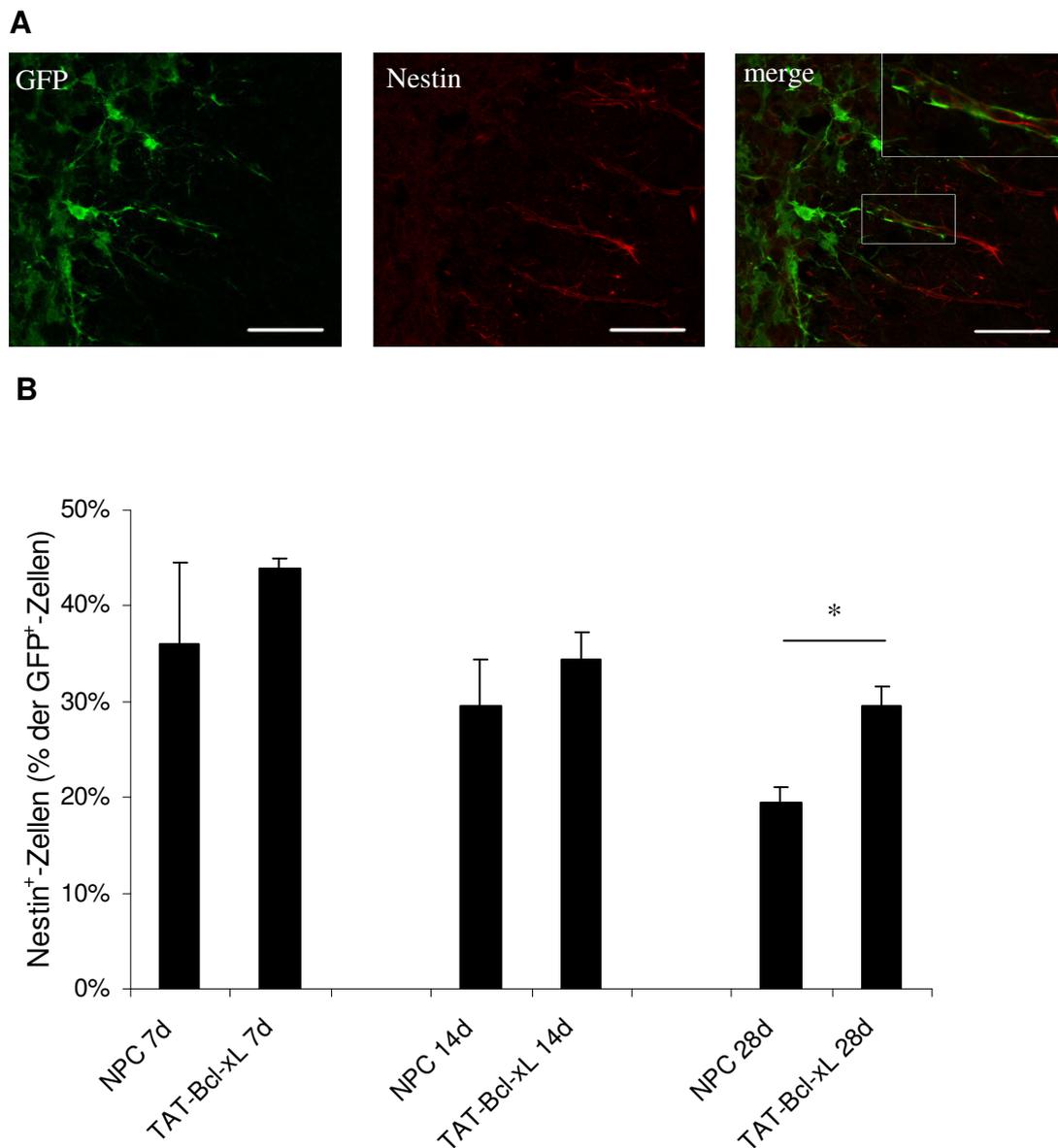
**Abb. 13: Proliferation transplantiertener neuraler Vorläuferzellen.** Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen (A, Skalierung 50  $\mu\text{m}$ ) wurde die Anzahl der Zellen ausgewertet, die sowohl positiv für den Proliferationsmarker BrdU als auch für GFP (neurale Vorläuferzellen) sind und der relative Anteil bestimmt (B). Während zwischen den 7 d und 28 d Überlebenden kein Unterschied zu sehen war, gab es bei den 14d-Gruppen einen signifikanten Unterschied. (C) Bei der absoluten Anzahl der BrdU<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen gab es zu allen drei Zeitpunkten signifikant höhere Werte bei den TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

## 6.5. Differenzierung transplantiertener NPC

Die neurale Differenzierung der transplantierten NPC wurde zu den gegebenen Zeitpunkten immunhistochemisch untersucht. Während sich in transplantierten NPC eine Expression von Nestin (Marker für neurale Vorläuferzellen), GFAP (astrozytäre Differenzierung) und Dcx (immature neuronale Zellen) fanden, ließ sich eine Ko-Expression mit dem oligodendrozytären (CNPase) und neuronalen Marker (NeuN) nicht nachweisen.

### 6.5.1. Differenzierung in neurale Vorläufer

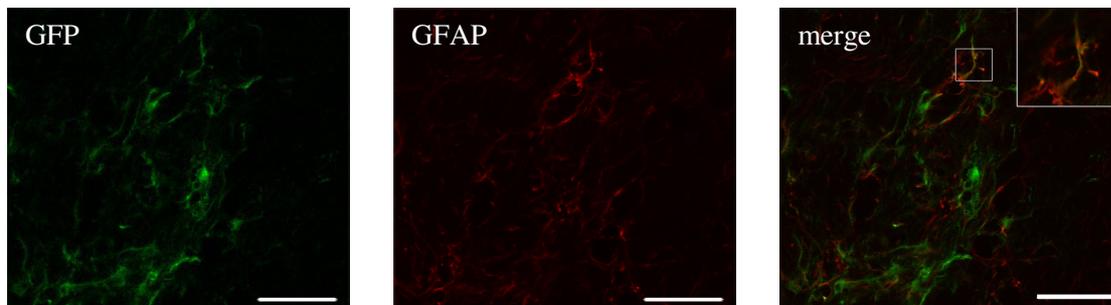
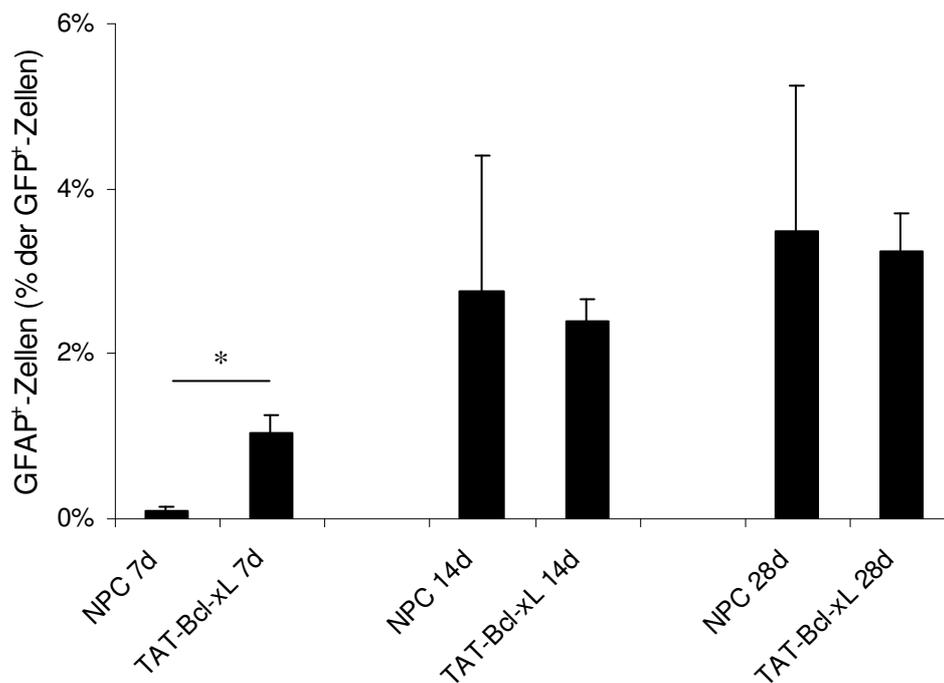
Die Zahl Doppelmarkierter Nestin<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> NPC (Abb. 14 A) nahm gleichermaßen sowohl in der Gruppe der nativen NPC als auch der transduzierten NPC über die Zeit ab (Abb. 14 B). So lagen die relativen Anteile sieben Tage nach stereotaktischer Injektion bei 36% (NPC unbehandelt) und 44% (TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-behandelte NPC) und sanken 14 Tage nach Transplantation auf 29% bzw. 34%. Bei der Analyse 28 d nach stereotaktischer Injektion der NPC lag schließlich der Anteil an Nestin<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen bei den unbehandelten NPC bei 20% und bei den TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-behandelten NPC mit etwa 30% signifikant höher.



**Abb. 14: Ko-Expression von applizierten NPC mit dem neuronalen Marker Nestin.** Der Differenzierungsgrad der exogen applizierten GFP<sup>+</sup>-NPC wurde untersucht und hieraus der prozentuale Anteil Nestin-positiver NPC (A, Skalierung 50  $\mu$ m) berechnet. Insgesamt fand eine Abnahme der Nestin<sup>+</sup>-Zellen in jeweils beiden Gruppen über die Zeit statt. Während am Tag 7 und 14 kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen sichtbar war, konnte am Tag 28 in der Gruppe der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelten Zellen ein signifikant höherer Anteil Nestin<sup>+</sup>-NPC detektiert werden. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

### 6.5.2. Astrogliale Differenzierung von transplantierten NPC

Der prozentuale Anteil an NPC, die eine astrogliale Differenzierung aufwiesen war mit bis zu etwa 4% relativ gering (Abb. 15). Anders als bei den Nestin<sup>+</sup>-NPC nahm bei den GFAP<sup>+</sup>-NPC der Anteil in beiden Gruppen über den untersuchten Zeitraum zu. So lag der relative Anteil bei den 7 d Gruppen bei 0,1% bei den unbehandelten NPC, und mit 1% signifikant höher in der Gruppe der transduzierten NPC. An Tag 14 und 28 gleicht sich der Anteil in beiden Gruppen an, und liegt bei den unbehandelten NPC bei 2,7% (14 d) und 3,5% (28 d). Der prozentuale Anteil GFAP<sup>+</sup> TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelter NPC liegt bei 2,4% (14 d) und 3,2% in der Gruppe der 28 d Tiere.

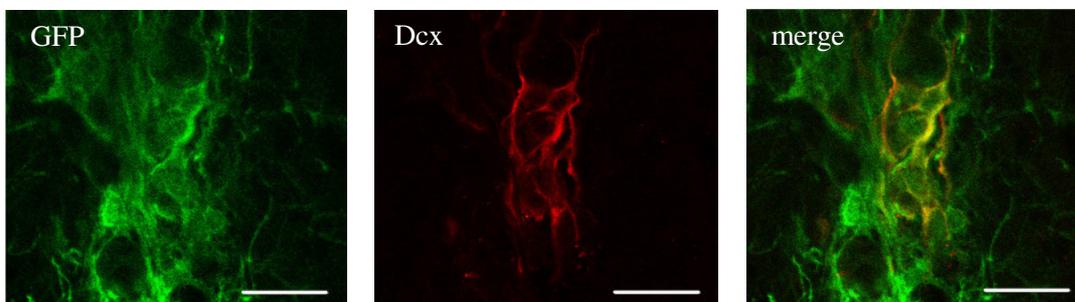
**A****B**

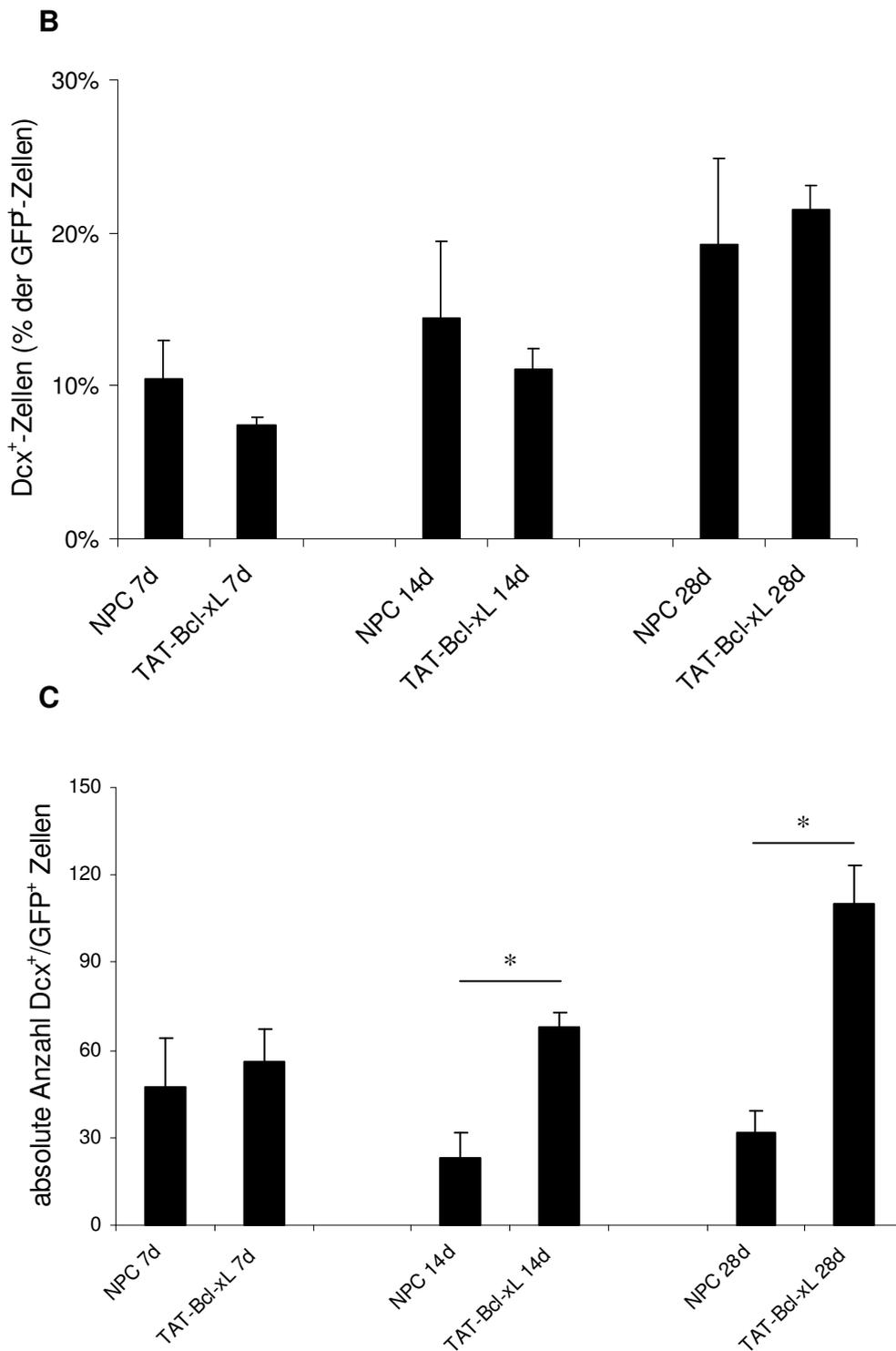
**Abb. 15: Astrogliale Differenzierung transplanteder NPC.** Der prozentuale Anteil GFAP<sup>+</sup>-Zellen (A, Skalierung 50  $\mu$ m) unter den transplantierten NPC nahm in beiden untersuchten Gruppen über die Zeit zu. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen war am Tag 7 zu erkennen. Zu den anderen untersuchten Zeitpunkten lagen die Werte wieder nah beieinander. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

### 6.5.3. Neuronale Differenzierung

Wie anfangs erwähnt konnte keine Differenzierung der transplantierten NPC in mature Neurone detektiert werden. Hingegen ließ sich jedoch nachweisen, dass ein über den untersuchten Zeitraum hin ansteigender Anteil der injizierten NPC positiv für den immaturre neuronalen Marker Dcx (Abb. 16 A) war. Sieben Tage nach stereotaktischer Injektion der NPC lag der prozentuale Anteil von Dcx<sup>+</sup> NPC bei etwa 10% bei den unbehandelten und 8% bei den TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC (Abb. 16 B). Auch zu den späteren Zeitpunkten konnte zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, jedoch stieg der Anteil in beiden Gruppen an. So lag der Anteil an Tag 14 bei den nativen NPC bei 14% und 11% bei den TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-behandelten NPC, und schließlich an Tag 28 bei 19% (unbehandelt) und 22 % (transduziert).

