

Für Malte, Marlene, Paul und Linda

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
2 EINLEITUNG	5
2.1 Perinataler Hirnschaden	5
2.2 Pathophysiologische Mechanismen	6
2.3 Therapeutische Ansätze.....	7
2.4 Zelltransplantationen mit humanem Nabelschnurblut (hNSB).....	8
2.5 Umbilikale Zellen und ihr potentieller therapeutischer Effekt bei hypoxisch-ischämischem Hirnschaden.....	9
2.6 Gerichtete Migration von Zellen aus humanem Nabelschnurblut durch chemoattraktive Signale	11
2.7 Chemokine als mögliche Mediatoren der gerichteten Zellmigration	11
2.8 Zielsetzung	13
3 MATERIAL UND METHODIK.....	14
3.1 Materialien.....	14
3.2 Versuchstiere	15
3.3 Induktion eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens nach dem Levine-Modell.....	15
3.3.1 Experimentelle Versuchstier-Gruppen	16
3.4 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut.....	17
3.5 Präparation der Rattenhirne.....	17
3.5.1 Makroskopische Beurteilung des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens	17
3.5.2 Kryokonservierung der Gehirne	18
3.6 Histologie und Immunfluoreszenz	18
3.6.1 Anfertigen von Kryoschnitten	18
3.6.2 Histologische Färbung nach Klüver Barrera	19
3.6.3 Immunfluoreszenz	20
3.6.4 Auswertung der Immunreaktion mittels ImageJ.....	21
3.7 Immunoblot Analyse.....	21
3.7.1 Zellaufschluss zur Gewinnung von Gesamtprotein	21
3.7.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	22
3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	22
3.7.4 Semidry Blotting	24
3.7.5 Kontrollfärbung durch Ponceau S	24
3.7.6 Immundetektion	25

3.8 Immunzytochemie an Zytospin Präparaten	25
4 ERGEBNISSE	27
4.1 Tierexperimentelles Modell des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens.....	27
4.1.1 Makroskopische Beurteilung des Hirnschadens.....	27
4.1.2 Histologische Darstellung des Hirnschadens	27
4.1.3 Inflammation und Apoptose nach hypoxisch-ischämischem Hirnschaden	29
4.2 Detektion humaner mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut.....	31
4.3 Expression des Chemokins SDF-1 nach hypoxisch-ischämischer Läsion	32
4.4 Lokalisation der SDF-1-Expression in Arealen erhöhter CD68-Expression	36
4.5 Detektion humaner Zellen in Arealen mit SDF-1-Expression.....	36
4.6 Reaktive Astrozyten als zellulärer Ursprung von SDF-1.....	37
4.7 Umbilikale Zellen exprimieren den SDF-1 spezifischen Rezeptor CXCR4	39
4.8 Zusammenhang zwischen SDF-1-Expressionsstärke und der Anzahl humaner umbilikaler Zellen an der Läsion	39
4.9 Analyse der SDF-1-Expression mittels Immunoblot.....	41
5 DISKUSSION	42
5.1 Perinataler hypoxisch-ischämischer Hirnschaden	42
5.2 Pathomorphologische Charakterisierung des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens im Levine-Modell.....	43
5.2.1 Makroskopische Schadenseinteilung nach Bona.....	44
5.2.2 Schadensdarstellung durch die Färbemethode nach Klüver-Barrera.....	44
5.2.3 Inflammation und programmierter Zelltod.....	45
5.3 Klinische Therapiestrategien zur Vermeidung oder Eingrenzung eines perinatalen hypoxischen Hirnschadens	46
5.4 Transplantation umbilikaler Zellen nach perinatalem hypoxisch-ischämischem Hirnschaden	47
5.4.1 Das therapeutische Potential adulter Zellen aus Nabelschnurblut.....	47
5.4.2 Gerichtete Migration umbilikaler Zellen durch chemoattraktive Faktoren	48
5.5 Das Chemokin SDF-1.....	49
5.5.1 Expression des Chemokins SDF-1 im Levine-Modell	49
5.5.2 Der zelluläre Ursprung von SDF-1.....	50
5.5.3 Expression des Chemokins SDF-1 nach Transplantation von umbilikalischen Zellen im Levine-Modell	51
5.6 Der SDF-1-Rezeptor CXCR4.....	52
5.6.1 Humane Zellen exprimieren CXCR4	53
5.6.2 Die Bedeutung der SDF-1 / CXCR4 Interaktion.....	54

6 LITERATURVERZEICHNIS.....	56
7 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN.....	66
7.1 Poster und Kongressbeiträge	66
8 LEBENSLAUF	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens nach Makroscore	18
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper in der Immunfluoreszenz	20
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz	21
Tabelle 4: Visueller Vergleich der Detektion von SDF-1 und der Menge der migrierten HLA-DR-positiven Zellen in der Gruppe Läsion+Zellen an P21 mittels Immunhistochemie	40

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Photographische Darstellung der Klüver-Barrera-Färbung von Hirnschnitten der drei experimentellen Gruppen von Wistar-Ratten an P21	28
Abb. 2: Darstellung der Immunreaktivität für CD68 und Cleaved-Caspase3 im direkten Hemisphärenvergleich im Läsionstier an P21	30
Abb. 3: Lokalisation der transplantierten mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut im Gehirn zum Zeitpunkt P21	32
Abb. 4: Immunhistochemische Detektion von SDF-1 an Gehirnschnitten 21 Tage alter Wistar-Ratten	33
Abb. 5: Graphische Darstellung der Quantifizierung der SDF-1-Immunreaktivität in ipsi- und kontralateralen Hemisphären zum Zeitpunkt P21	34
Abb. 6: Immunhistochemische Darstellung des Chemokins SDF-1 im Inflammationsgebiet zum Zeitpunkt P21	36
Abb. 7: Immunhistochemische Analyse für SDF-1 und HLA-DR-immunpositive Zellen	37
Abb. 8: Darstellung des zellulären Ursprungs von SDF-1 mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung mit dem astrozytären Marker GFAP zum Zeitpunkt P21	38
Abb. 9: Immunhistochemische Analyse von Zytospins der humanen Zellen mittels Detektion des CXCR4-Rezeptors	39
Abb. 10: Immunoblot für rekombinantes SDF-1-Protein von Mensch und Maus	41

Häufig verwendete Abkürzungen:

A. dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
CXCL12	Synonym für Stromal Derived Factor-1
CXCR4	CXC-Motiv Chemokinrezeptor 4
CXCR7	CXC-Motiv Chemokinrezeptor 7
et al.	et alii
Fa.	Firma
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
h	hour / Stunde
HCl	Salzsäure
HLA	Human Leukocyte Antigen
hNSB	humanes Nabelschnurblut
i.e.	id est
IgG	Immunglobulin
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
KB	Klüver Barrera
kD	Kilo Dalton
max.	maximal
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Proteine
MIG	Monokine Induced by Gamma-Interferon
MIP-1 α	Macrophage Colony Stimulating Factor
MNZ	mononukleäre Zellen
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MW	Molekulargewicht
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n	Anzahl
N ₂	Stickstoff
N ₂ O	Distickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
P	Postnataltag
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
rpm	rounds per minute
SDF-1	Stromal Derived Factor-1
SDS	Natrium Dodecyl Sulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

In einem Tiermodell des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens konnte gezeigt werden, dass durch Transplantation von Zellen aus Nabelschnurblut eine Verbesserung Läsions-induzierter motorischer Defizite erreicht wurde (Meier et al., 2006). In dieser Untersuchung korrelierten die beobachteten therapeutischen Effekte nach umbilikaler Zell-Transplantation mit der Präsenz dieser peripher applizierten Zellen an der Läsion im Gehirn. Diese Ergebnisse deuten auf eine zielgerichtete Migration der umbilikalen Zellen hin. Bisher waren die Mechanismen, die an diesem so genannten „Homing“ beteiligt sind, weitestgehend unbekannt. Die Annahme der vorliegenden Arbeit war, dass die humanen Zellen durch Chemoattraktion zielgerichtet zum geschädigten Hirnareal migrieren.

Ein potentieller chemoattraktiver Faktor, der diesen beschriebenen Migrationseffekt medieren könnte, ist das in dieser Arbeit untersuchte Chemokin SDF (Stromal-Derived Factor)-1. Da von diesem Protein bekannt ist, dass es auf einige Stamm- und Vorläuferzellen chemoattraktiv wirkt, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Faktor das beschriebene chemoattraktive Potential auch für die Zellen aus humanem Nabelschnurblut im Modell des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens besitzt.

In ersten Analysen wurde in dieser Arbeit der hypoxisch-ischämische Hirnschaden in dem verwendeten experimentellen Modell mittels makroskopischer undmikroskopischer Methoden untersucht. Durch immunhistochemische Analysen konnte der Schaden durch Marker für Inflammation (aktivierte Mikroglia und Makrophagen) und Apoptose weiter charakterisiert werden. Untersuchungen des Migrationsverhaltens der intraperitoneal transplantierten Zellen zeigten, dass diese am Postnataltag 21 im Läsions-Areal detektiert werden konnten.

Durch immunhistochemische Analysen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die SDF-1 Expression in der läsionierten Hemisphäre nach Insult signifikant angestiegen ist und nach Transplantation von Zellen aus humanem Nabelschnurblut noch einmal eine deutliche Expressionssteigerung am 21. Postnataltag beobachtet werden konnte. Durch immunhistochemische Untersuchungen wurde der zelluläre Ursprung der SDF-1 Expression im Hirn nach Induktion eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens

analysiert. Mittels Ko-Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass reaktive Astrozyten im Läsionsgebiet SDF-1 exprimieren.

Die Expression des Chemokins SDF-1 konnte dabei in Regionen detektiert werden, in denen auch umbilikale Zellen nachgewiesen werden konnten. Mittels immunzytochemischer Analysen der mononukleären Fraktion aus Nabelschnurblut konnte der korrespondierende Rezeptor für SDF-1, das Protein CXCR4, auf den humanen Zellen detektiert werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die räumliche und zeitliche Expression von SDF-1 im läsierten Hirngewebe und die ebenfalls beobachtete zielgerichtete Migration von intraperitoneal transplantierten Zellen aus humanem Nabelschnurblut zu diesen Hirnarealen legen nahe, dass der Faktor SDF-1 an diesem „Homing“-Effekt beteiligt ist. Durch Nachweis des entsprechenden Rezeptors auf den umbilikalischen Zellen wird diese Vermutung weiter gestützt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zur Klärung der bislang unbekanntenen Mechanismen des „Homings“ umbilikalischer Zellen nach Transplantation in ein Modell des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens bei. Die Aufklärung der Mechanismen, wie umbilikale Zellen ihre therapeutischen Effekte auf Zellen im geschädigten Gewebe medieren, helfen den klinischen Einsatz dieser Zellen zu bahnen.

Summary

In an animal model of an hypoxic-ischemic brain damage, transplantation of umbilical cord blood cells resulted in an improvement of lesion-induced motor deficits (Meier et al., 2006). In this study, the observed therapeutic effects upon transplantation of umbilical cord blood cells correlated with the presence of peripherally administered cells at the brain lesion. These results point to a directed migration of umbilical cells. However, the mechanisms involved in this process of umbilical cell "homing" are largely unknown. The assumption of this study was that transplanted human cells migrating to the injured brain area are targeted by chemoattraction.

One putative chemoattractive factor, which might mediate the described migratory effect, is the chemokine SDF-1 (Stromal-Derived Factor-1). As this protein is renowned for its chemoattractive properties towards stem and precursor cells, we here assume that the factor might also be chemoattractive for transplanted umbilical cord blood cells after perinatal hypoxic ischemic brain injury.

In initial studies, the experimental hypoxic-ischemic brain damage was investigated at the macroscopic and microscopic level. By immunohistochemical analysis of inflammation, indicated by activated microglia, and of apoptosis, indicated by cleaved-caspase3 expression, the experimental brain damage was characterized. Further studies have demonstrated successful migration of intraperitoneally transplanted cells, detecting umbilical cells in the lesion area at P21.

A significant increase of SDF-1 protein after hypoxic-ischemic brain damage in the lesioned hemisphere, and a further increase at P21 upon transplantation of umbilical cord blood cells could be shown in this study. The cellular origin of SDF-1 was determined immunohistochemically by co-localization studies and demonstrated SDF-1 expression in reactive astrocytes.

In general, expression of SDF-1 was detected in regions with high numbers of umbilical cord blood cells. In turn, the corresponding SDF-1-receptor named CXCR4 was detected immunocytochemically on cells of the mononuclear fraction of umbilical cord blood.

The findings of this study on the spatial and temporal expression of SDF-1 in the hypoxic-ischemic brain and the directed migration of intraperitoneally transplanted umbilical cord blood cells to the lesioned areas suggest an involvement of SDF-1 in the

"homing" of these cells. Detection of the corresponding receptor on umbilical cells further supports this assumption.

The results of this work will help clarify the hitherto unknown mechanisms of "homing" of umbilical cells after transplantation in a model of hypoxic-ischemic brain damage. Elucidation of the mechanisms how umbilical cells mediate their therapeutic effects on the damaged tissue may advance the future clinical use of these cells.

2 Einleitung

2.1 Perinataler Hirnschaden

Neugeborene erleiden mit einer Inzidenz von 1:1000 einen Hirnschaden durch Sauerstoffmangel. Dieser Hirnschaden kann schon im Mutterleib vor der Geburt erfolgen, oder auch während oder kurz nach der Geburt eintreten. Aus unterschiedlichen Gründen beeinflusst eine Sauerstoffunterversorgung das frühkindliche Gehirn. Eine Reduktion der uterinen Durchblutung (Jensen et al., 1987), sowie ein akutes Atemdefizit kurz nach der Geburt können eine Schädigung des Zentralen Nervensystems (ZNS) nach sich ziehen. Als Ursache für eine Unterversorgung mit Sauerstoff kommen unter anderem intrauterine Komplikationen wie Dauerkontraktionen, vorzeitige Plazentaablösungen oder Nabelschnurkompressionen in Frage (Rath et al., 2010). Auch eine unreife Lunge (Surfactant-Mangelsyndrom) kann bei Frühgeborenen zu einer Asphyxie führen (Kramer et al., 2009).

Die klinischen Auswirkungen können je nach Art und Umfang des eingetretenen Sauerstoffmangels sehr unterschiedlich ausfallen (Jensen et al., 2003). Motorische Störungen wie spastische Lähmungen, Choreoathetosen und Ataxien bis zu komplexen Fehlentwicklungen des Nervensystems und Entwicklungsverzögerungen können die Folge sein (Volpe, 2008). Auch psychische Erkrankungen wie Schizophrenie, Depressionen, pathologische Angstzustände und eine Beeinträchtigung der Emotionalität werden als Folgen einer Hypoxie diskutiert (Hanson and Gottesman, 2005).

Für das Ausmaß der Schädigung ist entscheidend, zu welcher Zeit der perinatalen Entwicklung der Hirnschaden ausgelöst wird. Frühgeborene Kinder mit einem Geburtsgewicht von unter 1500 Gramm sind sehr viel öfter von Hirnschäden durch Sauerstoffmangel betroffen (10-15%) als reife Neugeborene mit normalem Geburtsgewicht (0,04%) (Rath et al., 2010). Bei der Asphyxie ist der kindliche Entwicklungsstatus maßgeblich für die neuropathologische Ausbildung der Schädigung. Mit zunehmender Schwangerschaftswoche verringern sich das Risiko und das Ausmaß eines Hirnschadens. Bei einem reifen Neugeborenen, das zwischen der 38. und 40. Schwangerschaftswoche geboren wird, ist der Organismus in der Lage, für kurze Zeit regulierend einzugreifen und so das frühkindliche Gehirn zu schützen, wenn eine akute Sauerstoff-

unterversorgung auftritt. Dies geschieht durch eine Verschiebung der Sauerstoffverteilung zu Gunsten der lebenswichtigen Organe. Somit ist eine Sauerstoffversorgung des Gehirns für kurze Zeit gewährleistet. Für diesen Regulationsmechanismus ist das vegetative Nervensystem verantwortlich (Rath et al., 2010).

Bei unreifen Feten kann bei Sauerstoffmangel die Umverteilung des Sauerstoffvolumens zu Gunsten der lebenswichtigen Organe nicht in ausreichendem Maß erfolgen. Die Blutgefäße der betroffenen Feten sind noch nicht in der Lage, massive Blutdruckschwankungen, die mit einem Sauerstoffmangel verbunden sind, auszugleichen. Frühgeborene Kinder reagieren somit besonders sensibel auf Sauerstoffmangel. Die periphere Organdurchblutung wird nicht gedrosselt und es kommt zu einem massiven Druckabfall in den Hirngefäßen. Die Folge ist ein akuter Abfall des Sauerstoffpartialdrucks im Gehirn, der mit anschließenden Hirnblutungen, hervorgerufen durch die Ruptur noch nicht ausgereifter Blutgefäße, eine schwerwiegende Schädigung der Hirnstrukturen auslösen kann (Jensen et al., 1999; Jensen et al., 1991).