A





**Abb. 16: Transplantierte NPC differenzieren in  $Dcx^+$  immature neuronale Zellen.** Der prozentuale Anteil der injizierten NPC, die eine Doppelmarkierung mit GFP und dem Marker Dxc (A, Skalierung 50  $\mu$ m) aufwiesen, lag anfangs in beiden untersuchten Gruppen bei etwa 8-10% (B) und stieg an Tag 28 bis auf etwa 20% an. Zu keinem untersuchten Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. (C) Bei

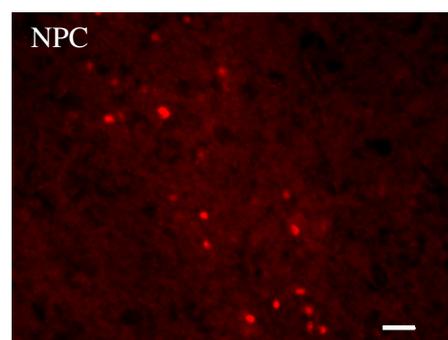
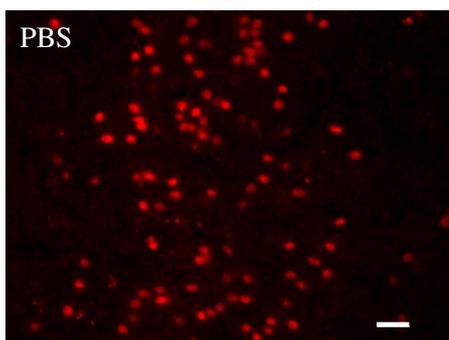
der absoluten Anzahl der Dcx<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen gab es an Tag 14 und Tag 28 signifikant höhere Werte bei den TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

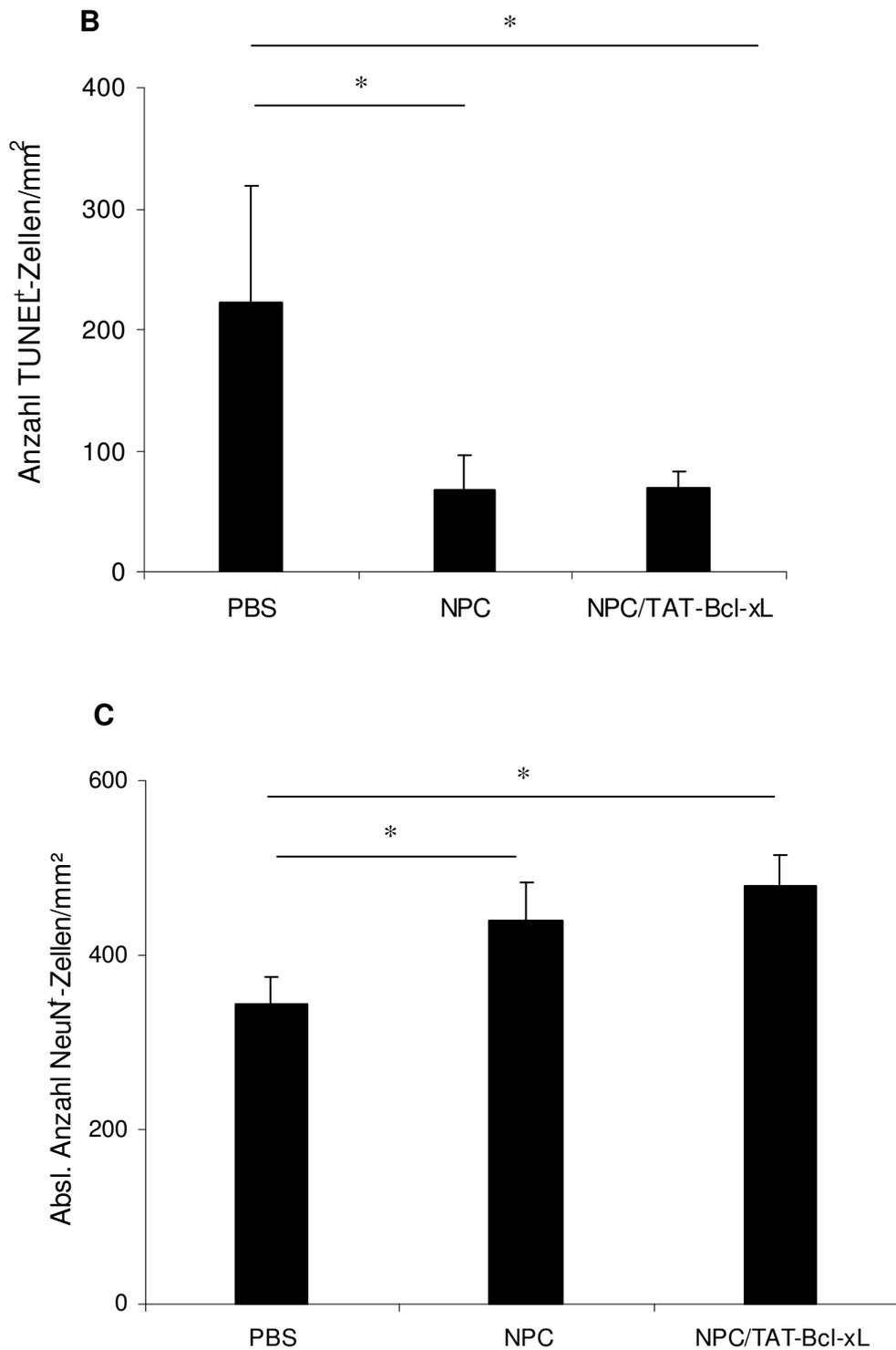
### 6.6. NPC-vermittelte Neuroprotektion nach zerebraler Ischämie

Zur Untersuchung einer durch neurale Vorläuferzellen vermittelten Neuroprotektion wurden die Anzahl TUNEL<sup>+</sup> Zellen (d 7; Abb. 17 A) bzw. die neuronale Dichte bestimmt. Wie in Abb. 17 B dargestellt führt die Injektion von sowohl unbehandelten als auch TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-transduzierten NPC gleichermaßen zu einem geringeren Zelltod im Vergleich zu der PBS-Gruppe. Eine Behandlung mit NPC (nativ oder transduziert) ging mit einer signifikanten Reduktion der Anzahl TUNEL<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe einher (67 bzw. 69 vs. 223 Zellen pro mm<sup>2</sup>).

Diese am Tag 7 nach stereotaktische Injektion beobachtete Neuroprotektion persistierte über einen Zeitraum von bis zu 28 Tagen. So konnte an Tag 28 eine signifikant erhöhte neuronale Dichte in den NPC-Behandlungsgruppen im Vergleich zu PBS-Kontrolltieren beobachtet werden (Abb. 17 C). Es fanden sich in der PBS-Gruppe 343 NeuN<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> im Vergleich zu 439 NeuN<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> (unbehandelte NPC) bzw. 479 NeuN<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> (TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierte NPC).

**A**





**Abb. 17: Neuroprotektiver Einfluss der transplantierten NPC.** Mit Hilfe einer TUNEL-Färbung wurde fragmentierte DNA in den Zellkernen toter Zellen bei Kryoschnitten der drei verschiedenen Versuchsgruppen mit 7 Tage Überleben dargestellt (A, Skalierung 10  $\mu$ m). (B) Nach Auswertung der Anzahl der TUNEL<sup>+</sup> Zellen pro mm<sup>2</sup> ist in beiden NPC behandelten

Gruppen ein deutlich geringer Zelltod zu erkennen. (C) Die Transplantation von NPC, sowohl unbehandelt als auch mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelt, führt 28 d nach Injektion zu einer signifikant höheren neuronalen Dichte im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

## **6.8. Verhaltenstests zur Analyse des post-ischämischen funktionellen Defizits**

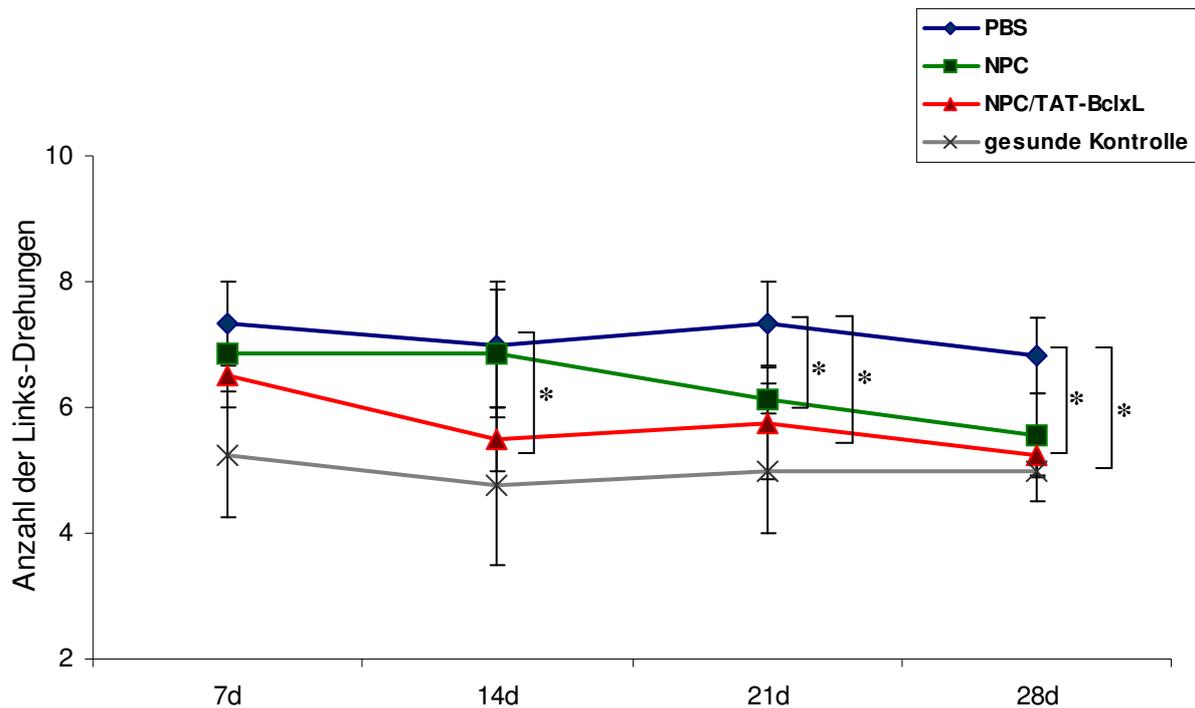
Abgesehen von den immunhistochemischen Analysen wurden Untersuchungen zu den funktionellen Defiziten durch Verhaltenstests durchgeführt. Zum einen wurde der Corner Turn Test verwendet, um das Ausmaß des sensomotorischen Defizits zu untersuchen. Andererseits fand zur Analyse der kognitiven Fähigkeiten ein modifizierter Morris Water Maze Anwendung.

### **6.8.1. Corner Turn Test**

Der Corner Turn Test wurde jeweils an den Tagen 7, 14, 21 und 28 nach Injektion der NPC bzw. von PBS in der Kontrollgruppe durchgeführt. Zum Vergleich erfolgte parallel auch die Durchführung mit gesunden Tieren. Dabei wurde in zehn Durchgängen die Anzahl der Links-Drehungen (also ipsilateral zur Schädigung im Gehirn) aus der Ecke dokumentiert (Abb. 18).

Völlig gesunde Tiere (Abb. 18, graue Linie) zeigten über den gesamten untersuchten Zeitraum eine gleichmäßige, d. h. streng zufällige, Verteilung von Links- und Rechtsdrehungen. Im Gegensatz hierzu hatten Tiere, denen PBS injiziert wurde (blaue Linie), die Präferenz sich linksherum aus der Ecke herauszubewegen. Dies blieb auch über den gesamten Untersuchungszeitraum erhalten.

Bei den Tieren, die TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelte NPC erhalten haben war bereits 14 Tage nach Injektion ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur PBS-Gruppe zu erkennen; die Anzahl der Links-Drehungen war geringer. Dieser Unterschied blieb auch 21 und 28 Tage nach Injektion erhalten. Auch bei den Tieren, die unbehandelte NPC erhielten stellte sich dieses Ergebnis ein, jedoch weniger deutlich und erst an Tag 21 und 28.

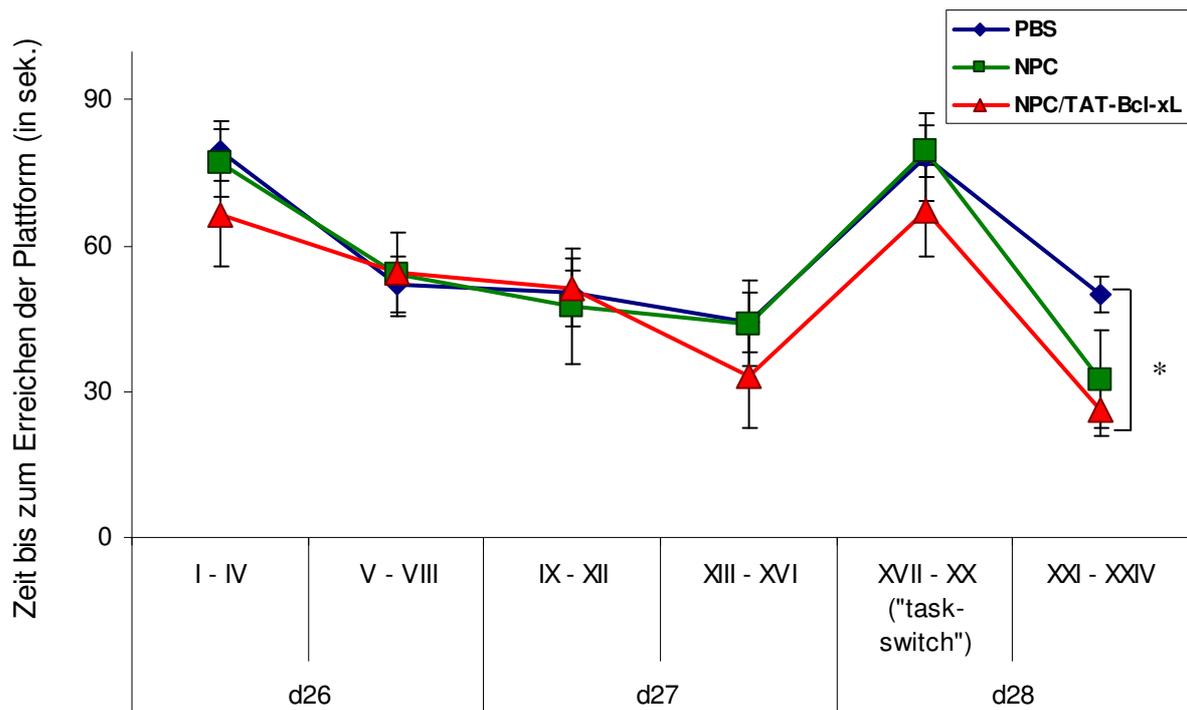


**Abb. 18: Auswertung des Corner Turn Test zur Bewertung des sensomotorischen Defizits.** In zehn Durchgängen wurde pro Tier die durchschnittliche Anzahl der Drehungen, die linksseitig aus dem Versuchsaufbau heraus gemacht wurden, bestimmt. Jede Gruppe wurde jeweils 7, 14, 21 und 28 Tage nach Injektion getestet. Zum Vergleich dienten zusätzlich gesunde Tiere (grau). Während die PBS-Gruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum sich überwiegend linksherum aus der Ecke drehte, kam es in der Gruppe der Tiere, die mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC behandelt wurden (rot), bereits nach 14 Tagen zu einer signifikanten Verminderung der Linksdrehungen im Vergleich zur PBS-Gruppe. An Tag 21 und 28 ist die Anzahl der Links-Drehungen in beiden NPC-behandelten Gruppen im Vergleich zur PBS-Gruppe signifikant geringer, und nähern sich dem Wert der gesunden Tiere. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

### 6.8.2. Morris Water Maze

Der sog. Morris-Water-Maze-Test diente der Überprüfung des räumlichen Lernens. Alle Tiere zeigten eine progrediente Verminderung der benötigten Zeit bis zum Erreichen der Plattform. Ein signifikanter Unterschied fand sich jedoch zwischen den Behandlungsgruppen nicht. Im „task-switch“ kam es hingegen zu einem initialen

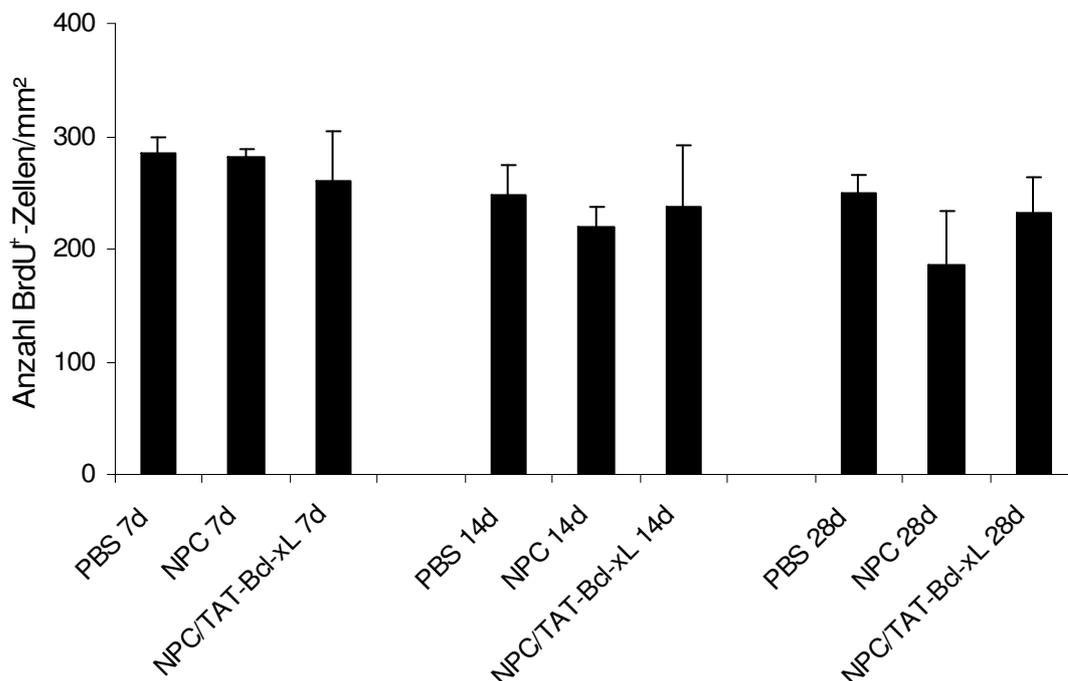
Anstieg der Zeit in allen Gruppen. TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelte Tiere konnten zwar die Plattform schneller erreichen als die Kontrollgruppen, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Nach Re-Positionierung der Plattform in die ursprüngliche Position kam es jedoch zu einem signifikant schnelleren Erreichen der Plattform bei den NPC/TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelten Tieren (Abb. 19).



**Abb. 19: Ergebnis des modifizierten Water Maze Test.** Die Zeit bis zum Erreichen der Plattform nimmt bei allen untersuchten Versuchsgruppen in den ersten beiden Tagen ab, wobei die NPC/TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelte Gruppe tendenziell schneller die Plattform erreicht, jedoch mit keinem signifikanten Unterschied. Bei dem „task-switch“ nimmt die Zeit in allen Gruppen wieder zu, wobei auch hier die NPC/TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelte Gruppe etwas schneller ist. Nach Zurückstellen der Plattform in die ursprüngliche Position benötigen NPC/TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelte Tiere signifikant weniger Zeit zum Erreichen der Plattform. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

## 6.9. Analyse von NPC-induzierten Effekten auf die postischämische endogene Neurogenese

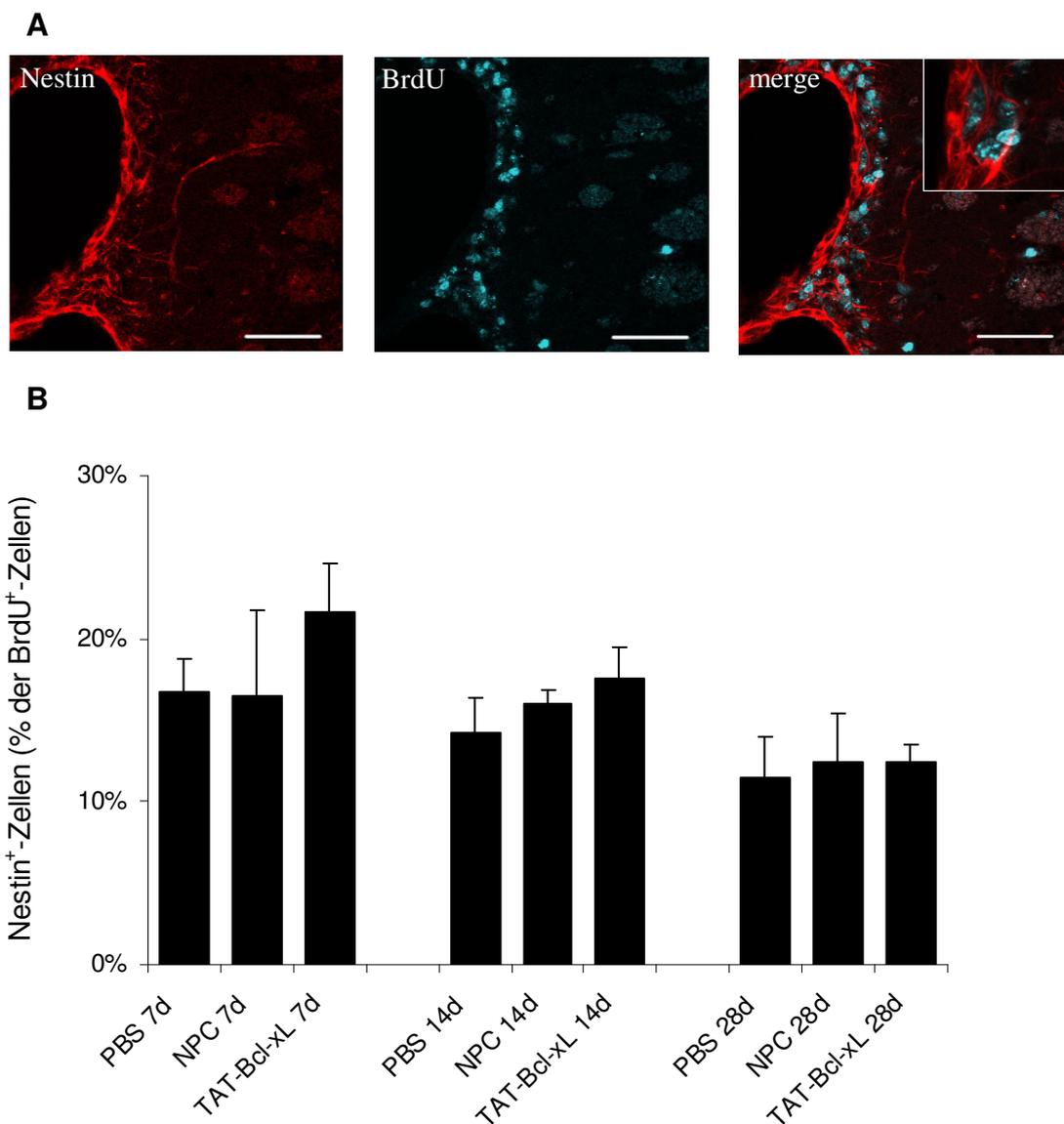
Neben den Untersuchungen zu Überleben, Migration und Differenzierungsgrad transplanteder NPC wurden auch Effekte auf die endogene Neurogenese analysiert. Die hierzu durchgeführte BrdU-Applikation erfolgte analog dem unter Kapitel 4.1.10. geschilderten Prozedere. Es wurden immunhistochemische Untersuchungen gegen GFP, BrdU und entsprechenden Markern an Tag 7, 14 und 28 post injectionem durchgeführt. Zellen die doppelpositiv für GFP und BrdU waren, wurden in den nachfolgenden Auswertungen zum Effekt auf die endogene Neurogenese nicht mit einbezogen. Zunächst wurde die absolute Anzahl BrdU<sup>+</sup> Zellen pro mm<sup>2</sup> im Striatum der unterschiedlich behandelten Tiere bestimmt (Abb. 20). Zu keinem Zeitpunkt konnte zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



**Abb. 20: Effekt transplanteder NPC auf die endogene Neurogenese.** Dargestellt ist die absolute Anzahl BrdU<sup>+</sup> Zellen pro mm<sup>2</sup> im Striatum von Tieren, denen PBS (Kontrolle), native NPC und TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-behandelte NPC injiziert worden ist. Zu allen drei untersuchten Zeitpunkten konnte zwischen den einzelnen Gruppen kein Unterschied festgestellt werden.

### 6.9.1. Neurale Differenzierung der BrdU<sup>+</sup> proliferierender Zellen

Ähnlich wie bei den transplantierten NPC exprimierte ein Großteil der BrdU<sup>+</sup> Zellen den neuronalen Marker Nestin. Typischerweise waren diese Zellen im Bereich der SVZ des linken ischämischen Seitenventrikels (Abb. 21 A), zeigten allerdings – wenngleich auch in geringerer Anzahl – eine Migration zum ischämischen Areal. Ausgewertet wurde der prozentuale Anteil von Nestin<sup>+</sup> Zellen an der Gesamtzahl BrdU<sup>+</sup> Zellen, die aber nicht GFP<sup>+</sup> waren (Abb. 21 B). Zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen ließ sich zu den untersuchten Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied herausarbeiten. Lediglich am Tag 7 lag der relative Anteil in der Gruppe der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelten Gruppe im Vergleich zu der PBS-Gruppe höher, jedoch nicht statistisch signifikant.

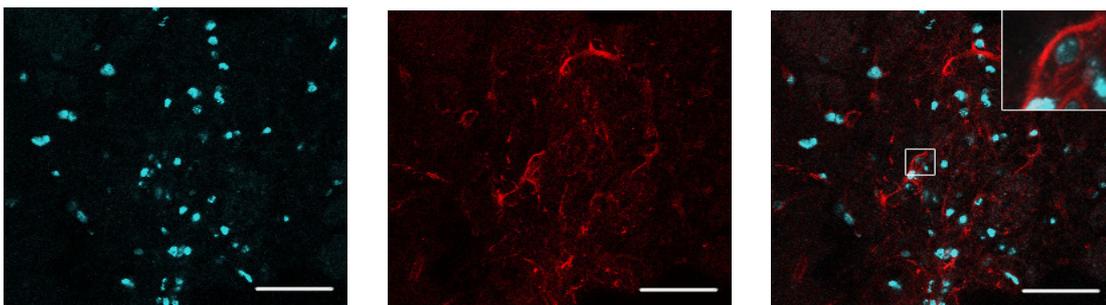


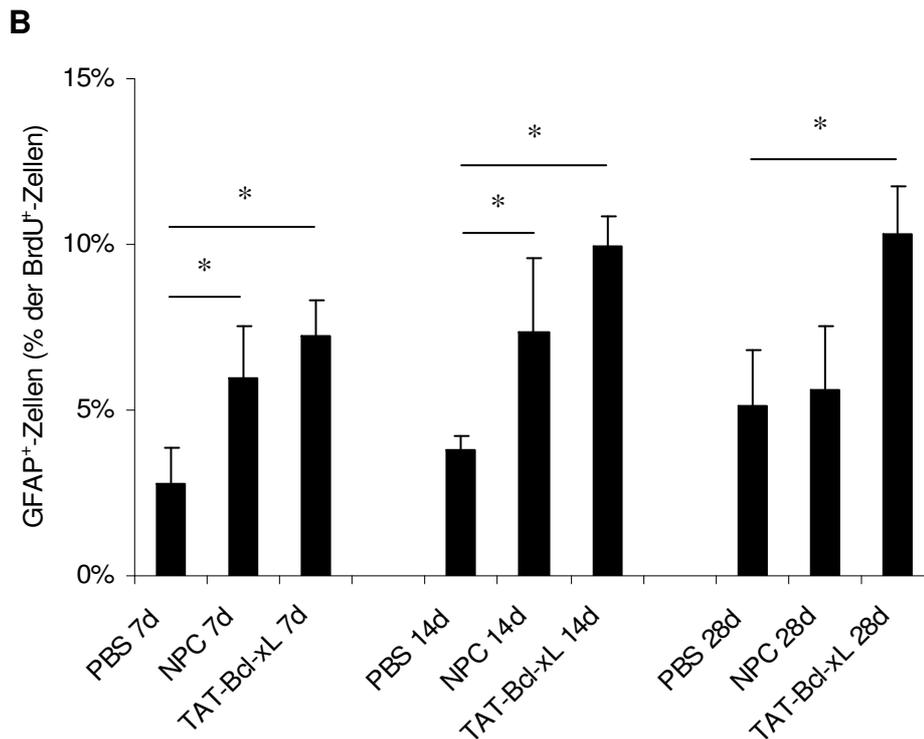
**Abb. 21: Differenzierung der BrdU<sup>+</sup> Zellen in neurale Vorläuferzellen.** Der prozentuale Anteil Nestin-positiver Zellen der BrdU<sup>+</sup> Zellen (A, Skalierung 50  $\mu$ m) sinkt in den einzelnen Gruppen über den untersuchten Zeitraum leicht ab (B). Es gab zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied.

### 5.9.2. Astrogliale Differenzierung

Neben der Differenzierung der BrdU<sup>+</sup> Zellen in neurale Vorläuferzellen konnte eine Differenzierung in astrogliale GFAP<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden (Abb. 22 A). Der prozentuale Anteil GFAP<sup>+</sup> Zellen war zu allen drei untersuchten Zeitpunkten bei den Tieren, denen mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierte NPC transplantiert wurde signifikant höher im Vergleich zu den PBS-Kontrolltieren (Abb. 22 B). An Tag 7 und 14 lag auch bei den Tieren, die unbehandelte NPC erhielten der Wert mit 5,9% (NPC 7 d) und 7,3% (NPC 14 d) signifikant höher im Vergleich zu den PBS-Kontrollen. An Tag 28 glichen sich die Werte der PBS-Kontrolle und den mit nativen NPC-behandelten Tieren wieder an, nur die Behandlung mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC zu einem signifikant höheren Anteil.