2.2 Pathophysiologische Mechanismen

Auf den Sauerstoffmangel im Gehirn und das damit einhergehende Durchblutungsdefizit reagiert der kindliche Organismus mit einer Umverteilung des Herz-Minutenvolumens zugunsten der Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung der lebenswichtigen Organe. (Jensen and Berger, 1991). Dauert die Sauerstoffunterversorgung länger an, so werden die zentralen Organe wie Gehirn, Herz und Nebennieren nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt und die initiale Phase der Schädigung tritt ein. Der Energiestoffwechsel und die damit verbundene Versorgung der Zellen im Gehirn sind in dieser Initialphase der Sauerstoffunterversorgung nicht mehr gewährleistet. Dieses akute Defizit an Sauerstoff leitet eine Reaktion ein, bei der die Freisetzung von Glutamat im synaptischen Spalt erhöht wird. Glutamat als wichtiger Neurotransmitter im ZNS wirkt allerdings bei erhöhtem Glutamatspiegel zellschädigend. Es kommt zu einer Verminderung des Membranpotentials an den Nervenzellen, da der Glutamatgesteuerte Ionenaustausch an der Zellmembran nicht mehr reguliert werden kann. So kommt es zum Erliegen des Energieaustausches und zu einem damit verbundenen Überangebot an Kalzium in den Zellen (Jensen et al., 2003; Johnston, 2005). Diese zellinterne Kalziumerhöhung führt zur Aktivierung von Lipasen, Proteasen und zur

Generierung freier Sauerstoff-Radikale und damit zum schnellen nekrotischen Zelltod (Jensen et al., 2003; Narayanan et al., 2010; Williams et al., 1992). Nach dem sogenannten „calcium overload“, kommt es im ischämischen Areal zu Inflamationsprozessen und in der Folge zur Sekretion von Zytokinen durch aktivierte Mikroglia (Vila et al., 2000). Es werden pro-inflammatorische Zytokine sezerniert, die bei infektiösen Erkrankungen von gesundheitlichem Nutzen sind, sich bei einer Gewebeschädigung aber toxisch auf das Gewebe auswirken können. Im gesunden Organismus findet sich ein Gleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen, die für die Abwehr einer Infektion verantwortlich sind, und anti-inflammatorischen Zytokinen, die für die Aufrechterhaltung der Immunabwehr und zur Gesunderhaltung des Organismus zuständig sind (Dinarello, 2000). Dieses sensible Gleichgewicht zwischen anti- und pro-inflammatorischen Zytokinen ist im Falle einer Gewebeschädigung nicht mehr vorhanden, sondern zugunsten der pro-inflammatorischen Zytokine verschoben (Gantert et al., 2010; Ziebell and Morganti-Kossmann, 2010).

Die apoptotische Zellschädigung tritt in der sekundären Phase der Hirnschädigung in Kraft. So kommt es erst nach Stunden bzw. Tagen zu dieser massiven Reaktion. Im Gegensatz zum nekrotischen Zellsterben ist die Apoptose ein von den betreffenden Zellen ausgehender aktiver Zelltod, der durch die postischämische Inflammation eingeleitet wird.

Durch die Aktivierung intrazellulärer Caspasen wird die aktive Zellzerstörung verursacht (Northington et al., 2001; Zhu et al., 2003). Das Ausmaß der Apoptose ist entscheidend für die langfristigen neurologischen Komplikationen bei der Entwicklung des Kindes (Ishimaru et al., 1999; Taylor et al., 1999).

2.3 Therapeutische Ansätze

Prinzipiell ergibt sich durch die Zeitverzögerung, mit der die zweite Phase der Schädigung nach hypoxisch-ischämischem Insult eintritt, ein Zeitfenster, das therapeutische Maßnahmen ermöglicht. Diese Maßnahmen können sowohl pharmakologisch als auch physikalisch erfolgen. Pharmakologische Strategien gegen den programmierten Zelltod können in Form von Glutamat-Antagonisten (Gilland et al., 1994) Kalzium-Antagonisten (Berger, 1998) Caspase-Inhibitoren (Dammann and Leviton, 2000) oder mit Medikamenten erfolgen, welche die Zytokinaktivität

einschränken (Braun et al., 1999). Allerdings haben klinische Studien gezeigt, dass die medikamentöse Behandlung in der Geburtshilfe mit Schwierigkeiten behaftet ist. So wird die Gabe von Kalzium-Antagonisten mittlerweile kritisch beurteilt, da neben den neuroprotektiven Effekten eine gesteigerte Morbidität und Mortalität nachgewiesen wurde (Garnier, 2004). Auch die Bedeutung anti-inflammatorischer Zytokine wurde im Tiermodell untersucht. Dabei waren einige Interleukine in der Lage, die Glutamatfreisetzung zu reduzieren, was positive Auswirkungen auf den intrazellulären Kalziumspiegel hatte. In der Folge wurde der Verlauf des apoptotischen Zelltodes positiv beeinflusst (Bai et al., 1997). So verhinderte zum Beispiel IL-10, das von Astrozyten und Mikrogliazellen sezerniert wird, die apoptotischen Eigenschaften von Caspase3 (Choi, 1988).

Als physikalische Therapie bietet sich die Methode der Hypothermie an (Gluckman et al., 2005). Diese Form der physikalischen Behandlung zeigt auch bei der klinischen Anwendung zumindest bei geringen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigungen eine langfristige Verminderung der Ischämie-bedingten Folgeschäden (Gluckman et al., 2006; Jacobs et al., 2007).

2.4 Zelltransplantationen mit humanem Nabelschnurblut (hNSB)

Da die endogenen Regenerationsmechanismen des ZNS keine vollständige und zufrieden stellende Genesung ermöglichen und der erfolgreiche Einsatz pharmakologischer und physikalischer Therapien nach dem Auftreten eines frühkindlichen Hirnschadens bisher noch beschränkt ist, wird ein weiterer Therapieansatz, die Transplantation von (Stamm-) Zellen, zunehmend diskutiert. Das Potential von Stammzellen ist sehr hoch, da diese unreifen Zellen sowohl zur unbegrenzten Erneuerung, als auch zur individuellen Zelldifferenzierung fähig sind.

Seit Jahrzehnten bekannt sind die adulten hämatopoetischen Stammzellen, die für die Differenzierung der verschiedenen Blutzellen verantwortlich sind (Lewis and Trobaugh, 1964). Auch andere adulte Stammzellen, wie sie zum Beispiel im Knochenmark (Thomas et al., 1959), im Pankreas (Bonner-Weir and Weir, 2005), im ZNS (Vescovi et al., 2001) oder in der Leber (Faris et al., 2001) vorkommen, sind bekannt. Potentielle therapeutische Ansätze, die mit diesen Zellen möglich scheinen, umfassen viele Organsysteme und Pathologien und werden tierexperimentell untersucht. So wurden

zum Beispiel in der Behandlung von Hirntumoren im Tiermodell erfolgreich adulte blutbildende Stammzellen aus dem Knochenmark eingesetzt (Tabatabai et al., 2005).

Gegenüber adulten Stammzellen aus Knochenmark oder peripherem Blut bieten Zellen aus Nabelschnurblut verschiedene Vorteile bei der therapeutischen Anwendung. Umbilikale Zellen zeichnen sich durch ihre lange Lebensdauer (Vaziri et al., 1994) und das geringe Risiko maligner Entartung aus (Kogler et al., 1999). Auch der Anteil an hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen ist bei Nabelschnurblut höher als bei adulten Stammzellen aus dem Knochenmark (Migliaccio et al., 1986). Aus tierexperimentellen Studien wird die Vielseitigkeit der umbilikalischen Zellen deutlich. Auch bei der Regeneration von Geweben, deren endogenes Reparaturpotential eher gering ist, wurden Zellen aus hNSB erfolgreich transplantiert. Hervorzuheben ist hier das ZNS, bei dem die endogene Regeneration nach einer erlittenen Schädigung begrenzt ist.

Die Transplantation von humanen Zellen aus Nabelschnurblut hat sich in verschiedenen Tiermodellen zur Therapie degenerativer Erkrankungen erfolgreich gezeigt. So wurde z.B. die Ausprägung und das Fortschreiten der amyotrophen Lateralsklerose durch die Gabe von Zellen aus humanem Nabelschnurblut (hNSB) positiv beeinflusst (Garbuzova-Davis et al., 2003). Auch Rückenmarksverletzungen wurden in einem Rattenmodell mit Leukozyten aus hNSB mit positivem therapeutischen Effekt behandelt (Saporta et al., 2003). Ischämische Verletzungen wurden sowohl im Hirn, z.B. im Rattenmodell des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens (Meier et al., 2006) oder des adulten Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO) Schlaganfallmodells (Chen et al., 2001; Borlongan et al., 2004; Vendrame et al., 2005;) als auch im Herzen, z. B. bei experimentell induziertem Myokardinfarkt (Nagaya et al., 2004) positiv beeinflusst.

2.5 Umbilikale Zellen und ihr potentieller therapeutischer Effekt bei hypoxisch-ischämischem Hirnschaden

In den oben aufgeführten experimentellen Modellen zeigte sich ein positiver therapeutischer Einfluss nach Transplantation von humanen umbilikalischen Zellen. Dieser Einfluss konnte auch im Levine Modell (Levine, 1960; Rice et al., 1981) des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens gezeigt werden (Meier et al., 2006).

In diesem Modell wird durch unilaterale Durchtrennung der Arteria carotis communis und nachfolgende systemische Hypoxie ein hypoxisch-ischämischer Hirnschaden in

Wistar-Ratten am Postnataltag (P) 7 induziert (Levine, 1960; Rice et al., 1981). Zu diesem Zeitpunkt entspricht das Rattenhirn in seiner Entwicklung dem frühkindlichen Entwicklungsstadium während der 34.-35. Schwangerschaftswoche (Hagberg et al., 1997). Die Auswirkungen für das neonatale Rattenhirn nach dieser Behandlung entsprechen den Folgen eines hypoxisch-ischämischen Insults im frühkindlichen Hirn (Dobbing, 1974).

Ähnlich wie beim Menschen kommt es im Rattenhirn nach einem hypoxisch-ischämischen Insult zu einem gravierenden Blutdruckabfall mit Minderdurchblutung der ipsilateralen Hirnhemisphäre. Auch im Rattenhirn lassen sich massive Schädigungen einzelner Gewebeanteile der ipsilateralen Hemisphäre ausmachen: Pathologische Veränderungen sind sowohl im Kortex, in der subkortikalen und periventrikulären weißen Substanz, im Hippokampus, dem Thalamus und dem Striatum ersichtlich und führen zu ähnlichen Defiziten sowohl in der motorischen als auch der kognitiven Entwicklung wie beim Menschen nach einer solchen Schädigung (Balduini et al., 2000; Iuvone et al., 1996).

Die tierexperimentelle Induktion des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens nach dem Levine-Modell ermöglicht, die zerebralen Schädigungen eines frühkindlichen Hirnschadens zu imitieren und die therapeutischen Auswirkungen durch transplantierte humane umbilikale Zellen zu untersuchen.

Mit Hilfe motorischer Tests können motorische Veränderungen nach unilateralen Hirnschäden wissenschaftlich erfasst und ausgewertet werden. Untersucht werden dabei Parameter wie das Schrittmuster (Meier et al., 2006), die Muskelkraft (Seiltest), oder die Koordination der Vorderpfoten (Zylindertest) (Schallert et al., 2000). Auch nach der Transplantation von Zellen aus hNSB in ein Tiermodell des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens bei Wistar-Ratten konnte mit Hilfe von durchgeführten motorischen Testverfahren ein quantifizierbarer therapeutischer Effekt verdeutlicht werden (Meier et al., 2006). Der therapeutische Effekt äußerte sich unter anderem durch eine Verbesserung der Motorik und verminderter Spastik. Dieser therapeutische Nutzen legt die Vermutung nahe, dass transplantierte humane umbilikale Zellen eine Reaktion am Ort der Läsion in der geschädigten Hirnhemisphäre auslösen.

Bisher konnte dabei noch nicht abschließend geklärt werden, ob die umbilikalischen Zellen selbst eine Umwandlung und Differenzierung in neurale Zellen durchlaufen oder indirekt über parakrine Mechanismen einen positiven Effekt auf die geschädigten neuronalen Zellen bewirken.

Bei der Untersuchung der neuronalen Strukturen nach hypoxisch-ischämischem Insult und nach Transplantation von Zellen aus hNSB konnten an der Hirnläsion umbilikale Zellen detektiert werden (Meier et al., 2006). Dieser Nachweis legt eine gerichtete Zellmigration nahe.

2.6 Gerichtete Migration von Zellen aus humanem Nabelschnurblut durch chemoattraktive Signale

Als Mechanismen für die Zellwanderung der Zellen aus hNSB kommen starke chemoattraktive Signale in Frage, die eine gerichtete Migration, im Folgenden auch „Homing“ genannt, der humanen umbilikalischen Zellen bedingen können. Diese Signale werden von läsioniertem Gewebe ausgesandt und bewirken durch ihre starke Chemoattraktivität ein Einwandern der Zellen aus der Körperperipherie hin zum geschädigten Areal der Hirnhemisphäre. Dieser Mechanismus wurde auch *in vitro* belegt (Chen et al., 2001).

2.7 Chemokine als mögliche Mediatoren der gerichteten Zellmigration

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die in der Lage sind, eine migratorische Bewegung der responsiven Zielzellen auszulösen. Diese so genannte Chemoattraktivität ist vor allem für die Migration von Immunzellen von Bedeutung, z. B. für T-Lymphozyten (Bunting et al., 2011), B-Lymphozyten (Okada et al., 2002), und dendritische Zellen (Alvarez et al., 2008). Chemokine weisen ein Molekulargewicht von 8 bis 14 kD auf. Strukturell lassen sich ca. 50 verschiedene Chemokine in vier Gruppen einteilen, die sich in der Zahl von Cysteinen und ihrer exakten Position am N-terminalen Ende des Proteins unterscheiden: In Säugern gibt es die Chemokingruppen CXC (z. B. Monokine Induced by Gamma-Interferon (MIG), Stromal Derived Factor-1 (SDF-1), Interleukin-8(IL-8)), CC (z. B. Macrophage Colony Stimulating Factor (MIP1alpha), Monocyte Chemoattractant Proteine (MCP-1)), XC (Lymphotactin alpha und beta) und CX3C (Fraktalkine) (Laing and Secombes, 2004).

Neben dem physiologischen „Homing“ von Lymphozyten zu lymphatischen Organen haben Chemokine Bedeutung für die Lymphozyten-Migration in das – eigentlich immunprivilegierte – ZNS. Besonders unter inflammatorischen Bedingungen werden Chemokine von einer Vielzahl von Zellen des ZNS synthetisiert. Nach Schädigung des

neuronalen Systems durch einen Entzündungsprozess sezernieren besonders Astrozyten und Neurone verstärkt Chemokine (de Haas et al., 2007). Somit erlangen Chemokine bei allen pathologischen Prozessen im Gehirn Bedeutung, die mit Inflammation einhergehen, z. B. bei hypoxisch-ischämischem Insult (Liao et al., 2001). Auch bei Krankheiten wie Multipler Sklerose (Krumbholz et al., 2006) war die Chemokin-Expression gesteigert. Zudem konnte die Sekretion von Chemokinen in Folge von tumorösen Veränderungen (Müller et al., 2001) sowie nach Herzinfarkt (Zhang et al., 2007) beobachtet werden. Die unter diesen Bedingungen sezernierten Chemokine ermöglichen die Infiltration von Leukozyten ins ZNS (Constantin, 2008; Wilson et al., 2010).

Ein Chemokin, das in vielen unterschiedlichen Studien an Tiermodellen als wichtiges Protein der Chemoattraktivität identifiziert wurde, ist das Chemokin SDF-1 (Stromal Derived Factor-1) mit seinen zwei bekannten Isoformen α und β . SDF-1 ist ein Chemokin der CXC Gruppe und wird auch CXCL12 genannt (Shirozu et al., 1995). Ergebnisse aus den unterschiedlichsten Forschungsgebieten stellten das SDF-1 Protein als chemoattraktiven Mediator verschiedener Zelltypen heraus, so z. B. für Lymphozyten und Monozyten (Bleul et al., 1996), Endothelzellen (Gupta et al., 1998; Müller et al., 2001), hämatopoetische Vorläuferzellen (Aiuti et al., 1997) und Tumorzellen (Müller et al., 2001), um nur einige zu nennen.

Mediiert wird die chemoattraktive Wirkung durch Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die auf den responsiven Zellen exprimiert sind. Das SDF-1 Protein bindet den Rezeptor CXCR4 und reguliert über diese Rezeptor-Interaktion die Migration normaler, aber auch maligner Zellen. Inzwischen ist bekannt, dass noch ein weiterer Rezeptor mit SDF-1 interagiert: der CXCR7 Rezeptor (Maksym et al., 2009). Die Bindung an den CXCR7 Rezeptor hat insbesondere Bedeutung für die Migration von Tumorzellen.

Dass Leukozyten aufgrund von chemotaktischen Signalen im Organismus Wegstrecken zurücklegen können, ist für die therapeutische Arbeit mit Stammzellen von großer Bedeutung. Studien zeigten, dass nach Schädigung des ZNS Zellen aus hNSB von ihrer Transplantationsstelle gezielt in das läsionierte Areal wandern, unabhängig davon, ob die Applikation intravenös, intraperitoneal oder intrazisternal erfolgte (Chen et al., 2001; Meier et al., 2006; Garbuzova-Davis et al., 2003). Diese gerichtete Migration könnte durch Chemokine gesteuert werden, die im Läsionsareal freigesetzt werden. Ein besonderes Augenmerk wird in dieser Arbeit auf die vermehrte Expression von SDF-1

bei inflammatorisch bedingten Hirnveränderungen und auf seinen Einfluss auf umbilikale Zellen gelegt, der schon 2008 von Ohno et al. (Ohno et al., 2008) anhand von CD34-markierten hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut untersucht wurde.

Vieles deutet darauf hin, dass die chemotaktischen Signale des Chemokins SDF-1 für das „Homing“-Verhalten transplanteder Zellen mitverantwortlich sind, wie viele Studien beispielsweise zu Modellen von Myokardinfarkten (Zhang et al., 2007), Multipler Sklerose (Krumbholz et al., 2006) und Hirntumoren (Glioma) (Tabatabai et al., 2005) belegen.

2.8 Zielsetzung

Dieser Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass nach hypoxisch-ischämischem Hirnschaden vermehrt Chemokine im Läsionsareal exprimiert werden und diese für die gerichtete Migration transplanteder Zellen aus Nabelschnurblut verantwortlich sind. Ein bedeutender Faktor ist das Protein SDF-1.

Das Ziel der Arbeit war es, folgende Fragen zu untersuchen:

- a) Ist das Protein SDF-1 im Läsionsareal nach hypoxisch-ischämischem Hirnschaden exprimiert und in welchen Zellen lässt es sich detektieren?
- b) Sind Zellen aus Nabelschnurblut in der Lage, auf SDF-1 zu reagieren, i.e. exprimieren sie den Rezeptor CXCR4?

Um diese Fragen bearbeiten zu können, sollte in einem ersten Schritt an hypoxisch-ischämisch geschädigten Rattenhirnen die pathomorphologische Veränderung des Hirns zum Zeitpunkt P21 untersucht werden und das Läsionsareal bestimmt werden. Im zweiten Schritt sollten im geschädigten Rattenhirn die an P8 intraperitoneal transplanteden umbilikalischen Zellen detektiert werden, um ihre Lokalisation im geschädigten Gewebe einzugrenzen. Durch immunhistochemische Analysen wurde der potentiell chemotaktisch wirksame Faktor SDF-1 stellvertretend für die Chemokine auf seine Präsenz im geschädigten Gewebe hin untersucht. In umbilikalischen Zellen wurde über Immunzytochemie die Expression des CXCR4 Rezeptors analysiert.

3 Material und Methodik

3.1 Materialien

Geräte / Chemikalien

Blocking Reagenz
Bovine Serum Albumin (BSA)
Bradford Reagenz
Deckglas 24/60mm
ECL-Detektionslösung
ECL-Filme
Eosin
Ficoll Paque
Filterpapier
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M
Gasgemisch (8% O₂ und 92% N₂)
Gefriermikrotom CM 3050S
Hämatoxylin
Kaleidoskop Marker
Mini Protean3 Cell-Apparatur
Nitrozellulosemembran
Normal Goat Serum
OCT tissue tec
PBS
Ponceau S
ProLong Antifade Gold
Protease Inhibitor-Cocktail
ROTOFIX 32 Zentrifuge
SuperFrost[®]Plus Objektträger
Trans Blot SD-Apparatur

Hersteller

Roche Diagnostics, Mannheim
Sigma-Aldrich, München
BioRad, München
Menzel, Braunschweig
Perbio Science, Bonn
GE Healthcare, Freiburg
Chroma, Münster
GE Healthcare, Freiburg
Whatman, Dassel
Zeiss, Göttingen
Linde gas, Pullach
Leica, Nussloch
Chroma, Münster
BioRad, München
BioRad, München
GE Healthcare, Freiburg
R&D Systems, Wiesbaden
Leica, Nussloch
Biochrom, Berlin
Fluka BioChemika, Taufkirchen
Invitrogen, Karlsruhe
Sigma-Aldrich, München
Hettichlab, Tuttlingen
Menzel, Braunschweig
BioRad, München

Alle weiteren verwendeten Labor-Chemikalien wurden von in Deutschland ansässigen Firmen bezogen.

3.2 Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere waren Wistar-Ratten aus Eigenzucht der Zentralen Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen in vollklimatisierten Räumen gehalten und erhielten Standardfutter und Leitungswasser ad libitum.

3.3 Induktion eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens nach dem Levine-Modell

In Ratten wurde am Postnataltag (P) 7 ein hypoxisch-ischämischer Insult nach dem Modell von Levine (1960) in einer Modifikation nach Rice et al. (1981) induziert. Die Wistar-Ratten beider Geschlechter wurden am siebten postnatalen Tag unter einer tiefen Isofluran-Inhalationsnarkose (3,5% zur Einleitung und 1,5% zur Aufrechterhaltung in einem Gasgemisch aus N₂O / O₂ (1:1)) operiert. Dabei wurde an der linken Halsseite die Arteria carotis communis aufgesucht, mittels zweier Ligaturen mit einem Prolenefaden (6-0 metric) ligiert und mittig der beiden Knoten durchtrennt. Der Hautschnitt wurde daraufhin mit Vicryl-Nahtmaterial zugenäht und die Jungratten zur einstündigen Erholung der Mutter zugeführt. Im Anschluss erfolgte eine systemische Hypoxie, die für 80 Minuten bei 8% O₂ und 92% N₂ in einer Gasdurchflusskammer bei einer Umgebungstemperatur von exakt 36°C stattfand.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen an den Wistar-Ratten sind vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV, Recklinghausen) genehmigt worden (AZ 50.8735.1 Nr. 109/4) und entsprechen den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 09.12.2010. Alle Tierversuche wurden von Frau Dr. S. Kumbruch und Frau Dr. K. Rosenkranz durchgeführt.

3.3.1 Experimentelle Versuchstier-Gruppen

Die Wistar-Ratten wurden an P7 randomisiert in drei experimentelle Versuchsgruppen eingeteilt:

1. Shamgruppe (Sham)
2. Läsionsgruppe ohne Zellen aus humanem Nabelschnurblut (hNSB) (Läsion)
3. Läsionsgruppe mit transplantierten Zellen aus humanem Nabelschnurblut (hNSB) (Läsion+Zellen)

zu 1: Shamgruppe:

In dieser Gruppe (Sham; n=3), war die Arteria carotis communis von neonatalen Wistar-Ratten an P7 unter einer Isofluran-Inhalationsnarkose linksseitig freipräpariert und kurz mittels einer chirurgischen Pinzette angehoben worden. Nach dieser „Schein-Operation“ wurde die Arteria carotis wieder in ihre ursprüngliche Faszienloge reponiert und die Operationswunde mit einem Prolenefaden verschlossen.

Zu 2: Läsionsgruppe ohne Zellen aus humanem Nabelschnurblut (hNSB):

In dieser Gruppe (Läsion; n=3), wurde zur Induktion eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens zunächst die Arteria carotis communis ligiert und durchtrennt. Anschließend erfolgte die Hypoxie für 80 Minuten mit einem Gasgemisch von 8% O₂ und 92% N₂. Durch diese Vorgehensweise konnte in einem reproduzierbaren Versuchsablauf ein hypoxisch-ischämischer Hirnschaden hervorgerufen werden. Nach dieser Prozedur wurden die Versuchstiere wieder zu ihren Muttertieren in die Käfige gesetzt.

24 Stunden nach Induktion des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion von 500 µl einer 0,9 %igen Natriumchlorid-Lösung.

Zu 3: Läsionsgruppe mit transplantierten mononukleären Zellen aus humanem Nabelschnurblut (hNSB):

In dieser Gruppe (Läsion+Zellen; n=5), wurden die Ratten wie oben ausgeführt operiert und einer systemischen Hypoxie unterzogen.

24 Stunden nach dem hypoxisch-ischämischen Insult wurde den Versuchstieren zum Zeitpunkt P8 intraperitoneal 1×10^7 mononukleäre Zellen aus hNSB in 500 μ l 0,9% Natriumchlorid injiziert.

An P21, also 14 Tage nach Induktion des Hirnschadens, wurden alle Versuchstiere narkotisiert und getötet. Nachfolgend wurden die Hirne präpariert.

3.4 Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut

Das humane Nabelschnurblut wurde nach schriftlichem Einverständnis der Mutter unmittelbar nach der Geburt aus der Nabelschnurvene entnommen und steril in Blutbeutel, versetzt mit Citrat-Phosphat-Dextrose (CPD) als Antikoagulanzen, gesammelt, und bis zur weiteren Verwendung für max. 48 Stunden bei 18°C gelagert. Über eine Ficoll Paque Dichtegradientenzentrifugation wurde die mononukleäre Zellfraktion von den restlichen Bestandteilen des Blutes getrennt. Dazu wurde das mit CPD versetzte Blut 1:3 mit PBS verdünnt und anschließend 30 ml des verdünnten Blutes auf 20 ml Ficoll geschichtet. Nach einer Zentrifugation von 1h bei 400 g und 18°C wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen abgenommen. Die mononukleären Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer Zählkammer. Zur Feststellung der Vitalität wurden die Zellen mit einer Trypanblau-Lösung inkubiert. Bei dieser Färbung nehmen nur die avitalen Zellen den blauen Farbstoff auf, vitale Zellen werden nicht angefärbt.

3.5 Präparation der Rattenhirne

3.5.1 Makroskopische Beurteilung des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens

Zwei Wochen nach Induktion der Läsion, an P21, wurden die Rattenhirne präpariert und der makroskopisch ersichtliche Hirnschaden unmittelbar nach Entnahme bestimmt. Entsprechend der Einteilung nach Bona et al., (1997) wurden Makroscores von 0 bis 3 unterschieden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens nach Makroscore

Makroscore 0	kein makroskopisch sichtbarer Schaden an der betroffenen Hemisphäre
Makroscore 1	Verfärbung des Kortex (oberflächlich und umschrieben) ohne Zystenbildung
Makroscore 2	deutliche, abgegrenzte zystische Veränderung im linken Hemisphärenbereich (< 4mm)
Makroscore 3	zystische Veränderung der nahezu kompletten, betroffenen Hemisphäre (> 4mm), wobei die Hirnstrukturen äußerlich stark verändert und kaum noch als solche zu erkennen sind.

Alle Tiere der Läsionsgruppen (Läsion; Läsion+Zellen) wiesen an P21 in der ipsilateralen linken Hemisphäre eine zystische Veränderung mit einer Zystengröße von mindestens 4 mm (Makroscore 3) auf; in den kontralateralen rechten Hemisphären waren keine Anzeichen einer Schädigung sichtbar. Die Shamtiere wiesen keine Veränderungen der Hirnoberfläche auf.

3.5.2 Kryokonservierung der Gehirne

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde von den verwendeten Gehirnen das Kleinhirn abgetrennt und das Großhirn mit einem speziellen Einfriermedium für Gewebe (OCT) auf eine Korkscheibe gebettet. Danach wurden die Gehirne in einem -70°C kalten Gemisch aus 8% Methylcyclohexan in 2-Methylbutan eingefroren. Die Lagerung der kryokonservierten Gehirne erfolgte bei -80°C.

Für die Immunoblot-Analyse wurde von den verwendeten Gehirnen das Kleinhirn abgetrennt und die beiden Hemisphären separat in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Hirne erfolgte bei -80°C.

3.6 Histologie und Immunfluoreszenz

3.6.1 Anfertigen von Kryoschnitten

Die eingefrorenen Rattenhirne wurden mit einem Gefriermikrotom in 12µm dicke Schnitte geschnitten, auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgenommen und nach einer halbstündigen Trocknung bei 45°C weiterverarbeitet.

Für alle Untersuchungen der experimentellen Gruppen wurden Schnitte der Ebenen gewählt, die im adulten Rattenhirn Bregma $-2,9 \pm 0,5$ mm entsprechen. Um die entsprechenden anatomischen Strukturen zu verifizieren, wurde der Atlas „The Rat Brain“ von Paxinos & Watson (1998) verwendet.

3.6.2 Histologische Färbung nach Klüver Barrera

Mit der Färbung nach Klüver Barrera (Klüver and Barrera, 1953) lassen sich zerebrale Kerngebiete und Fasertrakte darstellen. In dieser Färbung werden die Zellkerne dunkelblau bis violett angefärbt, die myelinisierten Markscheiden erscheinen in türkis-blau.

Zunächst erfolgte die Fixierung der Kryoschnitte auf den Objektträgern für 5 Stunden in 70% Ethanol in A. dest. (v/v) bei Raumtemperatur. Danach wurden die Objektträger für 2 Minuten in 96% Ethanol in A. dest. (v/v) gelegt. Für die anschließende Färbung wurden die Kryoschnitte für 24 Stunden bei 55°C in einem Inkubator in einer Luxol Fast Blue Lösung inkubiert. Nach Abkühlen der Luxol Fast Blue Lösung auf Raumtemperatur wurden die Schnitte durch Inkubation in 96% Ethanol in A. dest. (v/v) für 2 Minuten von überschüssigen Farbanteilen befreit und anschließend für 2 Minuten in 70% Ethanol in A. dest. (v/v) inkubiert. Nun folgte ein Abspülen in A. dest. für zwei Minuten. Anschließend wurden die Kryoschnitte für 5 Minuten in 0,05% Lithiumcarbonat in A. dest. (w/v) differenziert, danach in 70% Ethanol in A. dest. (v/v) und anschließend für 2 Minuten mit A. dest. gespült.

Der nächste Schritt bestand aus einer 15minütigen Färbung in 0,1% Cresylviolett in A. dest. (w/v). Danach wurden die Schnitte für 2 Minuten in A. dest. gespült. Die Farbfixierung erfolgte nun mit einer aufsteigenden Alkoholreihe. Erst wurden die Schnitte zweimal für je 1 Minute in 96% Ethanol in A. dest. (v/v) gegeben. Dann wurden sie zweimal für je 1 Minute in 100% Isopropanol gegeben. Abschließend kamen die Schnitte zweimal für jeweils 10 Minuten in Rotihistol, um danach mit Entellan eingedeckt zu werden.

0,2% Luxol Fast Blue Lösung (100 ml)

- 0,2 g Luxol Fast Blue
- 99,5 ml 96% Ethanol
- 0,5 ml Eisessig

3.6.3 Immunfluoreszenz

Die Kryoschnitte der Rattenhirne wurden für die indirekte Immunfluoreszenz in 70% Ethanol in A. dest. (v/v) für 10 Minuten bei -20°C fixiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Schnitte für 10 Minuten in PBS. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte für 2 Stunden in einer Blockierungslösung (10% Normal goat serum (v/v), 0,1% TritonX-100 (v/v) in PBS) inkubiert. Die Inkubation mit dem in Blockierungslösung verdünnten Erstantikörper erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubation wurden die Objektträger 3x für 10 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 0,02% BSA in PBS (PBS-A) inkubiert. Die Inkubation mit dem in PBS-A verdünnten Zweitantikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Das anschließende Waschen der Objektträger erfolgte 3x für jeweils 10 Minuten mit PBS. Nun wurden die Objektträger mit ProLong Antifade Gold Eindeckmedium mittels eines Deckglases (24x60mm) eingedeckt.

Kontrollschnitte wurden ohne den jeweiligen Primärantikörper nur unter Zugabe des Sekundärantikörpers wie alle anderen Schnitte behandelt.

Die Auswertung der immunhistochemischen Versuche erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop und dem Programm Axiovision LE. Die Daten wurden als TIFF Datei in Adobe Photoshop CS2 exportiert.