**A**





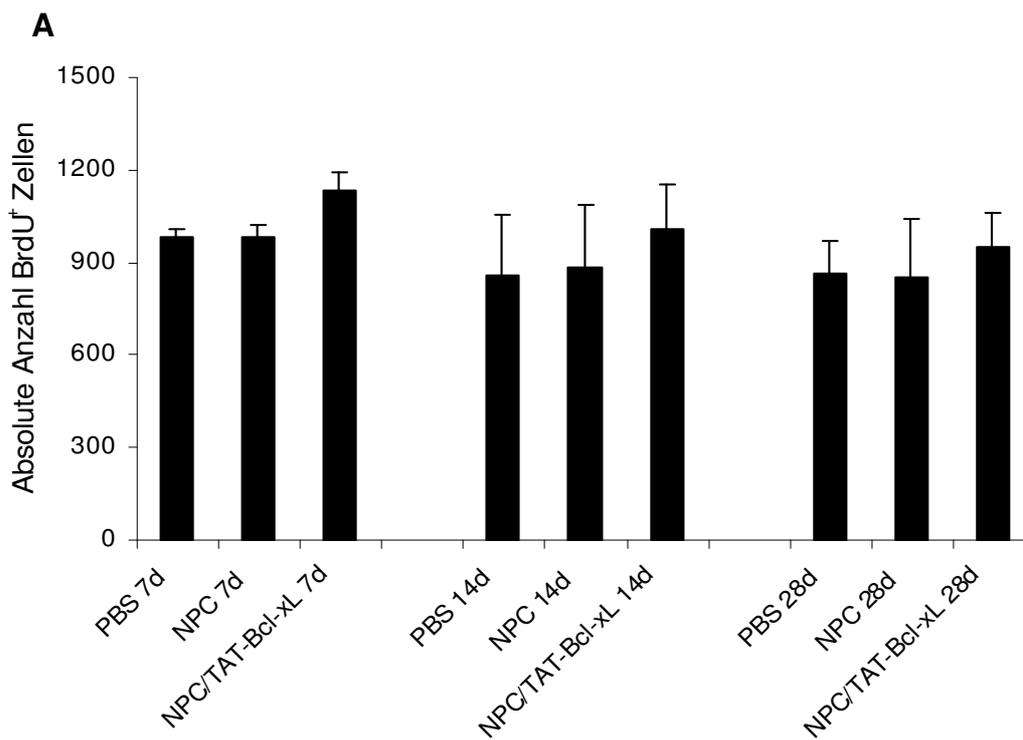
**Abb. 22: Astrogliale Differenzierung der BrdU<sup>+</sup> Zellen.** Der prozentuale Anteil GFAP<sup>+</sup> unter den BrdU<sup>+</sup> Zellen (A, Skalierung 50  $\mu$ m) lag zu den drei untersuchten Zeitpunkten bei den TAT-Bcl-x<sub>L</sub> im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe signifikant höher. Auch die Behandlung mit nativen NPC führt an Tag 7 und 14 zu einem signifikant höheren Wert an doppelpositiven GFAP<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> Zellen. \*statistisch signifikant  $p < 0,05$

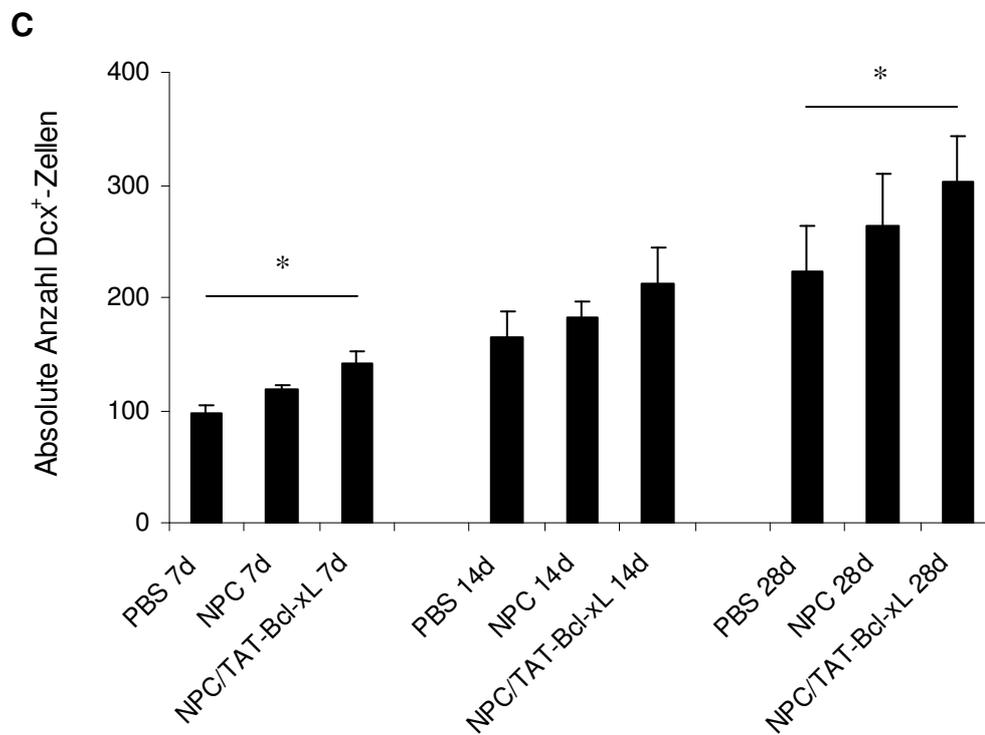
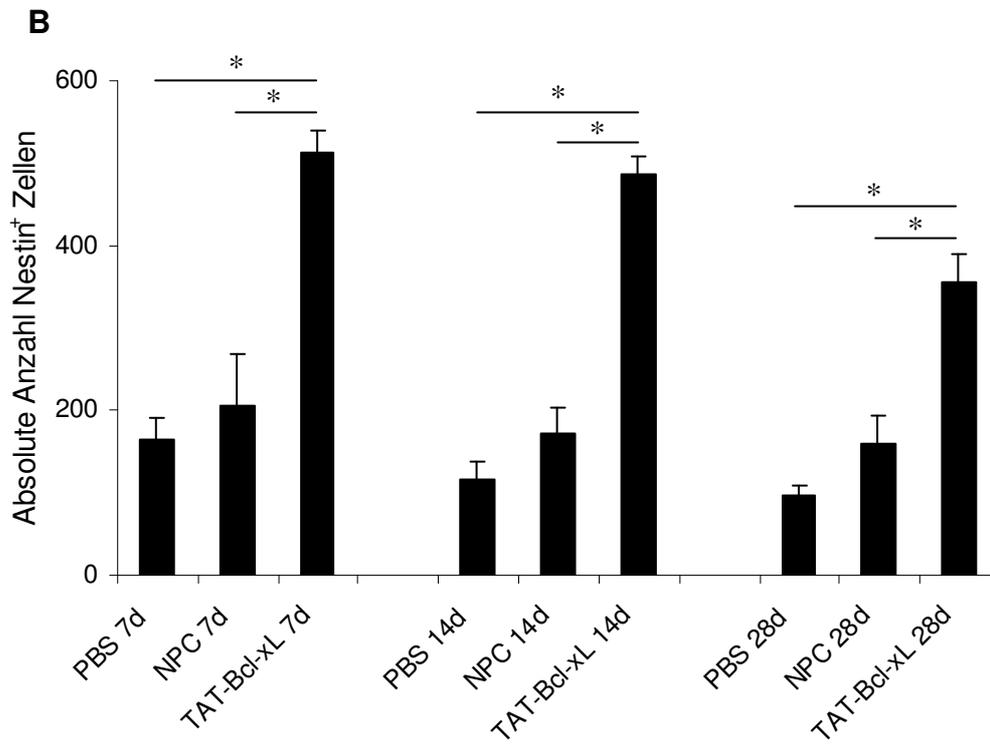
### 5.10. Neuroregenerativer Einfluss applizierter NPC

Da für einen potentiellen neuroregenerativen Effekt die Gesamtzahl an BrdU<sup>+</sup> sowie neuronalen bzw. neuralen Zellen relevanter als relative Anteile sind, wurde auch die Gesamtanzahl BrdU<sup>+</sup> Zellen (Abb. 23 A, BrdU<sup>+</sup> inkl. BrdU<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen), Nestin<sup>+</sup> Zellen (sowohl Nestin<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> als auch Nestin<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup>; Abb. 23 B) und die Gesamtanzahl Dcx<sup>+</sup> Zellen inklusive der Dcx<sup>+</sup> NPC bestimmt (Abb. 23 C). Um den Effekt der transplantierten NPC auf die Proliferation und Bildung von neuronalen Vorläuferzellen und immaturren Neuronen zu analysieren, wurden die Gruppen der NPC-injizierten Tiere mit den PBS-Kontrollen verglichen. Die Applikation von NPC zeigte keinerlei Auswirkung auf die absolute Anzahl BrdU<sup>+</sup> Zellen. Die absolute Anzahl Nestin<sup>+</sup> Zellen ist zu allen drei untersuchten Zeitpunkten in der Gruppe der

Tiere, denen TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-behandelten NPC appliziert wurde signifikant höher im Vergleich beiden Kontrollgruppen (PBS, native NPC).

Bei der Untersuchung zu den immaturren Neuronen konnte bereits sieben Tage nach Injektion bei der Tiergruppe, die die TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-behandelten NPC erhielten im Vergleich zur PBS Gruppe eine signifikant höhere Anzahl an Dcx<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden. Obwohl auch an Tag 14 die Anzahl Dcx-positiver Zellen in den NPC-behandelten Gruppen im Vergleich zu der PBS-Kontrolle tendenziell höher, so sind die Unterschiede nicht signifikant. Interessanterweise zeigten auch die Tiere, denen unbehandelte NPC transplantiert wurden zu allen Zeitpunkten einen tendenziell höheren Wert an Dcx<sup>+</sup> Zellen, was jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant ist.





**Abb. 23: Einfluss der transplantierten NPC auf die Gesamtzahl der BrdU<sup>+</sup>, Nestin<sup>+</sup> und Dcx<sup>+</sup> Zellen.** (A) Die Applikation von NPC hat keine Auswirkung auf die absolute Gesamtzahl BrdU<sup>+</sup> Zellen. (B) Die Transduktion der NPC mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> führte zu allen untersuchten Zeitpunkten zu einer signifikant höheren absoluten Anzahl Nestin<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu beiden Kontroll-Gruppen (native NPC,PBS). (C)Verglichen mit den PBS-Kontrollgruppen konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine tendenziell höhere Gesamtanzahl, d. h. endogen entstandene und applizierte Dcx<sup>+</sup>-NPC, Dcx<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden. Signifikant höher im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe war die Anzahl der Dcx<sup>+</sup> Zellen an Tag 7 und 28 in den Gruppen der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC.  
\*statistisch signifikant  $p < 0,05$

## 7. Diskussion

Der ischämische Schlaganfall ist nach wie vor die dritthäufigste Todesursache und der häufigste Grund für eine Langzeitbehinderung von Patienten in den westlichen Industrieländern. Wie eingangs erwähnt (siehe Kapitel 3.1) besteht gegenwärtig die einzige kausale Therapie in der unverzüglichen Rekanalisation des okkludierten Gefäßes mit Hilfe von rt-PA innerhalb eines definierten Zeitfensters [Hacke et al., 2005 ; Broderick et al., 2002]. Da die Übertragung neuroprotektiver Substanzen vom Tiermodell auf den Menschen – wie in zahlreichen Studien gezeigt – bis zum heutigen Tag fehl schlug, fokussieren neuere (experimentelle) Strategien auf neuroregenerativen Ansätzen. Hingegen trägt die bis dato mehrfach beobachtete ischämieinduzierte Stimulation der endogenen Neurogenese nicht zu einer funktionellen Erholung des ZNS bei (siehe Kapitel 3.3), so dass die Transplantation adulter neuraler Stammzellen bzw. Vorläuferzellen (NPC) nach zerebraler Ischämie im Tiermodell vermehrt Anwendung findet.

Wiederholte Beobachtungen eines durch die Applikation von SZ induzierten neuroprotektiven Effektes nach zerebraler Ischämie scheinen jedoch weniger einer genuinen neuronalen Differenzierung und Regeneration dieser Zellen, sondern vielmehr indirekter Effekte zu schulden [Pluchino et al., 2003; Llado et al., 2004; Svendsen et al., 1996]. Die erzielten Ergebnisse scheinen Folge der so genannten „neurotrophen Pumpfunktion“ der applizierten Zellen zu sein, d.h. über eine Sekretion von neurotrophen Faktoren kommt es zu einer indirekten Neuroprotektion der residuellen neuronalen Strukturen im Peri-Infarktbereich [Capone et al., 2007]. Allerdings sind auch diese Effekte aufgrund der nachweislich hohen Zelltoderate nach Transplantation nur von temporärem Charakter [Hicks et al., 2008]. Aufgrund dessen wurden wiederholt Anstrengungen unternommen, die Resistenz transplanteder SZ/NPC durch Einsatz verschiedener experimenteller Verfahren, wie z.B. der genetischen Modifikation, um die Expression bestimmter Wachstumsfaktoren zu steigern [Kameda et al., 2007; Andberg et al., 1998], zu erhöhen. Keine dieser Arbeiten konnte jedoch eine persistierende Protektion transplanteder Zellen bzw. Reduktion des postischämischen funktionellen Defizits zeigen. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein neuer „therapeutischer“ Ansatz gewählt. Es wurde zum einen der Frage nachgegangen, inwiefern die Transduktion von NPC *in vitro* mit dem anti-apoptotischen und membranpermeablen Fusionsprotein TAT-Bcl-x<sub>L</sub> (siehe

Kapitel 3.7.) mit einer erhöhten Resistenz nach hypoxisch bzw. ischämischer Zellschädigung *in vitro* bzw. *in vivo* behaftet ist. Zum anderen wurde die Hypothese untersucht, ob ein potentiell besseres Überleben von transplantierten, transduzierten NPC mit einer genuinen neuronalen Regeneration und Reduktion der postischämischen funktionellen Schädigung einhergeht.

Für die hier vorliegende Studie wurden NPC aus der SVZ adulter Mäuse generiert und über mehrere Passagen in Form von Neurosphären kultiviert (siehe Kapitel 5.1.2). Wie in der Literatur beschrieben [Ihrie et al., 2008; Doetsch et al., 1997; Ocbina et al., 2006; Walker et al., 2007] wiesen diese Zellen ein Expressionsmuster für GFAP, Nestin, Dcx und den Marker für proliferierende Zellen Ki-67 auf (Abb. 9). Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Transduktion von NPC mit dem Fusionsprotein TAT-Bcl-x<sub>L</sub>, welche wie bereits von Dietz et al. zuvor beschrieben [2002] suffizient und effizient möglich war (Abb. 10), zu einer signifikanten Reduktion der Zellschädigung nach Induktion einer hypoxisch-hypoglykämischen Noxe führte. Dieser Effekt ließ sich unabhängig vom Zeitpunkt der Transduktion, d.h. sowohl bei Gabe von TAT-Bcl-x<sub>L</sub> vor als auch nach Hypoxie-Hypoglykämie, nachweisen (Abb. 11). Eine neuroprotektive Wirkung dieses Fusionsproteins konnte bereits in früheren Studien in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [Diem et al., 2005; Dietz et al., 2008] gezeigt werden. So konnte z.B. im EAE-Modell der multiplen Sklerose eine Protektion retinaler Ganglien-Zellen nach Transduktion mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> beobachtet werden. Im MPTP-Parkinson-Modell führte die systemische Applikation von TAT-Bcl-x<sub>L</sub> zu einer Protektion dopaminerger Neuronen. Im Zusammenhang mit einer ischämischen Zellschädigung konnten Kilic et al. erstmals eine Reduktion des Infarktolumens am Tag 3 nach zerebraler Ischämie der Maus nachweisen; eine Applikation von NPC fand zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht statt. [Kilic et al., 2002]. Hingegen konnten Doeppner et al. erstmals durch systemische Applikation von TAT-Bcl-x<sub>L</sub> zum Zeitpunkt der Reperfusion nach zerebraler Ischämie ein signifikant erhöhte Anzahl an endogen entstandenen Dcx<sup>+</sup> NPC im ischämischen Striatum beobachten [Doeppner et al., 2009]. Dieser Befund war jedoch vielmehr als Folge einer TAT-Bcl-x<sub>L</sub> vermittelten Neuroprotektion auf endogene NPC denn als Stimulation einer neuronalen Differenzierung von NPC durch TAT-Bcl-x<sub>L</sub> zu interpretieren. Einhergehend mit der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> vermittelten Neuroprotektion auf NPC konnten Doeppner et al. zudem auch eine Reduktion der Peri-Infarktschädigung des post-ischämischen funktionellen Defizits beobachten.