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper in der Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Maus anti-Human HLA-DR	Mensch	1:25	Dako, Hamburg
Kaninchen anti-Human Cleaved-Caspase3	Mensch, Ratte	1:300	CellSignaling Technology Danvers, MA, USA
Maus anti-Ratte CD68	Ratte	1:100	MorphoSys, Düsseldorf
Maus anti-Schwein GFAP	Mensch, Ratte	1:100	Millipore, Schwalbach
Kaninchen anti-Human SDF-1	Maus, Ratte	1:50	Millipore, Schwalbach

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-Maus Alexa Fluor 488	1:3.000	Millipore, Schwalbach
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	1:3.000	Millipore, Schwalbach
Ziege anti-Maus Alexa Fluor 568	1:3.000	Millipore, Schwalbach
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 568	1:3.000	Millipore, Schwalbach

3.6.4 Auswertung der Immunreaktion mittels ImageJ

Die Quantifizierung der Intensität der Immunreaktion erfolgte mittels des Programms ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Dafür wurden jeweils elf Regionen sowohl der ipsi- als auch der kontralateralen Hemisphäre definiert und photographiert. Mit der Bearbeitungsmethode mit ImageJ wird pro Flächeneinheit berechnet, wie hoch der prozentuale Anteil der markierten Areale (= Immunreaktion) ist. Für jede Region wurde das Fluoreszenzsignal der Photographien durch das Einbringen eines Schwellenwert-Modus des Programms erfasst. Unabhängig von der Intensität erfolgte eine Schwarzdarstellung der Fluoreszenzsignale. Die Bildabschnitte ohne Fluoreszenzsignale wurden weiß dargestellt. Danach erfolgte die Berechnung des prozentualen Flächenanteils der fluoreszierenden Areale. Für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte aller Regionen pro Hemisphäre miteinander verglichen. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SPSS 13. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit unter 0,05 ($p < 0,05$) wurde als statistisch signifikant gewertet.

3.7 Immunoblot Analyse

3.7.1 Zellaufschluss zur Gewinnung von Gesamtprotein

Die Hemisphären eines Gehirns wurden getrennt gewogen und 0,5 g Gewebe in 500 μ l Zellaufschluss-Puffer unter Zugabe von 10 μ l Protease Inhibitor-Cocktail lysiert. Um den Aufschluss der Zellen zu erleichtern, wurden die Gehirnhälften in Zellaufschluss-Puffer homogenisiert. Danach erfolgte die Abtrennung der unlöslichen Proteine und Zellbestandteile durch eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 20 min bei 4°C. Der die

zytosolischen Proteine enthaltende Überstand wurde für die weiteren Analysen verwendet.

Zellaufschluss-Puffer

- 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 2% (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)
- 10% (v/v) Glycerol
- 5% (v/v) β -Mercaptoethanol

in A. dest.

3.7.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Proteinbestimmungen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem „Protein Assay Dye Reagent“ der Firma Bio-Rad durchgeführt. Als Standardprotein wurde BSA verwendet. Die Absorption der Ansätze wurde photometrisch bei 595 nm bestimmt und die Konzentration der Probe anhand der gemessenen Absorption und der Standardkurve (BSA) errechnet.

3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurden die Proteine der Rattenhirne elektrophoretisch aufgetrennt. Dies erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, indem diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet wurden. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Mini-Protean-3-Cell-Apparatur. Die Proteinproben wurden mit 5x Laemmli-Probenpuffer versetzt, für fünf Minuten zur Proteindenaturierung auf 95°C erhitzt und in einer Konzentration von 10 μ g/10 μ l pro Spur in die Geltaschen gefüllt.

Laemmli-Probenpuffer (5x)

- 312,5 mM Tris-HCL, pH6,8
- 10% (w/v) SDS
- 50% (v/v) Glycerin
- 25% (v/v) β -Mercaptoethanol
- 0,025% (v/v) Bromphenolblau

In A. dest.

Sammelgel 4% (5 ml Ansatz)

- | | |
|--------------------------|--------------|
| • 30% Acrylamid- Lösung | 833 μ l |
| • 0,5 M Tris-HCL, pH 6,8 | 1,25 ml |
| • 10% SDS | 50 μ l |
| • A. dest. | 2,9 ml |
| • TEMED | 7,5 μ l |
| • 10% APS | 37,5 μ l |

Trenngel 15% (6,42 ml Ansatz)

- | | |
|--------------------------|--------------|
| • 30% Acrylamid-Lösung | 3,15 ml |
| • 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8 | 1,6 ml |
| • 10% SDS | 62,5 μ l |
| • A. dest . | 1,5 ml |
| • TEMED | 10 μ l |
| • 10 % APS | 100 μ l |

Die Gelelektrophorese erfolgte zuerst bei 100 Volt. Hierbei wurden die Proteine für 20 Minuten vor dem Trenngel gesammelt. Anschließend wurden die Proteine im Trenngel bei 150 Volt für ca. eine Stunde elektrophoretisch aufgetrennt, bis das Bromphenolblau des Probenpuffers fast am Ende der Platte angelangt war.

SDS-Elektrophorese Puffer (1x)

- 25 mM Tris-HCl, pH 7,8
- 192 mM Glycerin
- 0,1% (w/v) SDS

in A. dest.

3.7.4 Semidry Blotting

Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte mittels der Semidry-Blotting Methode. Das Whatman-Papier und die Nitrozellulose-Membran wurden vor dem Blotten in Transferpuffer eingelegt.

Transferpuffer

- 48 mM Tris 5,82 g
- 39 mM Glycin 2,93 g
- 10% SDS 3,75 ml
- 100% Methanol 200 ml

mit A. dest. auf 1 Liter auffüllen

Nach Ablauf der SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel in feuchtem Zustand auf die Nitrozellulose-Membran gelegt. Der Aufbau des Blots war folgendermaßen:

Obere Platte – Anode

Whatman-Filterpapier

SDS-Gel

Nitrozellulose-Membran

Whatman-Filterpapier

Untere Platte – Kathode

Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte bei 15 Volt für 35 Minuten in einer Trans Blot SD-Apparatur.

3.7.5 Kontrollfärbung durch Ponceau S

Durch die reversible Färbung der Nitrozellulose-Membran mit Hilfe einer Ponceau S-Lösung wurde der Proteintransfer durch das Sichtbar machen der Proteinbanden verifiziert. Durch anschließendes Spülen mit 0,1% Tween 20 in PBS (v/v) konnte die Nitrozellulose-Membran wieder entfärbt werden.

Ponceau S-Färbelösung

- 0,2 % (w/v) Ponceau S
- 3 % (v/v) Trichloressigsäure
- 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure

in A. dest.

3.7.6 Immundetektion

Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurde unter ständigem Schütteln die Nitrozellulose-Membran in 0,5% Blockingreagenz in PBS (w/v) eine Stunde inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-SDF-1. Der Antikörper wurde 1:1.000 in 0,2% Blockingreagenz in PBS (v/v) verdünnt, wobei ca. 1 ml pro Membran verwendet wurde. Die Antikörper-Inkubation erfolgte bei 4°C im Kühlraum über Nacht auf einem Schüttler.

Nach der Erst-Antikörper Inkubation wurden die Nitrozellulose-Membran in PBS-Tween für insgesamt ca. eine Stunde 6x gewaschen. Der Zweit-Antikörper (Peroxidase-konjugiert Maus anti-rabbit IgG) wurde 1:5.000 in 0,2% Blockingreagenz verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Nitrozellulose-Membran für insgesamt ca. eine Stunde 3x mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion mittels einer Elektrochemilumineszenz (ECL) -Detektionslösung. Die beiden Komponenten A und B wurden dafür 1:1 gemischt und kurz vor Gebrauch angesetzt. Das Reagenz verblieb für ca. eine Minute auf der Membran. In der Dunkelkammer erfolgte die Detektion der Signale auf ECL-Film.

3.8 Immunzytochemie an Zytospin Präparaten

2×10^6 mononukleäre Zellen aus hNSB wurden auf einen Objektträger gegeben und bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zytospins für 10 Minuten bei 40°C getrocknet.

Zunächst wurden die auf Objektträgern befindlichen Zytospins dreimal kurz mit PBS gespült und danach für zehn Minuten bei -20°C in 100% Ethanol auf die Objektträger fixiert. Nun folgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils fünf Minuten. Um eine Sättigung unspezifischer Bindungsstellen zu erzielen, folgte eine zweistündige Inkubation in 20% Schweineserum und 0,1% Triton-X-100 in PBS. Anschließend

wurden die Objektträger mit dem Primärantikörper Kaninchen anti-Human CXCR4 in der Verdünnung 1:100 (Millipore, Schwalbach) mit der Blockierlösung über Nacht bei 18°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 in der Verdünnung 1:3.000 in 0,02% BSA in PBS (w/v). Mit ihm wurden die Objektträger nun für zwei Stunden bei 18°C lichtgeschützt inkubiert.

Es folgten drei weitere Waschungen mit PBS und eine einminütige Inkubation mit Hoechst 33258 (2 µg/µl in PBS) um eine Färbung der Zellkerne zu erzielen. Auf ein erneutes dreimaliges Waschen mit PBS folgte nun das Eindecken der Objektträger mittels ProLong Antifade Gold Eindeckmedium. Negativkontrollen wurden ohne die Gabe des Erst-Antikörpers wie oben beschrieben durchgeführt.

Die Immunfluoreszenz-Analyse der Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzmikroskops.

4 Ergebnisse

4.1 Tierexperimentelles Modell des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von transplantierten mononukleären Zellen aus humanem Nabelschnurblut (hNSB) die gerichtete Zellmigration dieser Zellen zu einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung untersucht. Dazu wurde das Tiermodell der perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnläsion nach Levine angewandt. Folgende Versuchsgruppen wurden unterschieden: a) Sham-operierte Tiere (Sham), b) Tiere mit experimentell induziertem hypoxisch-ischämischem Hirnschaden (Läsion), und c) Tiere mit experimentell induziertem hypoxisch-ischämischem Hirnschaden und anschließender Transplantation von mononukleären Zellen aus hNSB (Läsion+Zellen). Der Eingriff wurde an P7 durchgeführt, die weiteren Analysen zum Zeitpunkt P21.

4.1.1 Makroskopische Beurteilung des Hirnschadens

Die Hirne der Tiere in der Sham-Gruppe wiesen keine strukturellen Auffälligkeiten der linken Hemisphäre auf und entsprachen in der Schadenseinteilung nach Bona et al., (1997) einem Makroscore 0. Alle Tiere mit Läsion, unabhängig davon, ob mit oder ohne Transplantation von Zellen aus hNSB (Läsion, sowie Läsion+Zellen) zeigten unilaterale Veränderungen der linken Hemisphäre, die in der gewählten Einteilung (Bona et al., 1997) einem Makroscore 3 entsprachen. Somit waren die Einschlusskriterien für alle Tiere erfüllt.

4.1.2 Histologische Darstellung des Hirnschadens

Kryoschnitte der Gehirne wurden über die histologische Methode nach Klüver Barrera (KB) gefärbt. Über diese Färbung konnte neben der makroskopisch erfolgten Analyse der hypoxisch-ischämischen Läsion eine mikroskopische Analyse der einzelnen Hirnstrukturen erfolgen. Hierfür wurden Hirnschnitte von 21 Tage alten Wistar-Ratten analysiert, die bei adulten Tieren den Hirnregionen Bregma $-2,9 \pm 0,5$ mm entsprechen.

Exemplarisch ist für jede der drei untersuchten Tiergruppen eine Darstellung der KB-Färbung in Abb. 1 gezeigt.

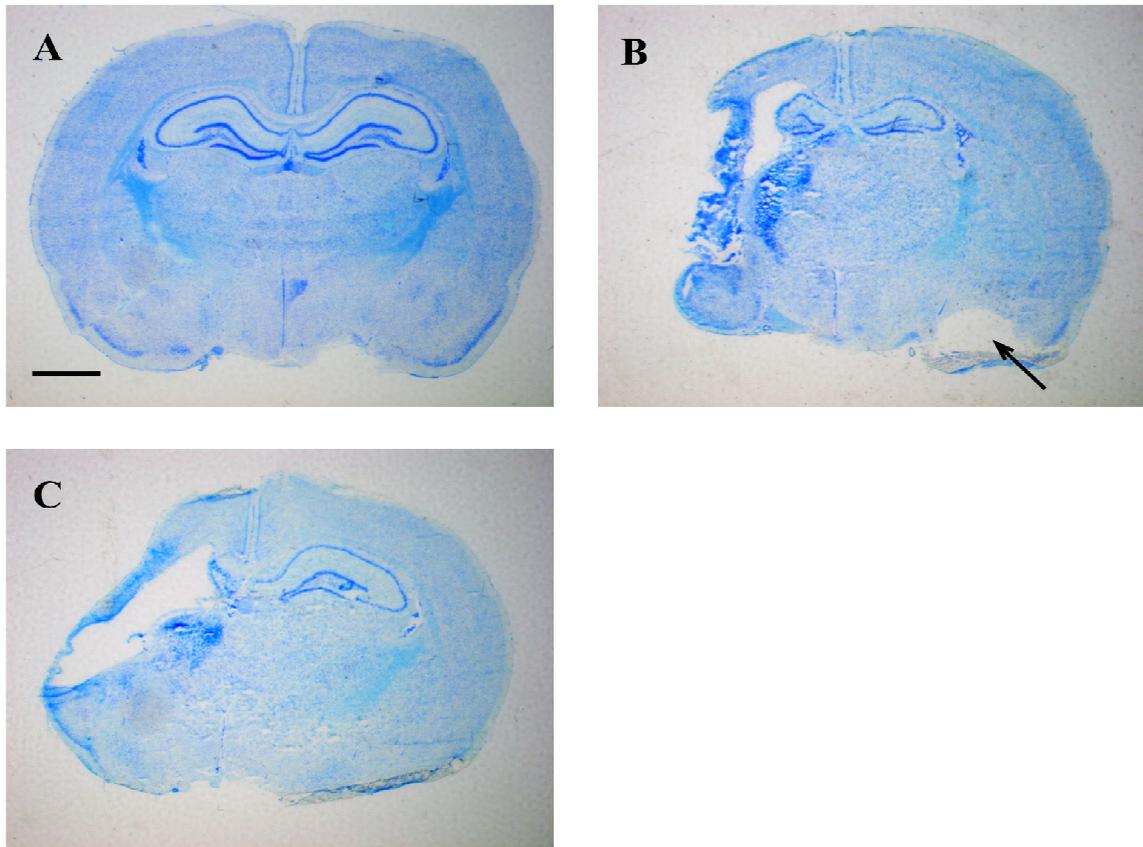


Abb. 1: Photographische Darstellung der Klüver-Barrera-Färbung von Hirnschnitten der drei experimentellen Gruppen von Wistar-Ratten an P21. A) zeigt einen Kryoschnitt eines Sham-operierten (Sham) Tiers mit intakten Hemisphären. B) zeigt exemplarisch einen Hirnschnitt eines Läsionstiers (Läsion) mit makroskopisch deutlich veränderter Hemisphäre. Diese befindet sich ipsilateral zur operativen Durchtrennung der Arteria carotis. Eindeutig erkennbar sind der pathologisch vergrößerte Lateralventrikel und das nicht mehr klar erkennbare Hippokampalgebiet. Die mit Pfeil gekennzeichnete Gewebestelle in der rechten Hemisphäre in Abbildung B) ist keine durch ischämisch-hypoxischen Insult hervorgerufene Strukturveränderung, sondern eine beim Schneiden am Kryostaten entstandene Gewebeschädigung. C) zeigt einen Hirnschnitt repräsentativ für die Läsionstiergruppe mit transplantierten mononukleären Zellen aus hNSB (Läsion+Zellen), der sich nicht hinsichtlich des makroskopisch ersichtlichen Läsionsausmaßes von B) unterscheiden lässt. Der Kalibrierungsbalken entspricht 2 mm.

Anhand der KB-Färbung, durch die sich Kerngebiete und Fasertrakte besonders hervorheben lassen, wird das Ausmaß der Pathomorphologie verdeutlicht, welche durch den hypoxisch-ischämischen Hirnschaden entstanden ist. In den Tieren der Sham-Gruppe (Abb. 1A) lassen sich auch histologisch keine strukturellen Unterschiede zwischen rechter und linker Hemisphäre detektieren. In allen Tieren der beiden Läsionsgruppen (Läsion; Läsion+Zellen) sind in der linken Hemisphäre deutliche Defekte des Hirngewebes erkennbar. Der Schaden befindet sich somit ipsilateral zur durchtrennten Arteria carotis

communis. Der Lateralventrikel aller untersuchten Läsionstiere erscheint dabei stark deformiert und pathologisch vergrößert; die ihn begrenzenden Gewebestrukturen weisen eine deutliche, durch ihn hervorgerufene, räumliche Verdrängung auf.

Folgende linksseitige pathologische Veränderungen der Läsionsgruppe ohne transplantierte Zellen (Läsion), die durch den Insult hervorgerufen wurden, sind in der exemplarisch ausgewählten Abbildung 1B erkennbar: Der Lateralventrikel ist massiv vergrößert und hat durch seine zystische Ausbreitung die angrenzenden Gewebestrukturen verdrängt. Der Hippokampus ist dabei deutlich zum Corpus callosum und zur dorsalen hippokampalen Kommissur verschoben worden. Die Kortexstruktur der linken Hemisphäre hat durch den hypoxisch-ischämischen Insult eine starke Veränderung erfahren. Das linksseitige Gewebe hat keine klare Randgestaltung mehr und erscheint hier deutlich aufgelockert. Die Struktur der Capsula externa ist nicht mehr zu erkennen und lässt sich aufgrund der Gewebedegeneration nur vermuten.

Die pathologischen Veränderungen des hypoxisch-ischämischen Insults mit anschließender Transplantation mononukleärer Zellen aus hNSB (Läsion+Zellen; Abb. 1C) zeigen in der histologischen KB-Färbung keine offensichtlichen Unterschiede verglichen mit histologischen Färbungen von Gewebeschnitten mit hypoxisch-ischämischen Hirnschaden ohne transplantierte Zellen (Läsion; Abb. 1B). Auch in Abbildung 1C sind pathologisch veränderte Gewebeareale linksseitig erkennbar: Der linke Lateralventrikel ist stark vergrößert und der gesamte Kortexbereich im Läsionsgebiet erscheint deformiert und aufgelockert.

Die Histologien unterscheiden sich nicht zwischen den Gruppen Läsion und Läsion+Zellen. Anhand der KB-Färbung lässt sich kein therapeutischer Effekt der transplantierten mononukleären Zellfraktion aus hNSB erkennen; strukturelle Schäden sind in gleicher Weise ausgeprägt. In den im Folgenden verwendeten schematischen Darstellungen der koronalen Gewebeschnitte von Tieren mit hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung wird daher nicht zwischen den beiden Läsionsgruppen unterschieden.

4.1.3 Inflammation und Apoptose nach hypoxisch-ischämischem Hirnschaden

Nach Induktion eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens treten im betroffenen Hirnareal Inflammation und programmierter Zelltod (Apoptose) auf. Zur Eingrenzung des läsionierten Areals wurden in dieser Arbeit mittels der Immunfluoreszenz die Inflammation und die Apoptose im direkten Hemisphärenvergleich untersucht (Abb. 2).

Abbildung 2B zeigt die linke Hemisphäre eines Läsionstieres ohne Zellen. Deutlich erkennbar ist das Vorkommen von apoptotischen Zellen und aktivierten Mikrogliazellen in der linken Hemisphäre. Die apoptotischen Zellen wurden mittels ihrer Immunreaktivität auf Cleaved-Caspase3 detektiert und sind in rot dargestellt. Die aktivierten Mikroglia sind CD68-immunopositiv, dargestellt in grün. Sowohl CD68 als auch Cleaved-Caspase3 Immunreaktivität zeigt sich im Randbereich der Läsion in überlappenden, wenn auch nicht deckungsgleichen Arealen. Abbildung 2C zeigt den entsprechenden Ausschnitt der rechten, nicht läsierten Hemisphäre. Sowohl apoptotische Zellen als auch aktivierte Mikroglia sind nur vereinzelt zu finden.

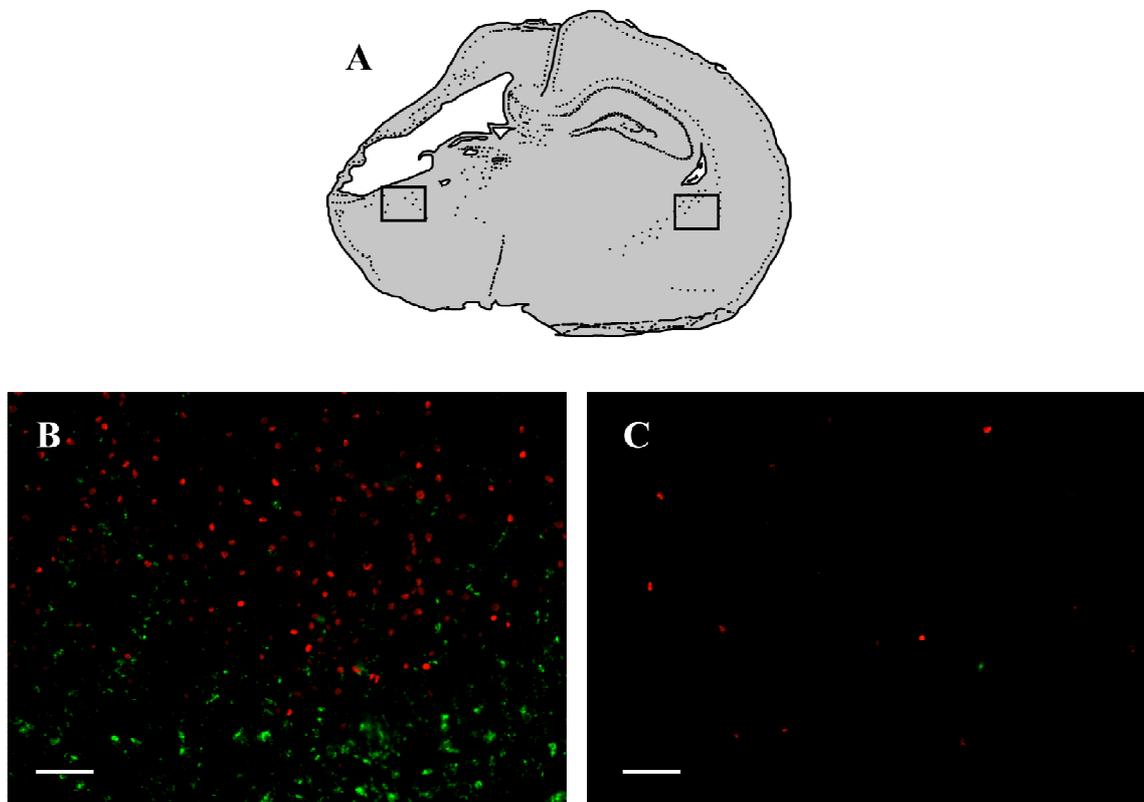


Abb. 2: Darstellung der Immunreaktivität für CD68 und Cleaved-Caspase3 im direkten Hemisphärenvergleich im Läsionstier an P21. A) zeigt eine exemplarische, schematische Darstellung eines hypoxisch-ischämisch läsierten Rattenhirns an P21 mit jeweils einem markierten Hirnareal pro Hemisphäre. Es wurde eine immunhistochemische Doppelmarkierung mit einem Marker für Mikroglia (CD68, grün) und einem Marker charakteristisch für apoptotische Zellen (Cleaved-Caspase3, rot) durchgeführt. In der linken Hemisphäre B) ist eine deutliche Expressionssteigerung beider untersuchten Zelltypen gegenüber dem in C) gezeigten entsprechenden Hirnareal auf der rechten Hemisphäre zu beobachten. In C) ist eine geringe physiologische Reaktivität für Cleaved-Caspase3 sichtbar, Eine Immunreaktivität für CD68 ist hingegen nicht detektierbar. Die Kalibrierungsbalken entsprechen 50 μm .

Die mittels der Immunfluoreszenz detektierten, aktivierten Mikrogliazellen, die Hinweis auf eine Entzündungsreaktion nach hypoxisch-ischämischen Insult geben, finden sich ausschließlich in den deutlich veränderten ipsilateralen Hirnstrukturen rund um den zystisch veränderten Lateralventrikel und in den angrenzenden Hirnarealen. In intakt erscheinenden Hirnarealen des hypoxisch-ischämisch Rattenhirns wurde keine CD68 Immunreaktion detektiert. Auch in den kontralateralen Hirnarealen und in beiden Hemisphären von Sham-Tieren sind diese Zellen nicht vertreten.

Der apoptotische Zelltod, durch die Immunreaktion auf Cleaved-Caspase3 detektiert, kann zum Zeitpunkt P21 vermehrt in den linksseitigen Hirnarealen rund um den zystisch veränderten Lateralventrikel beobachtet werden. Sowohl in den kontralateralen Hemisphären der Läsionsgruppe (siehe Abb. 2C) als auch in beiden Hemisphären von Sham-operierten Tieren (Daten nicht gezeigt) konnte nur eine äußerst schwache physiologische Immunreaktivität auf Cleaved-Caspase3 nachgewiesen werden.

4.2 Detektion humaner mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut

Zum Zeitpunkt P8, also 24 Stunden nach Induktion des hypoxisch-ischämischen Insults, erfolgte die intraperitoneale Transplantation von 1×10^7 mononukleären Zellen aus hNSB. Der Nachweis der transplantierten Zellen im Gehirn erfolgte immunhistochemisch mithilfe des humanspezifischen Antikörpers HLA-DR. Dieser Antikörper wurde verwendet, da er ein sehr großes Spektrum der hämatopoetischen humanen Zellen erkennt. Die Detektion der humanen Zellen im Gehirn erfolgte zum Untersuchungszeitpunkt P21.

In der immunhistochemischen Analyse des linksseitigen hypoxisch-ischämischen Insults ist deutlich erkennbar, dass nur in der linken Hemisphäre eine Inkorporation von HLA-DR markierten humanen Zellen im astrozytären Netzwerk des Rattengewebes nachweisbar ist (Abb. 3B). Die Zellen finden sich zudem ausschließlich im läsierten Gewebe, das den Lateralventrikel begrenzt. Dem gegenüber steht, dass sowohl in den intakten rechten Hemisphären läsierten und transplantierten Tiere (Abb. 3C), in Sham-operierten Ratten (Daten nicht gezeigt) als auch bei Ratten mit Läsion ohne nachfolgende Transplantation von humanen Zellen aus Nabelschnurblut (Läsion) keine HLA-DR-positiven Zellen detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Eindeutig erkennbar ist, dass die humanen Zellen keine Kolokalisation mit GFAP aufweisen, die in der Doppelmarkierung durch ein gelb erscheinendes Signal sichtbar wäre.

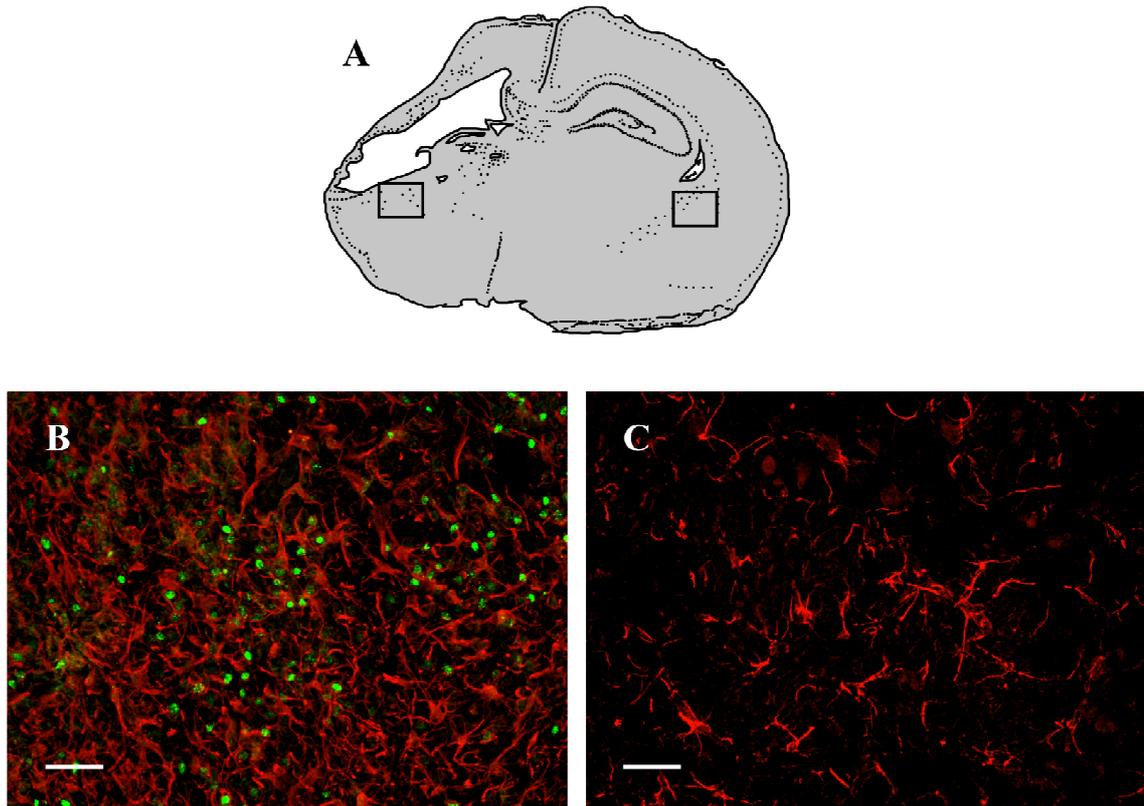


Abb. 3: Lokalisation der transplantierten mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut im Gehirn zum Zeitpunkt P21. A) zeigt die schematische Darstellung eines läsierten Rattenhirns zum Zeitpunkt P21. Die mit einem Viereck gekennzeichneten Hirnareale sind in B) und C) photographisch abgebildet. B) zeigt exemplarisch einen Bereich mit GFAP-immunpositiven Astrozyten (rot), in dem HLA-DR-immunpositive Zellen (grün) detektiert werden konnten. C) zeigt den entsprechenden kontralateralen Bildausschnitt der nicht läsierten Hemisphäre. Hier wurden in der immunhistochemischen Analyse keine HLA-DR-immunpositiven Zellen detektiert. Die Kalibrierungsbalken entsprechen 50 μ m.

4.3 Expression des Chemokins SDF-1 nach hypoxisch-ischämischer Läsion

Da die nach Induktion eines hypoxisch-ischämischen Insults intraperitoneal transplantierten humanen umbilikalen Zellen zum Untersuchungszeitpunkt P21 nur in Bereichen rund um die Läsion detektiert werden konnten, ist von einer gezielten Zellmigration auszugehen. Es ist denkbar, dass diese, auch als „Homing“ bezeichnete Migration der Zellen, durch Signale ausgelöst wird, die von der geschädigten Hemisphäre des Rattenhirns ausgesendet werden. Bei diesen Signalen handelt es sich möglicherweise um Zytokine, die bei einer bestehenden Inflammation vermehrt ausgeschüttet und nachgewiesen werden können. In dieser Arbeit wurde stellvertretend für die Gruppe der Zytokine das Chemokin SDF-1 untersucht.