Eine Verwendung von mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC nach zerebraler Ischämie *in vivo* fand in dieser Studie nicht statt und wurde in der Literatur bisher auch noch nicht beschrieben.

In der vorliegenden Studie wurden GFP<sup>+</sup> NPC zunächst mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> *in vitro* transduziert und nach Reduktion der post-ischämischen Inflammation am Tag 7 nach Schlaganfall (eigene nicht veröffentlichte Beobachtung) in das ischämische Striatum injiziert. Das Überleben der transplantierten Zellen wurde an den Tagen 7, 14 und 28 nach Injektion analysiert. Zu allen drei untersuchten Zeitpunkten konnten transplantierte NPC im ischämisch geschädigten Gewebe der Tiere detektiert werden. Die Zellen verblieben überwiegend im Bereich des Einstichkanals, jedoch zeigte sich auch eine geringfügige Migration der NPC in das geschädigte Areal (Abb. 12 A). Ursächlich hierfür mag die Freisetzung diverser Wachstumsfaktoren im ischämisch geschädigten Gewebe, wie z.B. *stem cell factor* (SCF), *heparin binding epidermal growth factor-like growth factor* (HB-EGF) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [Jin et al., 2002], sein. Viele dieser Faktoren haben chemotaktische Effekte, die bei der ischämieinduzierten Migration von NPC eine wichtige Rolle spielen [Faber-Elman et al., 1996]. Im Gegensatz zu einer systemischen Applikation von NPC, bei der trotz Sekretion dieser Faktoren nur ein kleiner Anteil der transplantierten Zellen das Infarktareal erreicht [Jin et al., 2004], ist eine ausgedehnte Migration von stereotaktisch applizierten NPC weder zu erwarten noch von Nöten; durch die lokale stereotaktische Injektion von NPC werden diese sehr nahe an das Infarktareal appliziert.

In beiden Behandlungsgruppen (native und transduzierte NPC) waren GFP<sup>+</sup> NPC bis zu 28d nach Transplantation im Gehirn nachweisbar (Abb. 12 B). Es zeigte sich jedoch – wie bereits beschrieben [Hicks et al., 2008] –, dass das Überleben dieser Zellen progredient über die Zeit hin abnahm. Während die Anzahl von nativen NPC stark abnahm, ließ sich in der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> Gruppe zu allen drei untersuchten Zeitpunkten eine deutlich höhere Überlebensrate aufweisen. Darüber hinaus war die Abnahme der Zellzahl über die Zeit im Vergleich zu den nativen NPC weniger stark ausgeprägt. Wenngleich auch die transplantierten NPC keiner direkten ischämischen Schädigung ausgesetzt waren (Transplantation am Tag sieben *nach* zerebraler Ischämie) so müssen die in Kap. 3.1.2 pathophysiologischen Mechanismen nach wie Berücksichtigung finden. Während der späte Zeitpunkt dieser Transplantation zu

einem Zeitpunkt der Reduktion der inflammatorischen Komponente (Maximum ca. Tag 4 nach Ischämie; eigene nicht veröffentlichte Beobachtung) erfolgte, spielen sich jedoch nach wie vor apoptotische Signalkaskaden ab. In dieser vulnerablen post-ischämischen Phase kann die anti-apoptotische Wirkung des Fusionsproteins TAT-Bcl-x<sub>L</sub> in den transduzierten Zellen einen neuroprotektiven Effekt ausüben. Nach zerebraler Ischämie kommt es intrazellulär aufgrund von pro-apoptotischen Stimuli zu einer Translokation des pro-apoptotischen Proteins BAX aus dem Zytosol in die Mitochondrien, welches zu einer Sekretion von Cytochrom c führt. Bcl-x<sub>L</sub> ist jedoch in der Lage mit BAX Heterodimere zu bilden, wodurch dessen Funktion antagonisiert wird [Chao et al., 1998]. Des Weiteren kann Bcl-x<sub>L</sub> an das zytosolische Protein APAF-1 binden, das erst durch die Bindung an Cytochrom c aktiviert wird (siehe Kapitel 3.1.2.5), und somit den durch die Überexpression von APAF-1 induzierten Apoptoseprozess blockieren. Somit kann APAF-1 nicht mehr an Procaspase-9 binden und in Folge dessen bleibt eine konsekutive Aktivierung dieser Initiatorcaspase aus [Gross et al., 1999]. Es ist vermutlich diese Blockierung von Signalkaskaden, die zu einer erhöhten Resistenz von mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC gegenüber einer hypoglykämisch-hypoxischen Schädigung *in vitro* und der höheren Überlebensrate transplantierte TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelte NPC *in vivo* im post-ischämischen Gewebe führt.

Zur Beurteilung der proliferativen Aktivität im adulten ZNS wurde der Proliferationsmarker BrdU verwendet (siehe Kapitel 5.1.10). Die NPC zeigten auch nach bis zu 28 Tagen nach Transplantation eine Proliferationsaktivität, die jedoch über den untersuchten Zeitraum tendenziell abnahm. Betrachtet man den prozentualen Anteil an BrdU<sup>+</sup> proliferativen Zellen, so ist der Anteil der nativ transplantierten NPC an Tag 14 nach Applikation im Vergleich zu den TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC signifikant erhöht (Abb. 13 B). Hingegen zeigt sich an Tag 7 und 28 kein signifikanter Unterschied mehr. Prüft man jedoch die absoluten Zahlen der BrdU<sup>+</sup> NPC, d.h. die Gesamtzahl der GFP<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> im ischämischen Striatum, zeigt sich eine deutlich erhöhte Anzahl an Zellen in der TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-Gruppe (Abb. 13 C). Gleichwohl zeigt sich jedoch in beiden Gruppen eine progrediente Abnahme der BrdU<sup>+</sup> NPC, jedoch ist diese bei der TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-Gruppe weniger ausgeprägt. Nicht mehr proliferierende, transplantierte Zellen – wenn sie nicht nach vorausgegangener Differenzierung in das neuronale Netzwerk integriert werden – gehen in der Regel sekundär u.a. durch apoptotischen Zelltod zu Grunde. So scheint die hier

beobachtete relative Erhöhung des Anteils BrdU<sup>+</sup> Zellen in der nicht behandelten (nativen) NPC Gruppe möglicherweise einer zu diesem Zeitpunkt vermehrt auftretenden Zellschädigung transplantierte Zellen zu schulden. Ein direkter auf die Proliferationsrate von transplantierten Zellen stimulierender Einfluss durch das anti-apoptotische Fusionsprotein TAT-Bcl-x<sub>L</sub> scheint eher unwahrscheinlich zu sein. In Folge dessen lässt sich auch die erhöhte absolute Anzahl an BrdU<sup>+</sup> NPC innerhalb der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> Gruppe durch den neuroprotektiven Effekt des Proteins auf transplantierte NPC erklären.

In den Differenzierungsanalysen von transplantierten NPC ließen sich in beiden Behandlungsgruppen eine Expression von Nestin, dem Marker für neurale Vorläuferzellen (Abb. 14 A), GFAP (Astrozyten, Abb. 15 A) und Dcx (immature Neuronen, Abb. 16 A) beobachten. In beiden Gruppen nahm über den untersuchten Zeitraum der relative Anteil Nestin<sup>+</sup> Zellen ab (Abb. 14 B). Obgleich der Anteil Nestin<sup>+</sup> NPC in der Gruppe der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC tendenziell höher lag, konnte an Tag 7 und 14 nach Transplantation zwischen beiden Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Erst an Tag 28 ist dieser Unterschied signifikant. Nestin ist ein Intermediärfilament, welches nur in immaturren neuronalen Zellen exprimiert wird [Cattaneo et al., 1990]. Differenzieren Zellen aus, wird die Expression des Proteins herunterreguliert und anschließend durch zelltypische Intermediärfilamente wie GFAP (in Astrozyten) oder Neurofilamente (in Neuronen) ersetzt [Espinosa-Jeffrey et al. 2002]. Passend zu der Expression von Nestin sind die Beobachtungen, dass zugleich mit der Abnahme des Anteils an undifferenzierten Nestin<sup>+</sup> Zellen eine Zunahme des Anteils an differenzierten GFAP<sup>+</sup> Astrozyten oder Dcx<sup>+</sup> immaturren Neuronen zu beobachten ist. Der Anteil an GFAP<sup>+</sup> Zellen ist mit bis zu 4% jedoch relativ gering (Abb. 15 B), ähnliche Werte (6%) werden allerdings auch in der Literatur beschrieben [Zhang et al., 2001]. An Tag 7 nach Injektion liegt der Anteil GFAP<sup>+</sup> Zellen in der Gruppe der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC signifikant höher. An Tag 14 und 28 sind die relativen Anteile in beiden Gruppen ähnlich. Auch der Anteil Dcx<sup>+</sup> Zellen nimmt über die Zeit zu, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 16 B). Betrachtet man jedoch die absolute Gesamtzahl Dcx<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen, so ist die Zahl an Tag 14 und 28 nach Injektion signifikant höher (Abb. 16 C). Dieser Effekt ist vermutlich auf die neuroprotektive Wirkung von TAT-Bcl-x<sub>L</sub> auf die transduzierten Zellen zurückzuführen. Ein direkter

Einfluss auf die Differenzierung der NPC durch TAT-Bcl-x<sub>L</sub> ist wahrscheinlich nicht die zugrunde liegende Erklärung.

Eine Differenzierung der NPC in mature Neuronen und Oligodendrozyten konnte nicht nachgewiesen werden. Es wurde mehrfach gezeigt, dass NPCs aus der SVZ sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage sind in mature Neuronen zu differenzieren [Yamashita et al., 2006; Arvidsson et al., 2002; Lois et al., 1993]. Die Diskrepanz zwischen den in der Literatur berichteten Daten und den hier erzielten Ergebnissen scheint jedoch Folge der kürzeren Beobachtungszeit von 28 Tagen zu sein. Möglicherweise sind länger Überlebenszeitpunkte nach Transplantation von NPC nötig, um eine neuronale Differenzierung von transplantierten NPC beobachten zu können. Auch Olstorn et al. [2007] berichtete von einer verlangsamten neuronalen Differenzierung der transplantierten NPC im Gegensatz zu *in vitro* Untersuchungen. Beobachtet wurde, dass selbst 16 Wochen nach Transplantation sich viele transplantierte Zellen noch im Differenzierungsprozess befanden.

Wie mehrfach bereits berichtet wurde führt die Applikation von NPC im Schlaganfallmodell zu einer Neuroprotektivität, die vermutlich ausgelöst wird durch die Sekretion verschiedener Faktoren [Kameda et al., 2007; Roitbak et al. 2008]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in einem Zeitraum von bis zu 28 Tagen nach Injektion der NPC in das ischämische Gewebe eine neuroprotektive Wirkung festgestellt werden. Dieser Effekt ließ sich in beiden Behandlungsgruppen darstellen. So konnten am Tag 7 nach Injektion 67 (native NPC) bzw. 69 (TAT-Bcl-x<sub>L</sub>-transduzierte NPC) TUNEL<sup>+</sup> Zellen pro mm<sup>2</sup> im Vergleich zu 223 TUNEL<sup>+</sup> Zellen pro mm<sup>2</sup> der PBS-Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 17 B). Am Tag 28 wurde die neuronale Dichte bestimmt (Abb. 17 C). Auch hier zeigte sich mit 439 (native NPC) bzw. 479 (TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierte NPC) NeuN<sup>+</sup> Zellen pro mm<sup>2</sup> zu 343 NeuN<sup>+</sup> Zellen pro mm<sup>2</sup> eine neuroprotektive Wirkung der NPC. Scheinbar ist die protektive Wirkung der NPC unabhängig von der Gesamtanzahl der im Gewebe noch vorhandenen transplantierten Zellen. Obwohl die Zahl nativer NPC zu allen untersuchten Zeitpunkten wesentlich geringer ist als bei den TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC, sind die Effekte auf die Neuroprotektivität nahezu gleich.

Der oben skizzierte neuroprotektive Effekt ging auch mit einem funktionell besserem „Outcome“ einher. Zur Untersuchung des sensomotorischen Defizits wurde der

Corner Turn Test, der sensitiv genug ist, um sehr geringe zerebrale Schädigungen zu detektieren [Li et al., 2004; Zhang et al. 2002], und nicht einer der gängigen Tests, wie z.B. Rota Rod, verwendet, da es zu einer vollständigen Spontanregeneration der Motorkoordination nach einer 30 minütigen Ischämie in diesem Test kommt [Doepfner et al., 2009]. So zeigte sich hier in der Gruppe der mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub>/NPC behandelten Tiere bereits an Tag 7 nach Injektion eine signifikante Verbesserung des sensomotorischen Defizits im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe (Abb. 18). Tiere, die mit nativen NPC behandelt wurden wiesen erst an Tag 14 eine signifikante Verbesserung auf. Dieser Effekt persistierte über den gesamten Versuchszeitraum, d.h. bis Tag 28 nach Injektion, hinweg. Da diese Wirkung auf die oben beschriebene Neuroprotektion zurückzuführen ist und nicht durch neurale Regeneration zu erklären ist, bleibt dennoch unklar weshalb es in der Gruppe der TAT-Bcl-x<sub>L</sub>/NPC behandelten Tiere im Vergleich zu den NPC (nativ) behandelten Tieren früher zu einer Verbesserung im Corner Turn Test kommt.

Eine zerebrale Ischämie beeinflusst sowohl die motorische Koordination als auch das Lernverhalten und räumliche Gedächtnis [Winter et al., 2004; Bendel et al., 2005]. Um diese Eigenschaften zu untersuchen wurden im Rahmen dieser Studie die verschiedenen Behandlungsgruppen einem modifizierten Water Maze ausgesetzt (Abb 19). Hierzu wurden die Tiere an Tag 26 und 27 nach Injektion in zwei Durchgängen (morgens und abends) pro Tag dem Test ausgesetzt, um die sich unter der Wasseroberfläche befindende Plattform zu erreichen. Es zeigte sich, dass alle Behandlungsgruppen sich von Durchgang zu Durchgang verbesserten und die Plattform öfter und schneller erreichten; ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen fand sich nicht. An Tag 28 nach Injektion wurde im ersten Durchgang die Plattform entfernt und in einem anderen Quadranten des Beckens aufgestellt. In diesem so genannten „Task-Switch“ verschlechterte sich wieder die Leistung der Tiere. Im zweiten Durchgang wurde die Plattform an die ursprüngliche Position zurückgestellt, woraufhin die Tiere wieder die Plattform schneller erreichten. Allerdings war hier zu erkennen, dass TAT-Bcl-x<sub>L</sub>/NPC behandelte Tiere die Plattform signifikant schneller erreichten als PBS-Kontrolltiere. Auch die Tiere, denen native NPC injiziert wurde, waren tendenziell schneller, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Dieser Effekt ist möglicherweise ebenso auf den neuroprotektiven Effekt der NPC (s.o.) zurückzuführen. Jedoch lässt sich dies nicht eindeutig belegen. An Lernprozessen ist hauptsächlich der Hippokampus

beteiligt [Silva et al., 1998]. Zum Hippokampus gehören mehrere Strukturen (Gyrus Dentatus, Cornu ammonis, Subiculum), weshalb man auch von einer Hippokampus-Formation spricht. Im Hippokampus fließen Informationen verschiedener sensorischer Systeme zusammen, die verarbeitet und von dort zum Kortex zurückgesandt werden. Bei Tieren hat der Hippokampus große Bedeutung für die räumliche Orientierung. Man nimmt an, dass die Umgebung im Hippokampus durch so genannte Platzzellen wie in einer Art „kognitiver Landkarte“ repräsentiert wird [Muller, 1996]. Dieser wird jedoch im Rahmen einer fokalen 30 min zerebralen Ischämie in der Regel nicht geschädigt, da die Läsion auf das Striatum begrenzt ist (eigene Beobachtung). Der diesen Resultaten zugrunde liegende Mechanismus bleibt daher letztlich unklar.