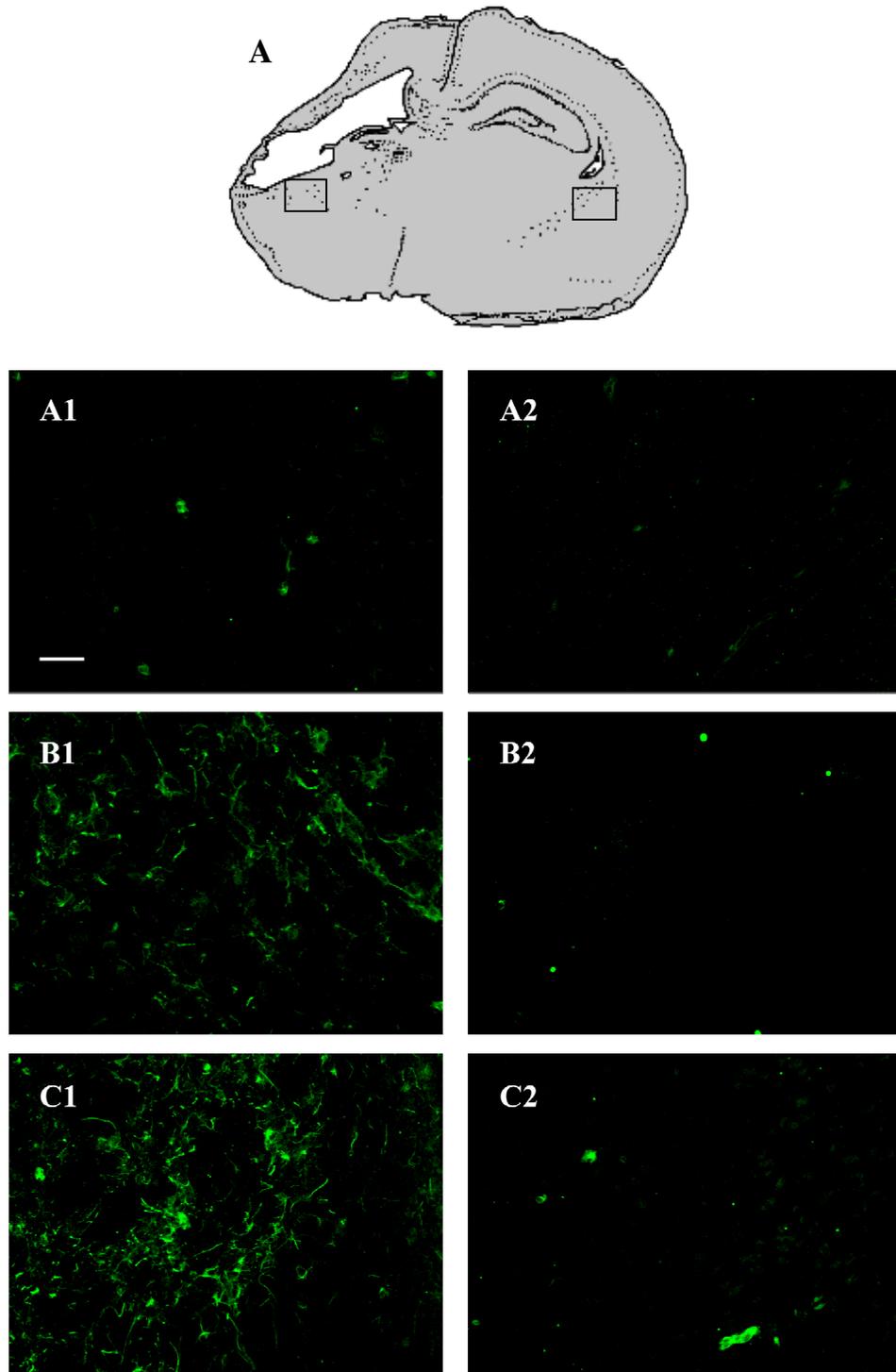


Abb. 4: Immunhistochemische Detektion von SDF-1 an Gehirnschnitten 21 Tage alter Wistar-Ratten. A) zeigt die schematische Darstellung eines läsierten Rattenhirns zum Zeitpunkt P21. Die Vierecke markieren die Hirnareale, die in den Photos der immunhistochemischen Analysen gezeigt sind. Die repräsentativen Photos A1), B1) und C1) entstammen den linken Hemisphären, A2), B2) und C2) zeigen die entsprechende Region der nicht-läsionierten kontralateralen Hemisphären. Die Immunreaktivität von SDF-1 (grün) weist eine kontinuierliche Expressionserhöhung in den linken Hemisphären von der Sham-Gruppe (A) über die Läsions-Gruppe (B) bis hin zur Läsionsgruppe mit nachfolgender Transplantation von umbilikalen mononukleären Zellen (C) auf. In den rechten Hemisphären aller drei Gruppen ist eine geringe Basalexpression von SDF-1 zu erkennen (A2, B2, C2). Der Kalibrierungsbalken entspricht 50 μm .

Durch die vermehrte Expression des Chemokins SDF-1 bei hypoxisch-ischämischem Insult könnte das Auftreten der humanen Zellen aus Nabelschnurblut an der Läsionsstelle erklärt werden.

Durch die immunhistochemische Analyse koronaler Gewebeschnitte der Region, die im adulten Gehirn Bregma $-2,9 \pm 0,5$ mm entspricht, wurde die Expression des Chemokins SDF-1 zum Zeitpunkt P21 analysiert. Die SDF-1-Immunreaktivität wurde in Sham-Tieren (Sham), Tieren mit Läsion (Läsion) und Tieren mit Läsion und nachfolgender Transplantation von humanen umbilikalen Zellen (Läsion+Zellen) untersucht.

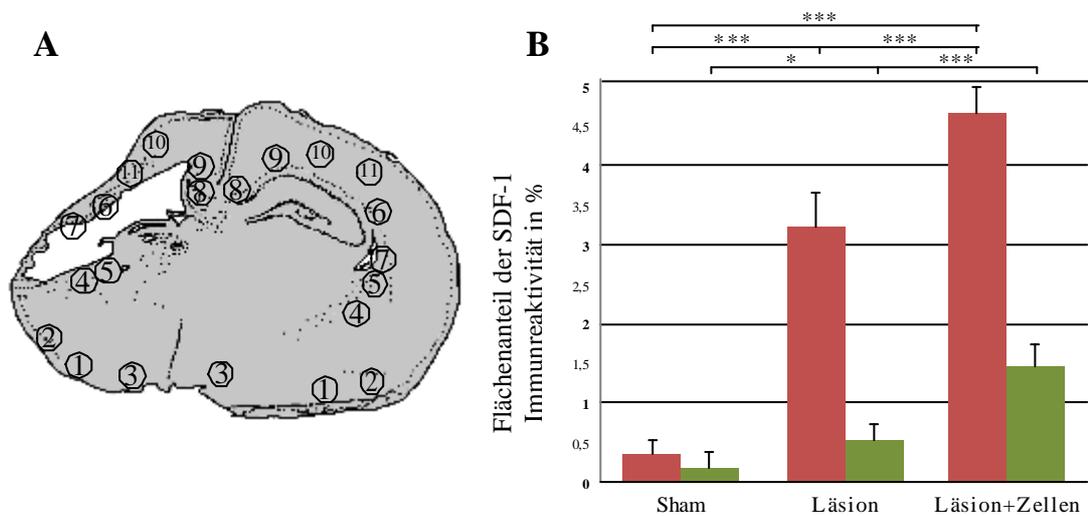


Abb. 5: Graphische Darstellung der Quantifizierung der SDF-1-Immunreaktivität in ipsi- und kontralateralen Hemisphären zum Zeitpunkt P21. Abbildung A) zeigt die schematische Darstellung eines hypoxisch-ischämisch läsierten Hirnes zum Zeitpunkt P21. Die mit Kreisen markierten Hirnareale heben die 11 Hirnregionen hervor, die für die Quantifizierung der SDF-1-Expression ausgewählt wurden. Der Graph B) zeigt für die drei unterschiedlichen Versuchsgruppen die prozentuale Fläche der SDF-1-Immunreaktivität sowohl in den linken (rote Balken), als auch in den rechten Hemisphären (grüne Balken). In der Sham-operierten Gruppe sind keine signifikanten Unterschiede in der SDF-1-Expression zwischen rechter und linker Hemisphäre erkennbar. Im Vergleich dazu lassen sich signifikante Unterschiede in der SDF-1-Immunreaktivität sowohl in der Gruppe mit Läsion als auch in der Gruppe mit Läsion und nachfolgender Transplantation von humanen umbilikalen Zellen (Läsion+Zellen) detektieren. Die erfassten Daten sind als Mittelwerte in Prozent \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Signifikante Unterschiede von $p < 0,001$ sind mit *** von $p < 0,005$ mit * gekennzeichnet.

Ersichtlich ist, dass das SDF-1-Protein in der läsierten Hemisphäre vermehrt detektierbar ist. Auffällig ist die deutliche Expressionssteigerung in Hirnbereichen, die in unmittelbarer räumlicher Nähe zum zystisch veränderten Lateralventrikel liegen. Zum einen seien hier die läsiungsangrenzenden Anteile des Kortex, zum anderen Bereiche im Corpus Callosum und die verbliebenen Teile des Hippokampus sowie die Basalganglien genannt. Während in den linken Hemisphären der Sham-operierten Tiere (Sham) und in allen

rechten intakten Hemisphären der drei Tiergruppen die immunhistochemischen Analysen eine sehr geringe Basalexpression von SDF-1 zeigen (Abb. 4 A1, A2, B2 und C2), wird ersichtlich, dass in den läsierten linken Hemisphären (Abb. 4 B1 und C1) die SDF-1-Immunfluoreszenz sehr stark ausgeprägt ist. Hervorzuheben ist, dass die SDF-1-Immunfluoreszenz in der Tiergruppe mit nachfolgender Transplantation humaner Zellen aus Nabelschnurblut (Läsion+Zellen) am stärksten detektiert werden konnte. Zur Quantifizierung der SDF-1-Expression wurden 11 Regionen rund um die Läsion zum Zeitpunkt P21 ausgewählt (Abb. 5A). Die Auswertung der SDF-1-Immunreaktion erfolgte in den drei oben beschriebenen experimentellen Gruppen in den fotografierten Regionen mittels Analyse durch das Programm ImageJ.

Die graphische Darstellung der quantitativen Analyse der Immunfluoreszenz des SDF-1-Proteins (Abb. 5B) ergab für die drei in diesem Modell untersuchten Tiergruppen folgende Ergebnisse: Die Expression des Proteins SDF-1 ist in den ipsilateralen Hemisphären der Tiere mit induziertem hypoxisch-ischämischem Insult (Läsion) gegenüber den Sham-operierten Tieren (Sham) signifikant höher (Läsion: $3,22 \pm 0,43$ % Flächenanteil der SDF-1-Immunreaktivität; Sham: $0,35 \pm 0,18$ % Flächenanteil der SDF-1-Immunreaktivität).

In der Läsionsgruppe mit anschließender Transplantation mononukleärer Zellen aus hNSB (Läsion+Zellen) ist die Expression des SDF-1-Proteins am höchsten. Dieser Anstieg der SDF-1-Expression nach Transplantation umbilikaler Zellen war sowohl im Vergleich zur Sham- als auch zur Läsionsgruppe signifikant (Läsion+Zellen: $4,65 \pm 0,33$ % Flächenanteil SDF-1 Immunreaktivität).

Die Immunreaktivität für SDF-1 in den kontralateralen Hemisphären aller drei untersuchten Gruppen war dagegen geringer als in den ipsilateralen Hemisphären. Während die Expression von SDF-1 in der Sham-Gruppe als physiologische Basalexpression bezeichnet werden kann (Sham: $0,17 \pm 0,21$ % Flächenanteil SDF-1-Immunreaktivität), zeichnet sich in der Läsionsgruppe eine geringe Steigerung der SDF-1-Expression ab (Läsion: $0,54 \pm 0,27$ % Flächenanteil SDF-1-Immunreaktivität). Dahingegen war der Anstieg der SDF-1-Expression in der Gruppe Läsion+Zellen in der kontralateralen Hemisphäre signifikant im Vergleich zu den kontralateralen Hemisphären der beiden anderen Gruppen (Läsion+Zellen: $1,47 \pm 0,27$ % Flächenanteil SDF-1-Immunreaktivität).

4.4 Lokalisation der SDF-1-Expression in Arealen erhöhter CD68-Expression

Die Frage, ob das in dieser Arbeit untersuchte Chemokin SDF-1 in den pathomorphologisch veränderten Arealen rund um den zystischen Lateralventrikel detektierbar ist, wurde durch immunhistochemische Analysen untersucht, die zum Zeitpunkt P21 stattfanden. Zwei Wochen nach Induktion des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens haben sich in unmittelbarer Läsionsumgebung Inflammation und programmierter Zelltod eingestellt (siehe Abb. 2).

Die Insult-bedingten entzündlichen Folgeschäden in der unmittelbaren Umgebung der Läsion wurden charakterisiert durch aktivierte Mikroglia, die sich mit Hilfe des Markers CD68 detektieren lassen. Durch die Doppelmarkierung von SDF-1 und dem Marker für aktivierte Mikroglia (CD68) konnte die Expression des Chemokins SDF-1 im Inflammationsgebiet dargestellt werden (Abb. 6). Eine Kolokalisation von SDF-1 und aktivierten Mikroglia (CD68) lag nicht vor.

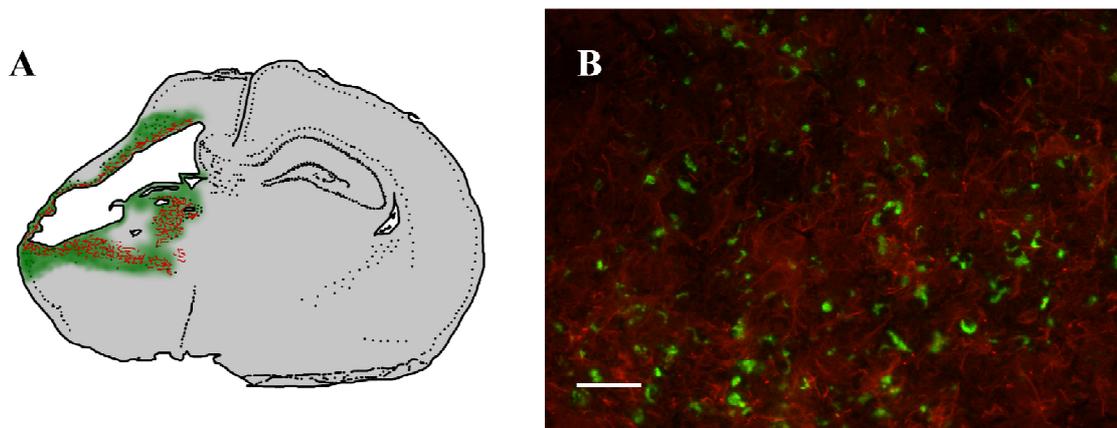


Abb. 6: Immunhistochemische Darstellung des Chemokins SDF-1 im Inflammationsgebiet zum Zeitpunkt P21. A) Schematische Darstellung der SDF-1-Immunreaktivität (rot) und die Lokalisation der CD68 immunpositiven Zellen (grün). Abbildung B) zeigt, dass SDF-1 (rot) und CD68 (grün) in der läsierten Hemisphäre in den gleichen Arealen detektierbar sind. Der Kalibrierungsbalken entspricht 50 μm .

4.5 Detektion humaner Zellen in Arealen mit SDF-1-Expression

Die HLA-DR-exprimierenden humanen Zellen sind rund um die Läsion detektierbar (siehe Abb. 3). Durch immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ihre

Lokalisation in der läsierten Hemisphäre zum Zeitpunkt P21 in einem Großteil den Hirnarealen entspricht, in denen auch eine erhöhte SDF-1-Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 7). Eine Kolokalisation zwischen HLA-DR und SDF-1 auf zellulärer Ebene ließ sich nicht nachweisen.

Transplantierte humane umbilikale Zellen konnten zum Zeitpunkt P21 mittels immunhistochemischer Analyse mit dem Leukozytenmarker HLA-DR in den läsiernahen Hirnarealen nachgewiesen werden, in denen auch eine Expression des SDF-1-Proteins detektierbar war. Allerdings ließen sich zum Zeitpunkt P21 auch Hirnareale finden, in denen eine starke SDF-1-Immunreaktivität detektierbar war, in denen aber keine humanen Zellen nachgewiesen werden konnten. Besonders am läsiernahen Randsaum des Kortex ließ sich dies Phänomen beobachten.

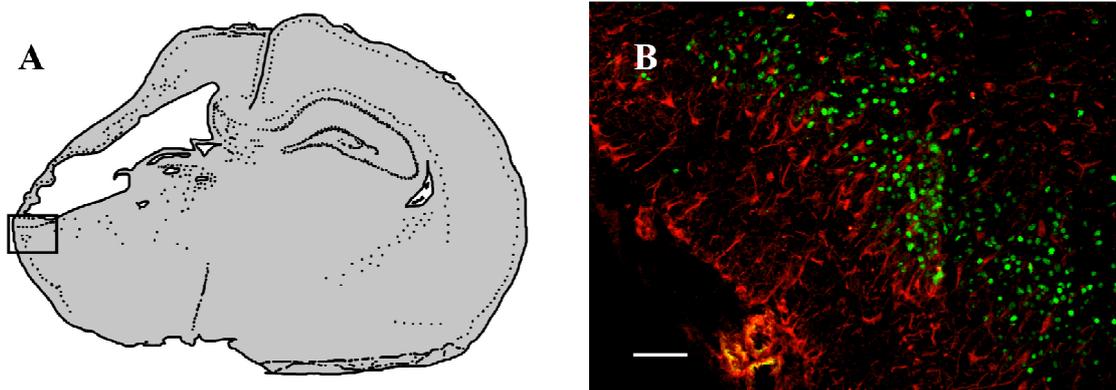


Abb. 7: Immunhistochemische Analyse für SDF-1 und HLA-DR-immunpositive Zellen. A) zeigt die schematische Darstellung eines läsierten Rattenhirns zum Zeitpunkt P21. Der mit einem Viereck markierte Gewebeausschnitt in der linken Hemisphäre entspricht der in Abbildung B) immunhistochemisch dargestellten Region. Abbildung B) zeigt die immunhistochemische Analyse für SDF-1 (rot) und die HLA-DR-immunpositiven Zellen (grün). Hier ist eine unmittelbare räumliche Nähe der humanen Zellen und der SDF-1 exprimierenden Zellen feststellbar. Der Kalibrierungsbalken entspricht 50 μm .

4.6 Reaktive Astrozyten als zellulärer Ursprung von SDF-1

Um den zellulären Ursprung des SDF-1-Proteins nachzuweisen, wurde zum Zeitpunkt P21 untersucht, ob reaktive Astrozyten, die im Läsionsgebiet vermehrt detektiert wurden, hierfür infrage kommen. Durch die immunhistochemische Doppelmarkierung von SDF-1 mit dem astrozytären Markerprotein GFAP wurde dies analysiert (Abb. 8).

Bei der immunhistochemischen Analyse zum Zeitpunkt P21 konnte eine Kolokalisation der Immunfluoreszenz von SDF-1 und GFAP nachgewiesen werden. Die Doppelmarkierung der Zellen weist darauf hin, dass SDF-1 von reaktiven Astrozyten exprimiert wird. Allerdings ist auch ersichtlich, dass SDF-1 in geringerer Menge exprimiert wird als reaktive Astrozyten vorhanden sind.

Die Abbildung 8A zeigt die Astrozyten im läsierten Rattengewebe, dargestellt durch den astrozytären Marker GFAP. Abbildung 8B zeigt die Immunreaktivität für SDF-1 im selben Gewebeausschnitt. Auffällig ist bei dieser Einzelmarkierung für SDF-1 die verminderte Immunreaktion gegenüber dem Astrozytenmarker GFAP. In der Abbildung C, in der die vorherigen Abbildungen A und B übereinandergelegt sind, wird die Kolokalisation von SDF-1 und dem astrozytären Markerprotein GFAP deutlich. Diese stellt sich in der Abbildung in Gelb dar und wird durch die Pfeile hervorgehoben.

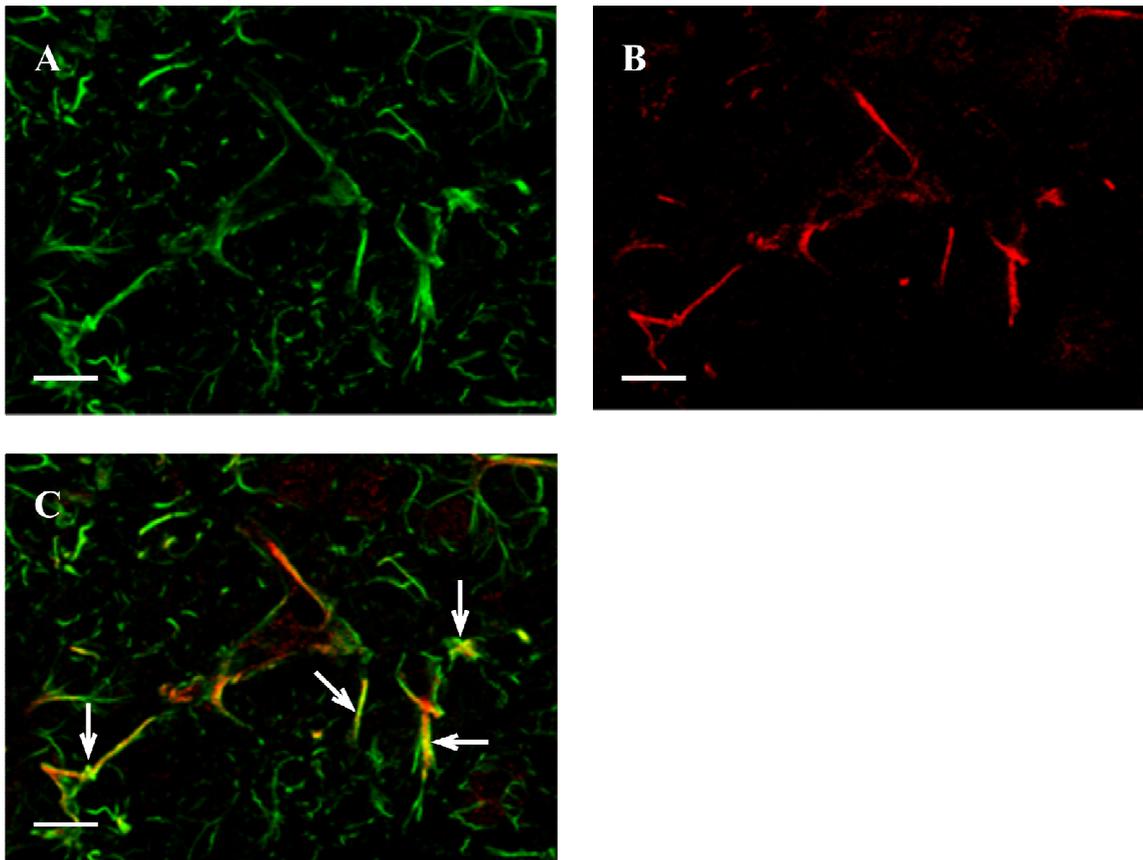


Abb. 8: Darstellung des zellulären Ursprungs von SDF-1 mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung mit dem astrozytären Marker GFAP zum Zeitpunkt P21. A) zeigt die Einzelmarkierung für GFAP (grün), in B) ist die Gewebereaktion für SDF-1 (rot) zu sehen. In Abbildung C) wurden die beiden Einzelbilder übereinandergelegt. Die Kolokalisation von GFAP und SDF-1 erscheint in Gelb (siehe Pfeile). Die Kalibrierungsbalken entsprechen 50 μ m.

4.7 Umbilikale Zellen exprimieren den SDF-1 spezifischen Rezeptor CXCR4

Um die Hypothese zu verifizieren, SDF-1 sei am „Homing“ der humanen umbilikalischen Zellen zur Läsion beteiligt, müssten diese Zellen den entsprechenden Rezeptor CXCR4 exprimieren. Dies wurde durch die immunzytochemische Auswertung von Zytospins umbilikalischer Zellen untersucht (Abb. 9).

Die mikroskopische Auswertung der immunzytochemischen Analyse von Zytospins frisch isolierter humaner Zellen aus Nabelschnurblut zeigte, dass eine Anzahl von umbilikalischen Zellen den SDF-1-Rezeptor CXCR4 exprimieren. Erkennen lassen sich diese CXCR4-immunpositiven Zellen durch die grüne Markierung. In dem in Abbildung 9 gezeigten Zytospin wird durch die Hoechst-Färbung (blau) deutlich, dass nicht alle Zellen aus hNSB den CXCR4-Rezeptor exprimieren. Diese Blaufärbung markiert alle Zellkerne und dient somit ihrer Identifizierung. Auf der immunzytochemischen Negativkontrolle eines Zytospins waren keine Signale detektierbar (Daten nicht gezeigt).

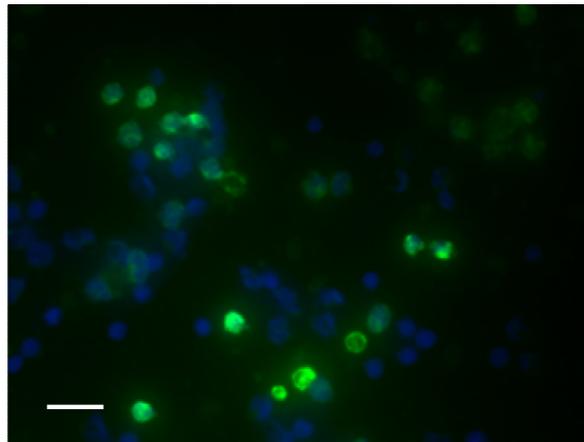


Abb. 9: Immunzytochemische Analyse von Zytospins der humanen Zellen mittels Detektion des CXCR4-Rezeptors. Die Abbildung zeigt einen Zytospin frisch isolierter humaner umbilikalischer Zellen mit Detektion des Proteins CXCR4 (grün). Die Hoechst-Färbung (blau) diente der Identifizierung der Zellkerne. Der Kalibrierungsbalken entspricht 20 µm.

4.8 Zusammenhang zwischen SDF-1-Expressionsstärke und der Anzahl humaner umbilikalischer Zellen an der Läsion

Wenn SDF-1 ursächlich für die gerichtete Migration der humanen umbilikalischen Zellen zur Läsion verantwortlich ist, wie die Expression vermuten lässt, so könnte eine Korrelation

zwischen der Menge des vorhandenen SDF-1 und der Anzahl der humanen umbilikalischen Zellen an der Läsion bestehen.

Zunächst wurde eine semi-quantitative Auswertung der SDF-1-Expression an der Läsion und der Menge der Zellen aus hNSB durchgeführt. Mittels immunhistochemischer Doppelmarkierung von SDF-1 und HLA-DR an Läsionstieren mit transplantierten humanen umbilikalischen Zellen (Läsion+Zellen) zum Zeitpunkt P21 wurde in den linken Hemisphären untersucht, ob die Stärke der SDF-1-Expression mit der Anzahl der in diesem Bereich detektierbaren umbilikalischen Zellen korreliert. In Hirnschnitten, die im adulten Rattenhirn Bregma $-2,9 \pm 0,5$ mm entsprechen, wurde bei geringer Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop eine visuelle Durchsicht der Tiergruppe Läsion+Zellen vorgenommen.

Tabelle 4: Visueller Vergleich der Detektion von SDF-1 und der Menge der migrierten HLA-DR-positiven Zellen in der Gruppe Läsion+Zellen an P21 mittels Immunhistochemie. • = sehr geringe bis ••••• = sehr starke Expression (SDF-1) bzw. Menge der humanen Zellen (HLA-DR).

Läsion+Zellen (n=5)	SDF-1	HLA-DR
1. Läsion+Zellen	•••	••
2. Läsion+Zellen	••	•••••/•••
3. Läsion+Zellen	••••	••
4. Läsion+Zellen	•••••	••••
5. Läsion+Zellen	••••	••

Zum Zeitpunkt P21 lässt sich im gesamten Hirnareal, das um den vergrößerten linken Lateralventrikel herum stark verändert erscheint, eine erhöhte SDF-1-Expression beobachten. Die semi-quantitative Auswertung der SDF-1-Expressionsstärke und der Anzahl der HLA-DR positiven Zellen ergibt jedoch keinen offensichtlichen direkten Zusammenhang zwischen diesen Parametern.

4.9 Analyse der SDF-1-Expression mittels Immunoblot

Zur Quantifizierung der SDF-1-Expression in den verschiedenen Gruppen wurden Immunoblot-Analysen durchgeführt. Da der verwendete SDF-1-Antikörper auch für die immunhistochemische Darstellung des SDF-1 in den Hirnschnitte der Ratten verwendet worden war, sollte der Antikörper SDF-1 auch in Hirnhomogenaten der Ratte in der Immunoblot-Analyse erkennen. Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen für den Antikörper in der Immunoblot-Analyse wurden zunächst rekombinantes Maus SDF-1-Protein sowie rekombinantes humanes SDF-1-Protein als Probe eingesetzt.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, konnte mit dem verwendeten SDF-1-Antikörper sowohl bei humanem SDF-1 als auch bei Maus SDF-1 eine Proteinbande auf einer Molekulargewichtshöhe von 10 kD detektiert werden. Dabei erscheint die Proteinbande bei rekombinantes Maus SDF-1 visuell schwächer als die bei rekombinantes Human SDF-1.

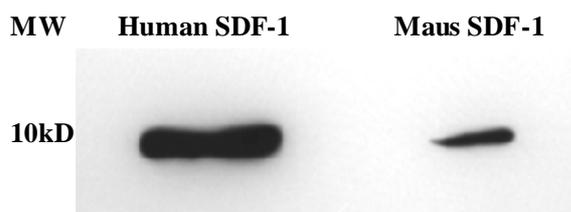


Abb. 10: Immunoblot für rekombinantes SDF-1-Protein von Mensch und Maus. Signaldetektion in Höhe von 10 kD für beide rekombinantes SDF-1-Proteine nach Behandlung mit dem SDF-1-Antikörper. Die Proteinbande für das humane rekombinante SDF-1-Protein (links) ist deutlicher ausgeprägt.

Zur Analyse der SDF-1-Expression in den Gehirnen wurden aus jeweils drei linken und drei rechten Hemisphären der drei untersuchten Gruppen (Sham, Läsion, Läsion+Zellen) Proteinproben angefertigt. Diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran mit dem SDF-1-Antikörper inkubiert. In keiner der Proteinproben der linken und rechten Hemisphären der drei behandelten Tiergruppen konnte endogenes SDF-1 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher war eine Analyse der SDF-1-Expression in den unterschiedlichen Tiergruppen mittels der Methode des Immunoblots nicht möglich.

5 Diskussion

Die Transplantation mononukleärer Zellen aus Nabelschnurblut stellt eine potentielle Behandlungsmöglichkeit für Erkrankungen des Zentralen Nervensystems dar. Das Potential von humanen Nabelschnurblutzellen konnte in den letzten Jahren in Tiermodellen verschiedener Erkrankungen gezeigt werden. Darunter war auch das in dieser Arbeit näher untersuchte Modell des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens. Eine vor, während oder kurz nach der Geburt durch Sauerstoffmangel erlittene Hirnschädigung kann zu lebenslangen neurologischen Folgeerkrankungen bei den Kindern führen. Da Behandlungsmethoden bei frühkindlichen Hirnschäden bislang begrenzt sind, bietet die Therapie mit Zellen aus Nabelschnurblut einen viel versprechenden Ansatz. So konnte von Meier et al. (2006) gezeigt werden, dass die Transplantation umbilikaler Zellen in ein Modell des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens zu Verbesserungen Läsions-induzierter motorischer Defizite führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die peripher applizierten umbilikalen Zellen zur Läsion im Gehirn wandern.

Für diese Arbeit ergab sich aus den bisherigen Forschungsansätzen die Frage, wie die intraperitoneal transplantierten Zellen den Weg zur Läsion im Gehirn finden. In der Literatur werden chemotaktische Botenstoffe als mögliche Mediatoren beschrieben. Die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten im Modell eines hypoxisch-ischämischen Hirnschadens an neonatalen Ratten und wurden zum Zeitpunkt des 21. Postnataltages durchgeführt.

5.1 Perinataler hypoxisch-ischämischer Hirnschaden

Eine durch fetale oder neonatale Asphyxie verursachte Hirnschädigung kann bei den Säuglingen zu lebenslangen neurologischen Folgeerkrankungen führen (Berger and Garnier, 2000; Volpe, 2008). Die Pathophysiologie eines solchen hypoxischen Insults lässt sich zeitlich in zwei Phasen einteilen: In der akuten Phase kommt es zum exitotoxischen und nekrotischen Zelltod im Zentrum der zerebralen Läsion. In der umgebenden Penumbra findet durch Verminderung des Blutflusses eine Zelldepolarisation statt. In der nachfolgenden Subakutphase kommt es zu einer postischämischen Inflammation mit Aktivierung der Mikroglia und Astrozyten (Ladeby et al., 2005; Streit et al., 1999), sowie zum programmierten Zelltod (Apoptose) (Berger et al., 2002).

Es wurde ein Tiermodell entwickelt, um die pathophysiologischen Vorgänge bei der frühkindlichen hypoxischen Hirnschädigung zu simulieren. Dies gelang mit dem Levine-Modell (Levine, 1960) in der Modifikation nach Rice (1981) (siehe 3.2), das für die Analyse der Folgen eines perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens besonders geeignet ist (Vannucci and Hagberg, 2004).

Zum Zeitpunkt des unilateral induzierten Hirnschadens an P7 weisen das Rattenhirn und das frühkindliche humane Gehirn (um die 35. Schwangerschaftswoche) Analogien in der Genese auf: Während das Gehirn des Menschen innerhalb der letzten vier Schwangerschaftsmonate und nach der Geburt bis zum etwa dritten Lebensjahr eine Phase des progressiven Wachstums durchläuft, die ihren Klimax um die 35. Schwangerschaftswoche erfährt, ist dieser Entwicklungshöhepunkt beim Rattenhirn zwischen dem sechsten und zehnten Postnaltag (Dobbing, 1974; Hagberg et al., 2002). Sowohl im Stadium der Gehirnvulnerabilität während der Wachstumsphasen (Dobbing, 1974), im Ausmaß der striatalen und kortikalen Myelinisierung (Volpe, 2008), in der Entwicklung der γ -Aminobutyrat abhängigen Neurone (Johnston and Coyle, 1981) und im Energiebedarf des Gehirns (Nehlig and Pereira de Vasconcelos, 1993) entsprechen sich die Entwicklungsvorgänge von Mensch und Ratte.

Aufgrund der nachgewiesenen Ähnlichkeit des Rattenhirns mit dem des frühkindlichen Hirns ist davon auszugehen, dass das in dieser Arbeit verwendete Levine-Modell zu gewissen Teilen auf das Kleinkind übertragbar ist. Daher eignet sich dieses Modell für die Untersuchungen hypoxisch-ischämisch bedingter Folgeschäden und deren mögliche Therapie.

5.2 Pathomorphologische Charakterisierung des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens im Levine-Modell

Um die Vergleichbarkeit des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens innerhalb der untersuchten Tiergruppen zu gewährleisten, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Rattenhirne zum Zeitpunkt P21 einer makroskopischen und mikroskopischen Analyse unterzogen.