Wie oben bereits erwähnt spielt die Sekretion neurotropher Faktoren durch transplantierte NPC [Capone et al., 2007], eine wichtige Rolle in der Neuroprotektion nach einer zerebralen Ischämie. Die endogene Neurogenese nach einem Schlaganfall wird ebenfalls durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert. So zeigte z.B. Jin et al. [2002], dass in Folge von erhöhten FGF-2 und SCF Level eine gesteigerte Neurogenese in kortikalen Kulturen nach Hypoxie zu erkennen war. Auch BDNF [Pencea et al., 2001] und Erythropoietin (EPO) [Shingo et al., 2001] sind Faktoren, die bei der Modulation der Neurogenese nach zerebraler Ischämie eine Rolle spielen. Daher ist es ebenso denkbar, dass exogen applizierte NPC in größerem Maße Wachstumsfaktoren sezernieren, wodurch auf die endogene Neurogenese ein positiver Einfluss genommen wird und diese gesteigert wird. Um dies zu prüfen wurde den Tieren, wie in Kapitel 5.1.10 beschrieben, der Proliferationsmarker BrdU verabreicht. Die durch Proliferation entstandenen BrdU<sup>+</sup> Zellen in der ischämischen Hemisphäre wurden mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen quantitativ erfasst und auf ihren Differenzierungsgrad hin untersucht. Dabei wurden beide NPC-behandelten Gruppen mit Tieren verglichen, denen lediglich PBS injiziert wurde.

Die Transplantation von sowohl nativen als auch TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC zeigte weder auf die Proliferationsrate (Abb. 20) noch auf die Differenzierung in Nestin<sup>+</sup> neuralen Vorläuferzellen (Abb. 21) der endogenen, nicht GFP<sup>+</sup> Zellen, eine Wirkung. Lediglich die Erhöhung des prozentualen Anteils GFAP<sup>+</sup> astrozytärer Zellen im Pool der endogenen Vorläuferzellen konnte nach Applikation der NPC beobachtet

werden. Dieser Effekt steht vermutlich mit der Funktion von GFAP<sup>+</sup> Astrozyten im Zusammenhang. Astrozyten bieten als reaktive Spezies bei einer zerebralen Ischämie der Penumbra Schutz, indem sie die Gewebestruktur durch Glianarbenbildung erhalten [Li et al., 2008; Myer et al., 2006]. Jedoch ist auch bekannt, dass die Regeneration von geschädigten Neuronen durch Astrozyten gestört wird. So zeigte Widstrand et al. [2007], dass die Injektion von NPC in den Hippokampus GFAP<sup>-/-</sup>Vim<sup>-/-</sup> Mäuse zu einer verminderten Glianarbenbildung führt. Interessanterweise konnte hier auch beobachtet werden, dass mehr transplantierte NPC über einen längeren Zeitraum überleben und ausdifferenzieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es bei einer Ko-Kultur von GFAP<sup>-/-</sup>Vim<sup>-/-</sup> Astrozyten und NPC zu einer um 65% erhöhten Neurogenese kommt. Die durch NPC hervorgerufene erhöhte Bildung GFAP<sup>+</sup> Zellen führt möglicherweise dazu, dass die Proliferation der Zellen vermindert wird und transplantierte Zellen über die Zeit zugrunde gehen.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit war das Überleben transplantierter NPC zu verbessern, um somit die Möglichkeit zu schaffen eine post-ischämische neurale Regeneration zu generieren unter Berücksichtigung der neuronalen Differenzierung. Für diesen Aspekt ist die Gesamtbetrachtung der neuronalen Proliferation (endogene BrdU<sup>+</sup> und GFP<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> Zellen) und der neuronalen Vorläuferzellen von Wichtigkeit. Die Applikation von NPC hatte auf die Gesamtzahl BrdU<sup>+</sup> Zellen keine bedeutende Auswirkung (Abb. 23 A). Jedoch ist bei der Anzahl Nestin<sup>+</sup>/BrdU<sup>+</sup> inklusive der Nestin<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> Zellen ein erheblicher Effekt zu sehen (Abb. 23 B). So führt die Transduktion der NPC mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> zu einer signifikant höheren Gesamtzahl an Nestin<sup>+</sup> Zellen zu allen drei Zeitpunkten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Ähnliche Ergebnisse sind bei der Differenzierung in immature Dcx<sup>+</sup> Neuronen zu sehen (Abb. 23 C). So zeigte sich auch hier, dass die zusätzliche Transplantation von mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierten NPC zu einer signifikant erhöhten Gesamtzahl im Vergleich zu der Gruppe unbehandelter NPC und der PBS-Kontrollgruppe (an Tag 7 und 28) führt. Diese beiden herausragenden Resultate sind auf die Applikation von mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> behandelten NPC zurückzuführen. Bei Behandlung mit nativen NPC sind die Gesamtzahlen sowohl bei den Nestin<sup>+</sup> Zellen als auch bei den Dcx<sup>+</sup> Zellen zwar tendenziell höher, jedoch ohne signifikanten Unterschied zur PBS-Gruppe. Der Schluss liegt nahe, dass dieser beobachtete Effekt in engem Zusammenhang mit der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> bedingten Neuroprotektion steht (s.o.).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch Verwendung von TAT-Bcl-x<sub>L</sub> das Überleben von NPC sowohl nach Hypoxie-Hypoglykämie *in vitro* als auch nach *in vivo* Transplantation im Schlaganfallmodell der Maus signifikant verbessert wird. Die TAT-Bcl-x<sub>L</sub> vermittelte Neuroprotektion führte auch zu einer signifikant erhöhten Anzahl von Dcx<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> neuronalen Vorläuferzellen im ischämisch geschädigten Areal. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung nach einer zerebralen Ischämie mit NPC zu einer erheblichen Steigerung der absoluten Anzahl neuronaler Vorläuferzellen (Nestin<sup>+</sup> Zellen, Abb. 23 B) und immaturren Neuronen (Dcx<sup>+</sup> Zellen, Abb. 23 C) führt. Einhergehend mit der NPC-Behandlung konnte darüber hinaus eine Reduktion der post-ischämischen Zellschädigung im Peri-Infarktgebiet festgestellt werden, welche sich auch in einer Reduktion des post-ischämischen funktionellen Defizits widerspiegelte. Da jedoch eine neuronale Differenzierung sowohl von transplantierten als auch endogenen Vorläuferzellen im Untersuchungszeitraum nicht nachgewiesen werden konnte, sind weitere Studien mit längeren Überlebenszeiträumen der Versuchstiere nötig.

## 8.1. Zusammenfassung

Die endogene Neurogenese persistiert auch im adulten Gehirn. Nach Induktion einer zerebralen Ischämie kommt es im Nagerhirn zur Stimulierung dieser endogenen Neurogenese und neurale Vorläuferzellen (NPC) migrieren aus der Subventrikulärzone der Seitenventrikel in das ischämische Areal, tragen jedoch nicht entscheidend zur post-ischämischen Neuroprotektion oder -regeneration bei. Daher könnte die lokale Applikation exogener, adulter NPC in das ischämische Läsionsareal eine geeignete Therapiestrategie sein. Da jedoch die Mehrzahl dieser Zellen innerhalb weniger Wochen nach Transplantation in den (apoptotischen) Zelltod mündet, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit kultivierte NPC *in vitro* mit dem membranpermeablen und anti-apoptotischen Fusionsprotein TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduziert. Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Untersuchung von Überleben, Migration und Differenzierung transplantierte, transduzierte GFP<sup>+</sup>-NPC im Vergleich zu unbehandelten/nativen NPC nach Induktion einer transienten fokalen zerebralen Ischämie der Maus (Fadenokklusionsmodell) in einem Zeitraum von bis zu 28 Tagen nach Transplantation (Tag 7 nach Ischämie). In einem zweiten Schritt wurden neuroprotektive Effekte (einschließlich Untersuchungen zum funktionellen „Outcome“) sowie Effekte auf die endogene Neurogenese nach stereotaktischer Transplantation von transduzierten/nativen NPC im Vergleich zu PBS-Kontrollgruppen analysiert. Es zeigte sich zunächst unter *in vitro* Bedingungen, dass die Transduktion von NPC mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> nach Hypoxie-Hypoglykämie zu einer signifikant reduzierten Zellschädigung führte. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass transduzierte GFP<sup>+</sup>-NPC eine signifikant höhere Überlebensrate nach Transplantation haben als unbehandelte NPC; zu allen untersuchten Zeitpunkten (Tag 7, 14 und 28 nach Transplantation) war die Anzahl GFP<sup>+</sup>-NPC in der Behandlungsgruppe signifikant höher. Während die Transduktion von NPC mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> keinen Einfluss auf deren relative Proliferationsaktivität hatte (Anzahl an BrdU<sup>+</sup> Zellen), exprimierten transduzierte NPC signifikant vermehrt den immaturren neuronalen Marker Doublecortin (Dcx). Dieser Effekt ließ sich jedoch eher als Folge der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> vermittelten Neuroprotektion auf NPC denn einer stimulierten neuronalen Differenzierung von NPC erklären. Eine Expression des neuronalen Markers NeuN konnte jedoch zu keinem analysierten Zeitpunkt nachgewiesen werden. Die Transplantation von NPC (sowohl nativ als auch transduziert) war

darüber hinaus mit einer Reduktion der postischämischen Zellschädigung im Vergleich zu PBS-Kontrollgruppen behaftet, wie anhand der verminderten Anzahl TUNEL<sup>+</sup> Zellen am Tag 7 bzw. erhöhten neuronalen Dichte am Tag 28 nach Transplantation zu sehen war. Einhergehend mit dieser NPC-vermittelten Neuroprotektion zeigten sich im so genannten Corner Turn bzw. Water Maze Test eine Reduktion des post-ischämischen funktionellen Defizits in der NPC-TAT-Bcl-x<sub>L</sub> und der NPC-nativ Gruppe, bei letzterer jedoch weniger ausgeprägt. Hingegen hatte die Behandlung mit NPC (transduziert/nativ) keinen nennenswerten Einfluss auf Überleben oder neuronale Differenzierung von post-ischämisch endogen entstandenen NPC. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit TAT-Bcl-x<sub>L</sub> zu einer signifikant erhöhten Resistenz von NPC nach Hypoxie bzw. Ischämie führt ohne jedoch Proliferation oder Differenzierung dieser Zellen nennenswert zu beeinflussen. Einhergehend damit konnte in der TAT-Bcl-x<sub>L</sub> Gruppe zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikant erhöhte Gesamtzahl an Dcx<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zur nativen NPC bzw. PBS Gruppe beobachtet werden. Hingegen führte die Therapie mit NPC nach zerebraler Ischämie in beiden NPC Gruppen zu einer signifikanten Reduktion der post-ischämischen Zellschädigung und einem verbesserten funktionellen „Outcome“ der Versuchstiere.

## 8.2. Summary

Increased endogenous neurogenesis can be observed after cerebral ischemia in mice, but fails to significantly contribute to neural regeneration or integration. Therefore, the local application of exogenous subventricular zone (SVZ)-derived neural progenitor cells (NPC) might be a useful therapeutic tool to ameliorate post-ischemic injury. Since the survival of transplanted NPC is known to be poor, cultivated NPC were *in vitro* transduced with the membrane-permeable and anti-apoptotic fusion protein TAT-Bcl-x<sub>L</sub> to achieve a higher survival rate of transplanted NPC after cerebral ischemia. The aim of this study was therefore to i.) analyse survival, migration and differentiation of transplanted NPC (transduced and native) and ii.) to study NPC-mediated effects both on peri-infarct cell injury and functional outcome and also on endogenous neurogenesis after cerebral ischemia compared to PBS control mice. Focal cerebral ischemia was induced by means of transient occlusion of the left middle cerebral artery (MCAO) in adult male mice. Seven days after MCAO, SVZ-derived GFP<sup>+</sup> NPC were stereotactically transplanted into the ischemic striatum. Animals were given BrdU from day 8 (after ischemia) until the end of each experiment for analysis of proliferation. At days 7, 14 and 28 after transplantation animals were sacrificed and brain sections used for immunohistochemical analysis. To study TAT-Bcl-x<sub>L</sub> mediated effects on cultivated NPC, cells were exposed to an oxygen-glucose-deprivation test (OGD) and cell injury was assessed using a Live/Dead Viability test.

Preincubation of cultivated NPC with TAT-Bcl-x<sub>L</sub> significantly reduced cell injury after OGD *in vitro* compared to non-transduced (native) cells. *In vivo* studies revealed that transplanted NPC showed a tendency of migration towards the lesion site and co-expressed the markers Dcx<sup>+</sup> (immature neurons), GFAP<sup>+</sup> (astroglia) and Nestin<sup>+</sup> (neural marker); no co-expression with the neuronal marker NeuN or the oligodendroglial marker CNPase was detected at any time point. However, the total number of transplanted GFP<sup>+</sup> cells, which were pre-incubated with TAT-Bcl-x<sub>L</sub>, was significantly higher at all time-points investigated compared to non-treated NPC. No difference with regard to the relative proliferative activity of transplanted NPC was observed, i.e. the number of BrdU<sup>+</sup> cells did not change significantly between the treatment groups. Furthermore, there was no relevant influence on post-ischemic endogenous neurogenesis after transplantation of NPC observable.

Transplantation of NPC (native/transduced) also lead to neuroprotection within the peri-infarct area, which was demonstrated by less TUNEL<sup>+</sup> cells on day 7 and a higher number of NeuN<sup>+</sup> cells on day 28 after transplantation. This neuroprotection was attended by a better functional outcome, i.e. a better test performance in the Corner Turn Test (for sensorimotor deficits) for both animals treated with native and transduced NPC. In addition, animals treated with transduced NPC significantly performed better in a modified Morris Water Maze (test for learning and spatial memory capabilities); after the task switch animals reached the platform significantly faster than animals given native NPC or PBS.

---

## 9. Literaturverzeichnis

- Alonso de Lecinana, M., E. Diez-Tejedor, M. Gutierrez, S. Guerrero, F. Carceller and J. M. Roda (2005).** "New goals in ischemic stroke therapy: the experimental approach--harmonizing science with practice." Cerebrovasc Dis **20 Suppl 2**: 159-68.
- Altman, J. and S. A. Bayer (1990).** "Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells." J Comp Neurol **301**(3): 325-42.
- Altman, J. and G. D. Das (1965).** "Post-natal origin of microneurons in the rat brain." Nature **207**(5000): 953-6.
- Alvarez-Buylla, A. and J. M. Garcia-Verdugo (2002).** "Neurogenesis in adult subventricular zone." J Neurosci **22**(3): 629-34.
- Alvarez-Buylla, A. and C. Lois (1995).** "Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrates." Stem Cells **13**(3): 263-72.
- Andsberg, G., Z. Kokaia, A. Bjorklund, O. Lindvall and A. Martinez-Serrano (1998).** "Amelioration of ischaemia-induced neuronal death in the rat striatum by NGF-secreting neural stem cells." Eur J Neurosci **10**(6): 2026-36.
- Arvidsson, A., T. Collin, D. Kirik, Z. Kokaia and O. Lindvall (2002).** "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke." Nat Med **8**(9): 963-70.
- Back, T., J. G. Hirsch, K. Szabo and A. Gass (2000).** "Failure to demonstrate peri-infarct depolarizations by repetitive MR diffusion imaging in acute human stroke." Stroke **31**(12): 2901-6.
- Baldauf, K. and K. G. Reymann (2005).** "Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia." Brain Res **1056**(2): 158-67.
- Barker, R. A. and T. Foltynie (2004).** "The future challenges in Parkinson's disease." J Neurol **251**(3): 361-5.
- Bendel, O., T. Bueters, M. von Euler, S. Ove Ogren, J. Sandin and G. von Euler (2005).** "Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory." J Cereb Blood Flow Metab **25**(12): 1586-95.

- Bez, A., E. Corsini, D. Curti, M. Biggiogera, A. Colombo, R. F. Nicosia, S. F. Pagano and E. A. Parati (2003).** "Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization." Brain Res **993**(1-2): 18-29.
- Bjorklund, A. and U. Stenevi (1979).** "Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants." Brain Res **177**(3): 555-60.
- Bjorklund, A., U. Stenevi, R. H. Schmidt, S. B. Dunnett and F. H. Gage (1983).** "Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites." Acta Physiol Scand Suppl **522**: 9-18.
- Borlongan, C. V., S. Saporta, S. G. Poulos, A. Othberg and P. R. Sanberg (1998).** "Viability and survival of hNT neurons determine degree of functional recovery in grafted ischemic rats." Neuroreport **9**(12): 2837-42.
- Broderick, J. P. and W. Hacke (2002).** "Treatment of acute ischemic stroke: Part I: recanalization strategies." Circulation **106**(12): 1563-9.
- Cameron, H. A., C. S. Woolley, B. S. McEwen and E. Gould (1993).** "Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat." Neuroscience **56**(2): 337-44.
- Cao, G., W. Pei, H. Ge, Q. Liang, Y. Luo, F. R. Sharp, A. Lu, R. Ran, S. H. Graham and J. Chen (2002).** "In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis." J Neurosci **22**(13): 5423-31.
- Capone, C., S. Frigerio, S. Fumagalli, M. Gelati, M. C. Principato, C. Storini, M. Montinaro, R. Kraftsik, M. De Curtis, E. Parati and M. G. De Simoni (2007).** "Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment." PLoS ONE **2**(4): e373.
- Cattaneo, E. and R. McKay (1990).** "Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor." Nature **347**(6295): 762-5.
- Chao, D. T. and S. J. Korsmeyer (1998).** "BCL-2 family: regulators of cell death." Annu Rev Immunol **16**: 395-419.
- Chen, J., P. R. Sanberg, Y. Li, L. Wang, M. Lu, A. E. Willing, J. Sanchez-Ramos and M. Chopp (2001).** "Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats." Stroke **32**(11): 2682-8.

- Chen, R.** and N. Ende (2000). "The potential for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1 mice." J Med **31**(1-2): 21-30.
- Craig, C. G., V. Tropepe, C. M. Morshead, B. A. Reynolds, S. Weiss and D. van der Kooy (1996).** "In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain." J Neurosci **16**(8): 2649-58.
- DeGracia, D. J., R. Kumar, C. R. Owen, G. S. Krause and B. C. White (2002).** "Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death." J Cereb Blood Flow Metab **22**(2): 127-41.
- del Zoppo, G. J., G. W. Schmid-Schonbein, E. Mori, B. R. Copeland and C. M. Chang (1991).** "Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons." Stroke **22**(10): 1276-83.
- Diem, R., N. Taheri, G. P. Dietz, A. Kuhnert, K. Maier, M. B. Sattler, I. Gadjanski, D. Merkler and M. Bahr (2005).** "HIV-Tat-mediated Bcl-XL delivery protects retinal ganglion cells during experimental autoimmune optic neuritis." Neurobiol Dis **20**(2): 218-26.
- Dietz, G. P. and M. Bahr (2004).** "Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach." Mol Cell Neurosci **27**(2): 85-131.
- Dietz, G. P., E. Kilic and M. Bahr (2002).** "Inhibition of neuronal apoptosis in vitro and in vivo using TAT-mediated protein transduction." Mol Cell Neurosci **21**(1): 29-37.
- Dirnagl, U., C. Iadecola and M. A. Moskowitz (1999).** "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-7.
- Doetsch, F., I. Caille, D. A. Lim, J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1999).** "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." Cell **97**(6): 703-16.
- Doetsch, F., J. M. Garcia-Verdugo and A. Alvarez-Buylla (1997).** "Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain." J Neurosci **17**(13): 5046-61.

- Doepfner**, T. R., Dietz, G.P., El Aanbouri, M., Gerber, J, Witte, O.W., Bahr, M. and Weise.,J. (2009) "TAT-Bcl-x(L) improves survival of neuronal precursor cells in the lesioned striatum after focal cerebral ischemia." Neurobiol Dis **34**(1): 87-94
- Du**, C., R. Hu, C. A. Csernansky, C. Y. Hsu and D. W. Choi (1996). "Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis?" J Cereb Blood Flow Metab **16**(2): 195-201.
- Duman**, R. S., J. Malberg and S. Nakagawa (2001). "Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress." J Pharmacol Exp Ther **299**(2): 401-7.
- Espinosa-Jeffrey**, A., S. G. Becker-Catania, P. M. Zhao, R. Cole, J. Edmond and J. de Vellis (2002). "Selective specification of CNS stem cells into oligodendroglial or neuronal cell lineage: cell culture and transplant studies." J Neurosci Res **69**(6): 810-25.
- Faber-Elman**, A., A. Solomon, J. A. Abraham, M. Marikovsky and M. Schwartz (1996). "Involvement of wound-associated factors in rat brain astrocyte migratory response to axonal injury: in vitro simulation." J Clin Invest **97**(1): 162-71.
- Fischer**, R., M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel and R. Brock (2005). "Break on through to the other side-biophysics and cell biology shed light on cell-penetrating peptides." Chembiochem **6**(12): 2126-42.
- Forster**, C., H. B. Clark, M. E. Ross and C. Iadecola (1999). "Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts." Acta Neuropathol **97**(3): 215-20.
- Frankel**, A. D. and C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." Cell **55**(6): 1189-93.
- Freed**, C. R., P. E. Greene, R. E. Breeze, W. Y. Tsai, W. DuMouchel, R. Kao, S. Dillon, H. Winfield, S. Culver, J. Q. Trojanowski, D. Eidelberg and S. Fahn (2001). "Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease." N Engl J Med **344**(10): 710-9.
- Freeman**, T. B., C. W. Olanow, R. A. Hauser, G. M. Nauert, D. A. Smith, C. V. Borlongan, P. R. Sanberg, D. A. Holt, J. H. Kordower, F. J. Vingerhoets and et al. (1995). "Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease." Ann Neurol **38**(3): 379-88.

- Galli, R., A. Gritti, L. Bonfanti and A. L. Vescovi (2003).** "Neural stem cells: an overview." Circ Res **92**(6): 598-608.
- Garbuzova-Davis, S., A. E. Willing, M. Milliken, S. Saporta, T. Zigova, D. W. Cahill and P. R. Sanberg (2002).** "Positive effect of transplantation of hNT neurons (NTera 2/D1 cell-line) in a model of familial amyotrophic lateral sclerosis." Exp Neurol **174**(2): 169-80.
- Garbuzova-Davis, S., A. E. Willing, T. Zigova, S. Saporta, E. B. Justen, J. C. Lane, J. E. Hudson, N. Chen, C. D. Davis and P. R. Sanberg (2003).** "Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation." J Hematother Stem Cell Res **12**(3): 255-70.
- Garcia-Verdugo, J. M., F. Doetsch, H. Wichterle, D. A. Lim and A. Alvarez-Buylla (1998).** "Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells." J Neurobiol **36**(2): 234-48.
- Grabowski, M., P. Brundin and B. B. Johansson (1992).** "Fetal neocortical grafts implanted in adult hypertensive rats with cortical infarcts following a middle cerebral artery occlusion: ingrowth of afferent fibers from the host brain." Exp Neurol **116**(2): 105-21.
- Graham, S. H. and J. Chen (2001).** "Programmed cell death in cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **21**(2): 99-109.
- Green, M. and P. M. Loewenstein (1988).** "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." Cell **55**(6): 1179-88.
- Gritti, A., P. Frolichsthal-Schoeller, R. Galli, E. A. Parati, L. Cova, S. F. Pagano, C. R. Bjornson and A. L. Vescovi (1999).** "Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain." J Neurosci **19**(9): 3287-97.
- Gross, A. (2001).** "BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program." IUBMB Life **52**(3-5): 231-6.
- Hacke, W., G. Albers, Y. Al-Rawi, J. Bogousslavsky, A. Davalos, M. Eliasziw, M. Fischer, A. Furlan, M. Kaste, K. R. Lees, M. Soehngen and S. Warach (2005).** "The Desmoteplase in Acute Ischemic Stroke Trial (DIAS): a phase II MRI-

- based 9-hour window acute stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase." Stroke **36**(1): 66-73.
- Haring**, H. P., E. L. Berg, N. Tsurushita, M. Tagaya and G. J. del Zoppo (1996). "E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia." Stroke **27**(8): 1386-91; discussion 1391-2.
- Hicks**, A. U., C. L. MacLellan, G. A. Chernenko and D. Corbett (2008). "Long-term assessment of enriched housing and subventricular zone derived cell transplantation after focal ischemia in rats." Brain Res **1231**: 103-12.
- Hu**, W. H., H. Johnson and H. B. Shu (1999). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways." J Biol Chem **274**(43): 30603-10.
- Iadecola**, C., C. A. Salkowski, F. Zhang, T. Aber, M. Nagayama, S. N. Vogel and M. E. Ross (1999). "The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury." J Exp Med **189**(4): 719-27.
- Ihrie**, R. A. and A. Alvarez-Buylla (2008). "Cells in the astroglial lineage are neural stem cells." Cell Tissue Res **331**(1): 179-91.
- Izmailova**, E., F. M. Bertley, Q. Huang, N. Makori, C. J. Miller, R. A. Young and A. Aldovini (2003). "HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages." Nat Med **9**(2): 191-7.
- Janson**, C. G., T. M. Ramesh, M. J. During, P. Leone and J. Heywood (2001). "Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis." J Hematother Stem Cell Res **10**(6): 913-5.
- Jin**, K., X. O. Mao, Y. Sun, L. Xie, L. Jin, E. Nishi, M. Klagsbrun and D. A. Greenberg (2002). "Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor: hypoxia-inducible expression in vitro and stimulation of neurogenesis in vitro and in vivo." J Neurosci **22**(13): 5365-73.
- Jin**, K., M. Minami, J. Q. Lan, X. O. Mao, S. Batteur, R. P. Simon and D. A. Greenberg (2001). "Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(8): 4710-5.
- Kalluri**, H. S. and R. J. Dempsey (2008). "Growth factors, stem cells, and stroke." Neurosurg Focus **24**(3-4): E14.

- Kameda**, M., T. Shingo, K. Takahashi, K. Muraoka, K. Kurozumi, T. Yasuhara, T. Maruo, T. Tsuboi, T. Uozumi, T. Matsui, Y. Miyoshi, H. Hamada and I. Date (2007). "Adult neural stem and progenitor cells modified to secrete GDNF can protect, migrate and integrate after intracerebral transplantation in rats with transient forebrain ischemia." Eur J Neurosci **26**(6): 1462-78.
- Katsura**, K., T. Kristian and B. K. Siesjo (1994). "Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain." Biochem Soc Trans **22**(4): 991-6.
- Kilic**, E., G. P. Dietz, D. M. Hermann and M. Bahr (2002). "Intravenous TAT-Bcl-XL is protective after middle cerebral artery occlusion in mice." Ann Neurol **52**(5): 617-22.
- Kilpatrick**, T. J. and P. F. Bartlett (1993). "Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation." Neuron **10**(2): 255-65.
- Kokaia**, Z. and O. Lindvall (2003). "Neurogenesis after ischaemic brain insults." Curr Opin Neurobiol **13**(1): 127-32.
- Kondziolka**, D., L. Wechsler, S. Goldstein, C. Meltzer, K. R. Thulborn, J. Gebel, P. Jannetta, S. DeCesare, E. M. Elder, M. McGrogan, M. A. Reitman and L. Bynum (2000). "Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke." Neurology **55**(4): 565-9.
- Kordower**, J. H., T. B. Freeman, B. J. Snow, F. J. Vingerhoets, E. J. Mufson, P. R. Sanberg, R. A. Hauser, D. A. Smith, G. M. Nauert, D. P. Perl and et al. (1995). "Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease." N Engl J Med **332**(17): 1118-24.
- Kordower**, J. H., J. M. Rosenstein, T. J. Collier, M. A. Burke, E. Y. Chen, J. M. Li, L. Martel, A. E. Levey, E. J. Mufson, T. B. Freeman and C. W. Olanow (1996). "Functional fetal nigral grafts in a patient with Parkinson's disease: chemoanatomic, ultrastructural, and metabolic studies." J Comp Neurol **370**(2): 203-30.
- Krause**, G. S., N. R. Nayini, B. C. White, T. J. Hoehner, A. M. Garritano, B. J. O'Neil and S. D. Aust (1987). "Natural course of iron delocalization and lipid peroxidation during the first eight hours following a 15-minute cardiac arrest in dogs." Ann Emerg Med **16**(11): 1200-5.

- Lagace**, D. C., M. C. Whitman, M. A. Noonan, J. L. Ables, N. A. DeCarolis, A. A. Arguello, M. H. Donovan, S. J. Fischer, L. A. Farnbauch, R. D. Beech, R. J. DiLeone, C. A. Greer, C. D. Mandyam and A. J. Eisch (2007). "Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis." J Neurosci **27**(46): 12623-9.
- Lam**, M., G. Dubyak, L. Chen, G. Nunez, R. L. Miesfeld and C. W. Distelhorst (1994). "Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6569-73.
- Lawrence**, M. S., J. R. McLaughlin, G. H. Sun, D. Y. Ho, L. McIntosh, D. M. Kunis, R. M. Sapolsky and G. K. Steinberg (1997). "Herpes simplex viral vectors expressing Bcl-2 are neuroprotective when delivered after a stroke." J Cereb Blood Flow Metab **17**(7): 740-4.
- Leist**, M. and P. Nicotera (1998). "Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology." Exp Cell Res **239**(2): 183-201.
- Li**, L., A. Lundkvist, D. Andersson, U. Wilhelmsson, N. Nagai, A. C. Pardo, C. Nodin, A. Stahlberg, K. Aprico, K. Larsson, T. Yabe, L. Moons, A. Fotheringham, I. Davies, P. Carmeliet, J. P. Schwartz, M. Pekna, M. Kubista, F. Blomstrand, N. Maragakis, M. Nilsson and M. Pekny (2008). "Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **28**(3): 468-81.
- Li**, X., K. K. Blizzard, Z. Zeng, A. C. DeVries, P. D. Hurn and L. D. McCullough (2004). "Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender." Exp Neurol **187**(1): 94-104.
- Li**, Y., M. Chopp, N. Jiang and C. Zaloga (1995). "In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice." Brain Res Mol Brain Res **28**(1): 164-8.
- Lindsberg**, P. J., J. M. Hallenbeck and G. Feuerstein (1991). "Platelet-activating factor in stroke and brain injury." Ann Neurol **30**(2): 117-29.
- Lindvall**, O. (1994). "Clinical application of neuronal grafts in Parkinson's disease." J Neurol **242**(1 Suppl 1): S54-6.
- Linnik**, M. D., P. Zahos, M. D. Geschwind and H. J. Federoff (1995). "Expression of bcl-2 from a defective herpes simplex virus-1 vector limits neuronal death in focal cerebral ischemia." Stroke **26**(9): 1670-4; discussion 1675.
- Llado**, J., C. Haenggeli, N. J. Maragakis, E. Y. Snyder and J. D. Rothstein (2004). "Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and

- promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors." Mol Cell Neurosci **27**(3): 322-31.
- Lois**, C. and A. Alvarez-Buylla (1994). "Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain." Science **264**(5162): 1145-8.
- Luskin**, M. B. (1993). "Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone." Neuron **11**(1): 173-89.
- MacManus**, J. P. and A. M. Buchan (2000). "Apoptosis after experimental stroke: fact or fashion?" J Neurotrauma **17**(10): 899-914.
- Martinez-Vila**, E. and P. Irimia (2005). "Challenges of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke treatment." Cerebrovasc Dis **20 Suppl 2**: 148-58.
- Martinou**, J. C., M. Dubois-Dauphin, J. K. Staple, I. Rodriguez, H. Frankowski, M. Missotten, P. Albertini, D. Talabot, S. Catsicas, C. Pietra and et al. (1994). "Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia." Neuron **13**(4): 1017-30.
- Mattsson**, B., J. C. Sorensen, J. Zimmer and B. B. Johansson (1997). "Neural grafting to experimental neocortical infarcts improves behavioral outcome and reduces thalamic atrophy in rats housed in enriched but not in standard environments." Stroke **28**(6): 1225-31; discussion 1231-2.
- Mazzini**, L., F. Fagioli, R. Boccaletti, K. Mareschi, G. Oliveri, C. Olivieri, I. Pastore, R. Marasso and E. Madon (2003). "Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans." Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord **4**(3): 158-61.
- Menezes**, J. R., C. M. Smith, K. C. Nelson and M. B. Luskin (1995). "The division of neuronal progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain." Mol Cell Neurosci **6**(6): 496-508.
- Mies**, G., T. Iijima and K. A. Hossmann (1993). "Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat." Neuroreport **4**(6): 709-11.
- Morris**, R. (1984). "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat." J Neurosci Methods **11**(1): 47-60.
- Myer**, D. J., G. G. Gurkoff, S. M. Lee, D. A. Hovda and M. V. Sofroniew (2006). "Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury." Brain **129**(Pt 10): 2761-72.

- Nagata**, S. and P. Golstein (1995). "The Fas death factor." Science **267**(5203): 1449-56.
- Nakatomi**, H., T. Kuriu, S. Okabe, S. Yamamoto, O. Hatano, N. Kawahara, A. Tamura, T. Kirino and M. Nakafuku (2002). "Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors." Cell **110**(4): 429-41.
- Neumar**, R. W., D. J. DeGracia, L. L. Konkoly, J. I. Khoury, B. C. White and G. S. Krause (1998). "Calpain mediates eukaryotic initiation factor 4G degradation during global brain ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **18**(8): 876-81.
- O'Neill**, L. A. and C. Kaltschmidt (1997). "NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function." Trends Neurosci **20**(6): 252-8.
- Ocbina**, P. J., M. L. Dizon, L. Shin and F. G. Szele (2006). "Doublecortin is necessary for the migration of adult subventricular zone cells from neurospheres." Mol Cell Neurosci **33**(2): 126-35.
- Olanow**, C. W., C. G. Goetz, J. H. Kordower, A. J. Stoessl, V. Sossi, M. F. Brin, K. M. Shannon, G. M. Nauert, D. P. Perl, J. Godbold and T. B. Freeman (2003). "A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease." Ann Neurol **54**(3): 403-14.
- Olstorn**, H., M. C. Moe, G. K. Roste, T. Bueters and I. A. Langmoen (2007). "Transplantation of stem cells from the adult human brain to the adult rat brain." Neurosurgery **60**(6): 1089-98; discussion 1098-9.
- Pain**, V. M. (1996). "Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells." Eur J Biochem **236**(3): 747-71.
- Parent**, J. M., Z. S. Vexler, C. Gong, N. Derugin and D. M. Ferriero (2002). "Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke." Ann Neurol **52**(6): 802-13.
- Parent**, J. M., T. W. Yu, R. T. Leibowitz, D. H. Geschwind, R. S. Sloviter and D. H. Lowenstein (1997). "Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus." J Neurosci **17**(10): 3727-38.
- Park**, C. K., D. G. Nehls, D. I. Graham, G. M. Teasdale and J. McCulloch (1988). "The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat." Ann Neurol **24**(4): 543-51.
- Paxinos**, G. and Franklin, K.B.J. (2001) "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates -second edition-" Academic Press

- Pencea, V., K. D. Bingaman, S. J. Wiegand and M. B. Luskin (2001).** "Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus." J Neurosci **21**(17): 6706-17.
- Perlow, M. J., W. J. Freed, B. J. Hoffer, A. Seiger, L. Olson and R. J. Wyatt (1979).** "Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system." Science **204**(4393): 643-7.
- Piccini, P., D. J. Brooks, A. Bjorklund, R. N. Gunn, P. M. Grasby, O. Rimoldi, P. Brundin, P. Hagell, S. Rehncrona, H. Widner and O. Lindvall (1999).** "Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient." Nat Neurosci **2**(12): 1137-40.
- Piccini, P., O. Lindvall, A. Bjorklund, P. Brundin, P. Hagell, R. Ceravolo, W. Oertel, N. Quinn, M. Samuel, S. Rehncrona, H. Widner and D. J. Brooks (2000).** "Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts." Ann Neurol **48**(5): 689-95.
- Planas, A. M., M. A. Soriano, M. Berruezo, C. Justicia, A. Estrada, S. Pitarch and I. Ferrer (1996).** "Induction of Stat3, a signal transducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischaemia." Eur J Neurosci **8**(12): 2612-8.
- Pluchino, S., A. Quattrini, E. Brambilla, A. Gritti, G. Salani, G. Dina, R. Galli, U. Del Carro, S. Amadio, A. Bergami, R. Furlan, G. Comi, A. L. Vescovi and G. Martino (2003).** "Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis." Nature **422**(6933): 688-94.
- Rietze, R. L. and B. A. Reynolds (2006).** "Neural stem cell isolation and characterization." Methods Enzymol **419**: 3-23.
- Rogalewski, A., A. Schneider, E. B. Ringelstein and W. R. Schabitz (2006).** "Toward a multimodal neuroprotective treatment of stroke." Stroke **37**(4): 1129-36.
- Roitbak, T., L. Li and L. A. Cunningham (2008).** "Neural stem/progenitor cells promote endothelial cell morphogenesis and protect endothelial cells against ischemia via HIF-1 $\alpha$ -regulated VEGF signaling." J Cereb Blood Flow Metab **28**(9): 1530-42.
- Saporta, S., C. V. Borlongan and P. R. Sanberg (1999).** "Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative

- dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery." Neuroscience **91**(2): 519-25.
- Sawle**, G. V., P. M. Bloomfield, A. Bjorklund, D. J. Brooks, P. Brundin, K. L. Leenders, O. Lindvall, C. D. Marsden, S. Rehncrona, H. Widner and et al. (1992). "Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET [18F]6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants." Ann Neurol **31**(2): 166-73.
- Schmidt**, W. and K. G. Reymann (2002). "Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia." Neurosci Lett **334**(3): 153-6.
- Schwarting**, S., S. Litwak, W. Hao, M. Bahr, J. Weise and H. Neumann (2008). "Hematopoietic stem cells reduce postischemic inflammation and ameliorate ischemic brain injury." Stroke **39**(10): 2867-75.
- Schwarze**, S. R., A. Ho, A. Vocero-Akbani and S. F. Dowdy (1999). "In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse." Science **285**(5433): 1569-72.
- Shingo**, T., S. T. Sorokan, T. Shimazaki and S. Weiss (2001). "Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells." J Neurosci **21**(24): 9733-43.
- Silva**, A. J., K. P. Giese, N. B. Fedorov, P. W. Frankland and J. H. Kogan (1998). "Molecular, cellular, and neuroanatomical substrates of place learning." Neurobiol Learn Mem **70**(1-2): 44-61.
- Snyder**, E. Y., C. Yoon, J. D. Flax and J. D. Macklis (1997). "Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(21): 11663-8.
- Svendsen**, C. N., D. J. Clarke, A. E. Rosser and S. B. Dunnett (1996). "Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system." Exp Neurol **137**(2): 376-88.
- Taupin**, P. (2007). "BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation." Brain Res Rev **53**(1): 198-214.

- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall and J. M. Jones (1998).** "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.
- Thornberry, N. A. and Y. Lazebnik (1998).** "Caspases: enemies within." Science **281**(5381): 1312-6.
- Ushijima, K., H. Miyazaki and T. Morioka (1986).** "Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in the brain of the rat." Resuscitation **13**(2): 97-105.
- Veizovic, T., J. S. Beech, R. P. Stroemer, W. P. Watson and H. Hodges (2001).** "Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells." Stroke **32**(4): 1012-9.
- Vendrame, M., J. Cassady, J. Newcomb, T. Butler, K. R. Pennypacker, T. Zigova, C. D. Sanberg, P. R. Sanberg and A. E. Willing (2004).** "Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume." Stroke **35**(10): 2390-5.
- Walker, T. L., T. Yasuda, D. J. Adams and P. F. Bartlett (2007).** "The doublecortin-expressing population in the developing and adult brain contains multipotential precursors in addition to neuronal-lineage cells." J Neurosci **27**(14): 3734-42.
- White, B. C., L. I. Grossman and G. S. Krause (1993).** "Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair." Neurology **43**(9): 1656-65.
- White, B. C., J. M. Sullivan, D. J. DeGracia, B. J. O'Neil, R. W. Neumar, L. I. Grossman, J. A. Rafols and G. S. Krause (2000).** "Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury." J Neurol Sci **179**(S 1-2): 1-33.
- Widestrand, A., J. Fajerson, U. Wilhelmsson, P. L. Smith, L. Li, C. Sihlbom, P. S. Eriksson and M. Pekny (2007).** "Increased neurogenesis and astrogenesis from neural progenitor cells grafted in the hippocampus of GFAP<sup>-/-</sup> Vim<sup>-/-</sup> mice." Stem Cells **25**(10): 2619-27.
- Wiessner, C., P. R. Allegrini, K. Rupalla, D. Sauer, T. Oltersdorf, A. L. McGregor, S. Bischoff, B. W. Bottiger and H. van der Putten (1999).** "Neuron-specific transgene expression of Bcl-XL but not Bcl-2 genes reduced lesion size after permanent middle cerebral artery occlusion in mice." Neurosci Lett **268**(3): 119-22.

- Winter**, B., B. Bert, H. Fink, U. Dirnagl and M. Endres (2004). "Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching." Stroke **35**(1): 191-5.
- Yang**, Y., I. Tikhonov, T. J. Ruckwardt, M. Djavani, J. C. Zapata, C. D. Pauza and M. S. Salvato (2003). "Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism." J Virol **77**(12): 6700-8.
- Yoshino**, H., N. Hattori, T. Urabe, K. Uchida, M. Tanaka and Y. Mizuno (1997). "Postischemic accumulation of lipid peroxidation products in the rat brain: immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins." Brain Res **767**(1): 81-6.
- Zhang**, L., T. Schallert, Z. G. Zhang, Q. Jiang, P. Arniego, Q. Li, M. Lu and M. Chopp (2002). "A test for detecting long-term sensorimotor dysfunction in the mouse after focal cerebral ischemia." J Neurosci Methods **117**(2): 207-14.
- Zhang**, R. L., Z. G. Zhang, L. Zhang and M. Chopp (2001). "Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia." Neuroscience **105**(1): 33-41.
- Zhang**, Z., M. Chopp, A. Goussev and C. Powers (1998). "Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia." Brain Res **784**(1-2): 210-7.
- Zhang**, Z. G., Q. Jiang, R. Zhang, L. Zhang, L. Wang, L. Zhang, P. Arniego, K. L. Ho and M. Chopp (2003). "Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat." Ann Neurol **53**(2): 259-63.

## 10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit war Teil eines durch das BMBF geförderten Verbundprojektes (Förderung an Herrn PD Dr. J. Weise; Fördernummer: 1362910) mit der Berliner Charité und der Ludwig Maximilian Universität zu München. Ich möchte mich an dieser Stelle zunächst bei Herrn PD Dr. J. Weise (jetzt Universität Jena, Neurologie) für die Überlassung des interessanten Themas bedanken. Herrn Professor M. Bähr danke ich für die mir gegebene Möglichkeit, in seiner Abteilung zu arbeiten. Bei Herrn Professor R. Heinrich bedanke ich mich für die Übernahme des Erstreferats und die regelmäßigen Gespräche und die daraus entstandenen Überlegungen. Herrn Professor R. Jahn danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. T. R. Döppner für die Durchführung der Ischämieoperationen, die hervorragende Betreuung und das kritische Lesen des Manuskripts. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Darüber hinaus gilt mein Dank an Herrn Dr. G. P. H. Dietz, der das für die Bearbeitung der Fragestellung notwendige TAT-Bcl-x<sub>L</sub> bereitstellte. Danke auch an Herrn PD Dr. F. Kirchhoff und Frau Dr. Anja Scheller vom MPI für Experimentelle Medizin für die Unterstützung und Einarbeitung am konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

Vielen Dank auch an Barbara Müller für ihre ausgezeichnete und geduldige Einarbeitung in das Thema und für die tolle Zusammenarbeit im Labor. Ein weiteres Dankeschön geht an meine Kolleginnen, Britta Kaltwasser, Sophia Scheumann, Eva Bretschneider und Birte Könnecke, für die tolle Arbeitsatmosphäre. Auch meinen ehemaligen Kolleginnen, Carina Hillgruber und Jenny Hohagen, möchte ich mich für die immer wieder aufmunternden Worte und dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatten, danken.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, vor allem meinen Eltern und Geschwistern, für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

## 11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation *Überleben und Differenzierung TAT-Bcl-x<sub>L</sub> transduzierter transplantierte neuraler Vorläuferzellen nach zerebraler Ischämie der Maus* selbständig verfasst habe. Für die Bearbeitung der Aufgabenstellung wurde die Hilfe der Drs. G. P. H. Dietz und T. R. Döppner in Anspruch genommen. Herr Dr. Dietz war verantwortlich für die Generierung und Aufarbeitung des Fusionsproteins TAT-Bcl-x<sub>L</sub>, während sämtliche Operationen zur Induktion der zerebralen Ischämie von Herrn Dr. Döppner durchgeführt wurden.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht. Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten

*Name:* Mimount El Aanbouri  
*geb. am:* 25.09.1978  
*in:* Ben Tayeb / Marokko  
*Familienstand:* ledig  
*Staatsangehörigkeit:* deutsch  
*E-Mail:* m.elaanbouri@med.uni-goettingen.de

### Ausbildung

#### schulische Ausbildung

*1986 – 1990:* Gemeinschaftsgrundschule Millrath in Erkrath  
*1990 – 1999:* Gymnasium Hochdahl in Erkrath  
*1999:* Abschluss des Gymnasiums mit dem Abitur

#### Studium:

*1999 – 2001:* Grundstudium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf  
*2001 – 2005:* Hauptstudium der Biochemie an der Privaten Universität Witten/Herdecke in Witten  
*10/2004-09/2005* Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Virologie der Universität Witten/Herdecke  
*Titel:* „Charakterisierung von ORF 16 , einem DNA-Polymerase-assoziierten Protein beim Varicella-Zoster-Virus“  
*10/2005:* Abschluss als Dipl.-Biochemikerin  
*08/2006-05/2009* Promotionsarbeit am Universitätsklinikum Göttingen, Neurologische Klinik