5.2.1 Makroskopische Schadenseinteilung nach Bona

Die in dieser Arbeit untersuchten Rattenhirne wiesen einen makroskopisch validierbaren Hirnschaden mit einem Makroskore von 3 nach der Schadenseinstufung (0 - 3) von Bona et al. (1997) auf. Nach dieser Klassifizierung wird der induzierte Schaden in den ipsilateralen Hemisphären nach dem Schweregrad der makroskopisch ersichtlichen Hirndeformation bemessen. Der Makroskore 3 entspricht einer zystischen Veränderung, die nahezu die gesamte ipsilaterale Hemisphäre einnimmt und größer als 4 mm ist.

Makroskopisch erschien die Oberfläche der in dieser Arbeit untersuchten Rattenhirne an P21 durch die Läsion verändert und wiesen im Bereich der linken Hemisphäre eine flüssigkeitsgefüllte Zyste auf. Zusätzlich war das Volumen der geschädigten Hemisphäre im Vergleich zur kontralateralen Seite vermindert (Meier et al., 2006). Auch im menschlichen Gehirn ist ein solcher Strukturverlust einschließlich Liquor-gefüllter Zyste nach perinatal erlittener Hypoxie zu beobachten, der dem experimentellen Hirnschaden im Levine-Modell am Postnataltag 21 entspricht (Bähr und Frotscher, 2003)

5.2.2 Schadensdarstellung durch die Färbemethode nach Klüver-Barrera

Histologisch ließ sich in dieser Arbeit durch die Klüver-Barrera Färbung einzelner Gewebeschnitte die Schadensausprägung exakt analysieren. Stellvertretend für den Gesamtbereich des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens wurde die Schadensausbreitung zum Zeitpunkt P21 in der Ebene bewertet, die im adulten Tier Bregma $-2,9 \pm 0,5$ mm entspricht.

In den untersuchten Gewebeschnitten eines hypoxisch-ischämischen Gehirns ließen sich neuronale Degenerationszeichen mikroskopisch erkennen. Diese äußerten sich im Läsionsgebiet der linken Hemisphäre, zu dem sowohl der Hippokampus, Corpus callosum, Nucleus caudatus, Putamen, Thalamus, die Basalganglien und der zystisch veränderte Lateralventrikel zählen, in Form von zellulären Schrumpfung, Vakuolisierung und einer Vielzahl von hyperchromatischen Nuklei. Außerhalb des Schadenareals waren nur sehr vereinzelt hyperchromatische Zellen detektierbar.

In den kontralateralen Hemisphären sowie in den Hirnschnitten der Sham-operierten Tiere waren keine pathologischen Veränderungen zu erkennen. Die Sham-operierten Tiere dienten deshalb als Kontrollgruppe.

Diese anatomischen Veränderungen im Rattenhirn sind vergleichbar mit denen eines frühkindlichen Hirnschadens, der infolge einer Hypoxie auftreten kann (Berger, 1999).

Durch die makroskopischen und mikroskopischen Analysen ließ sich die untersuchte Bregmaregion $-2,9 \pm 0,5$ mm eindeutig der Schadensregion zuordnen. Durch die beiden angewandten Untersuchungsmethoden ist eine Standardisierung der Versuchsgruppen gewährleistet und somit eine Validierung der Ergebnisse sichergestellt.

5.2.3 Inflammation und programmierter Zelltod

Im Läsionsgebiet und den angrenzenden Hirnbereichen lassen sich die molekularen Mechanismen, die zu strukturellen Veränderungen führen, am besten durch zwei pathogene Prozesse charakterisieren: Inflammation und Apoptose (Berger et al., 2002; Rothwell et al., 1997).

Die Inflammation setzt bereits kurze Zeit nach Induktion des hypoxisch-ischämischen Insults ein und kann durch den Anstieg der Zahl aktivierter Mikrogliazellen und Makrophagen nachgewiesen werden (Ivacko et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit ließ sich anhand von immunhistochemischen Analysen, die zwei Wochen nach dem Insult zum Zeitpunkt des 21. Postnataltages vorgenommen wurden, die Inflammation darstellen. Durch die immunhistochemische Markierung dieser Entzündungszellen über das Markerprotein CD68 gelang die Darstellung einer deutlich ausgeprägten Inflammation in den Hirnarealen, die den Lateralventrikel umgeben. In der kontralateralen Hemisphäre und in beiden Hemisphären der Sham-operierten Tiere ließen sich dagegen immunhistochemisch keine aktivierten Mikroglia detektieren.

Andere Studien haben gezeigt, dass sich die inflammatorischen Vorgänge bereits zwei Tage nach Induktion der artifiziellen Hirnschädigung (zum Zeitpunkt P9) durch immunhistochemische Analysen darstellen lassen (Rosenkranz et al., 2010). Die Anzahl der aktivierten Mikroglia war zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu P21 geringer. Dies korreliert mit Ergebnissen aus klinischen Studien, die eine Verstärkung der Entzündungsreaktion im Zeitablauf der postischämischen Gewebeschädigung bei zunehmender Dauer des Insults beschreiben (Billiards et al., 2006).

In zweiter Instanz, Stunden bis mehrere Tagen nach einem hypoxisch-ischämischen Hirnschaden, folgt am Ende der postischämischen Phase des Entzündungsprozesses der programmierte Zelltod. Verschiedene Untersuchungen beschäftigen sich mit dem postischämischen Zelltod und mit der Frage, welche Vorgänge für ihn verantwortlich sind. Nicht nur im Tiermodell, auch an *post mortem* untersuchten kindlichen anatomischen

Präparaten konnte eine erhöhte Expression apoptotischer Proteine beobachtet werden (Felderhoff-Mueser and Ikonomidou, 2000). Caspasen sind Proteine, die an dem Vorgang der Apoptose exekutiv beteiligt sind (Du et al., 1997; Schulz et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Caspase3 exemplarisch für alle apoptotisch wirksamen Caspasen untersucht. Dies geschah mit Hilfe von Antikörpern, die ausschließlich die aktivierte Form der Caspase3, die Cleaved-Caspase3, erkennen. Die immunhistochemischen Analysen der ipsilateralen Hemisphäre zeigten in der unmittelbaren Nachbarschaft des Lateralventrikels im Läsionsgebiet eine deutliche Expression des Markerproteins Cleaved-Caspase3. Außerhalb der Schadensregion, als auch in der kontralateralen Hemisphäre, sowie in den Hirnen der Sham-operierten Tiere konnte lediglich eine minimale Expression von Cleaved-Caspase3 nachgewiesen werden. Das stimmt mit den Daten von Yue et al. (1997) überein, die ermittelten, dass die Expression von Caspasen in dieser postnatalen Entwicklungsphase auch im gesunden Hirn physiologisch stattfindet.

Die Hirnareale, in denen Apoptose detektiert werden konnte, decken sich großteils mit den Regionen, in denen mittels CD68 auch Inflammation beobachtet wurde. Diese Regionen beinhalten vor allem Hirnstrukturen in Begrenzung des Lateralventrikels und das kaudale Segment des Putamen.

Andere Studien haben gezeigt, dass bereits zwei Tage nach hypoxischem Insult, zum Zeitpunkt P9, apoptotische Zellen im Läsionsareal detektiert werden können. Die Anzahl dieser Zellen scheint geringer als zum Zeitpunkt P21 (Rosenkranz et al., 2010). Dies hängt mit der Pathophysiologie der Hirnschädigung zusammen, bei der die Apoptose erst in der subakuten Phase der Hirnschädigung einsetzt und sich dann ausbreitet (Berger et al., 2002).

5.3 Klinische Therapiestrategien zur Vermeidung oder Eingrenzung eines perinatalen hypoxischen Hirnschadens

Die Interventions- und Therapiemöglichkeiten bei einer frühkindlichen Hypoxie sind begrenzt. In Tiermodellen wurden vielfältige Pharmazeutika untersucht, um den schwerwiegenden Auswirkungen eines perinatalen Hirnschadens entgegen zu wirken. Dazu gehörten die Inhibition von Sauerstoffradikalen (Palmer, 1995), Kalziumkanalblocker (Schurr, 2004), Kreatinblocker (Berger et al., 2004) und Antagonisten exzitatorischer Aminosäuren (Bona et al., 1997). Mit diesen Therapien

wurden in experimentellen Studien positive Effekte erzielt. Allerdings ließen sich diese Behandlungsstrategien klinisch nicht zur Behandlung eines hypoxiebedingten frühkindlichen Hirnschadens etablieren.

Einzig die Ganzkörper- bzw. selektive Hirnhypothermie (Gluckman et al., 2005) konnte bisher erfolgreich klinisch eingesetzt werden. Bei dieser Methode konnte gezeigt werden, dass eine Temperatur-Reduktion um 3-4°C in experimentellen Studien die neuronalen pathophysiologischen Folgen vermindert (Busto et al., 1987; Green et al., 1992; Widmann et al., 1993). Des Weiteren zeigten so behandelte Tiere Verbesserungen im Verhalten (Green et al., 1992). In der klinischen Anwendung wird von einer höheren Überlebensrate und Verbesserung der Entwicklung auf neuronaler Ebene berichtet (Gluckman et al., 2006; Jacobs et al., 2007; Yenari and Hemmen, 2010).

Aufgrund der beschriebenen begrenzten Therapieerfolge und geringen Möglichkeiten der präventiven Maßnahmen, die zurzeit nach perinatal erlittenem Sauerstoffmangel klinisch angewendet werden können, scheint der Einsatz von umbilikalen Zellen als mögliche zukünftige Therapiemaßnahme interessant.

5.4 Transplantation umbilikaler Zellen nach perinatalem hypoxisch-ischämischem Hirnschaden

5.4.1 Das therapeutische Potential adulter Zellen aus Nabelschnurblut

Es gibt verschiedene Arten von Stammzellen, die in diversen Studien untersucht wurden: Sowohl embryonale als auch adulte Stammzellen finden Einsatz in einer Vielzahl von Modellen unterschiedlicher Erkrankungen.

In Studien, die sich mit Schädigungen des Zentralen Nervensystems beschäftigen, konnte bereits gezeigt werden, dass unter Gabe von Zellen aus Nabelschnurblut sowohl im Modell eines Schlaganfalls (Chen et al., 2001) als auch im Trauma-Modell (Lu et al., 2002) eine funktionelle Besserung motorischer und kognitiver Defizite beobachtet werden konnten. Auch nach Schädigungen des Rückenmarks wurde ein positiver therapeutischer Effekt durch Transplantation von umbilikalen Zellen beschrieben (Saporta et al., 2003). Im Modell des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens konnten Verbesserungen der Motorik sowie Läsions-induzierter kognitiver Defizite nach Transplantation umbilikaler Zellen diagnostiziert werden (Meier et al., 2006; Pimentel-Coelho et al., 2010; Yasuhara et al., 2010).

Aufgrund der vorliegenden Daten und der möglicherweise durch umbilikale Zellen mediierten therapeutischen Effekte wurden in der vorliegenden Arbeit diese Zellen nach induziertem hypoxisch-ischämischem Insult neonataler Ratten intraperitoneal transplantiert und ihr Migrationsverhalten an Hirnschnitten zum Zeitpunkt P21 untersucht.

Zum Untersuchungszeitpunkt P21 konnten im Schadensgebiet der linken Hemisphäre HLA-DR-markierte umbilikale Zellen spezifisch detektiert werden. Die Zellen waren in das astrozytäre Netzwerk des läsionierten Gewebes inkorporiert. Außerhalb der Läsion waren in der ipsilateralen Hemisphäre nur sehr vereinzelt Zellen auffindbar. Die Untersuchung der intakten Hemisphäre ergab mittels immunhistochemischer Analyse keine Detektion HLA-DR-markierter Zellen aus Nabelschnurblut.

Die spezifische Detektion der umbilikalen Zellen gezielt nur in Bereichen der Läsion lässt eine gerichtete Migration dieser Zellen vermuten. Das Vorhandensein der Zellen im läsionierten Hirngewebe auch noch 13 Tage nach Transplantation weist auf eine funktionelle Bedeutung hin. Die Theorie der gerichteten Migration wird durch Ergebnisse anderer Studien gestützt, die die Präsenz der umbilikalen Zellen in Bereichen der Läsion bereits 24 Stunden nach peripherer Transplantation (zum Zeitpunkt P9), beschreiben (Rosenkranz et al., 2010). Auch zu diesem frühen Zeitpunkt wurden die humanen Zellen nur in der ipsilateralen Schadensregion detektiert, wobei ihre Anzahl geringer war als zum Zeitpunkt P21.

Die Ergebnisse, dass umbilikale Zellen bereits kurz nach intraperitonealer Applikation im läsionierten Rattenhirn detektiert werden konnten und dort auch nach 2 Wochen noch präsent waren, wirft die Frage auf, welche Mechanismen diese gerichtete Migration der humanen Zellen mediierten.

5.4.2 Gerichtete Migration umbilikaler Zellen durch chemoattraktive Faktoren

Grundlage für die nachfolgenden Analysen waren die Ergebnisse, dass humane Zellen zum Zeitpunkt P21 im inflammatorisch veränderten und apoptotisch geschädigten Rattengewebe beobachtet werden konnten.

Ein möglicher Mechanismus für das oben beschriebene Zellverhalten könnte die Expression starker Signale an der Läsion sein. Als mögliche Faktoren kommen Adhäsions-Moleküle sowie Chemokine in Frage.

Chemokine sind eine Untergruppe der Zytokine und bekannt dafür, dass sie nach Schädigung des Gehirns während der Inflammationsphase vermehrt sezerniert werden.

Bona et al., (1999) berichteten von der vermehrten Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen nach hypoxisch-ischämischem Hirnschaden in Ratten. Aus ischämischen Hirnarealen nach Insult hergestelltes Homogenat induzierte parakrin die Migration von Zellen aus Nabelschnurblut in vitro auf das läionierte Hirngewebe hin (Chen et al., 2001). Dass die Ausschüttung von Zytokinen chemoattraktiv auf Zellen aus Nabelschnurblut wirkt, zeigten auch Studien von Newman et al., (2005) in einem Schlaganfallmodell. Daher könnte auch das in der vorliegenden Arbeit beschriebene „Homing“ der umbilikalischen Zellen zur geschädigten Hirnhemisphäre durch die Expression und Sekretion von Chemokinen erfolgen.

5.5 Das Chemokin SDF-1

In dieser Arbeit wurde das Protein SDF-1 und seine chemotaktische Wirkung auf Zellen aus hNSB analysiert, da sein chemoattraktives Potential bereits in anderen Studien für verschiedenste Zellarten wie Lymphozyten (Bleul et al., 1996), Monozyten (Bleul et al., 1996), Endothelzellen (Gupta et al., 1998), hämatopoetische Vorläuferzellen (Aiuti et al., 1997) und CD34-positive hämatopoetische Zellen aus Nabelschnurblut (Christopherson et al., 2002; Ohno et al., 2008) gezeigt worden ist.

5.5.1 Expression des Chemokins SDF-1 im Levine-Modell

Mittels immunhistochemischer Analysen, die an Hirnschnitten drei Wochen alter Wistar-Ratten vorgenommen wurden, ließ sich eine deutliche Immunreaktivität für das Protein SDF-1 in den nach Läsion pathomorphologisch veränderten Hirnarealen beobachten, die den zystisch veränderten Lateralventrikel umgeben. Die Expression von SDF-1 korrelierte mit der Expression aktivierter Mikroglia (CD68-positiv), die die Schadensregion charakterisieren.

In den kontralateralen Hirnhemisphären konnte nur eine geringe Expression von SDF-1 nachgewiesen werden, die als physiologisch eingestuft werden kann. Die Expression von SDF-1 in den läionierten Hemisphären war signifikant stärker als die Immunreaktivität in den Hemisphären Sham-operierter Tiere.

In anderen Studien konnte bereits zum Zeitpunkt P9 ein erhöhter SDF-1-Proteinlevel in läionierten Hemisphären gezeigt werden (Rosenkranz et al., 2010). Auch in anderen

experimentellen Modellen wird ein Anstieg der SDF-1-Expression nach Hirnschädigung beschrieben. So zeigten Miller et al. (2005) in einem Modell des perinatalen Hirnschadens in Mäusen, dass die Expression von SDF-1 drei Tage nach dem Insult am höchsten war und nach 10 Tagen auf physiologische Werte abgesunken war. Dagegen konnten in einem adulten Schlaganfall-Modell bis zu 30 Tage nach Insult erhöhte SDF-1-Proteinkonzentrationen beobachtet werden (Hill et al., 2004). In diesen Studien scheint die Dauer der SDF-1-Ausschüttung abhängig vom Alter der behandelten Tiere zu sein: Je älter die Tiere, desto länger war die SDF-1-Ausschüttung erhöht. Allerdings konnte in dieser Arbeit im perinatalen Hirnschaden der Ratte auch nach 14 Tagen noch eine deutlich erhöhte SDF-1-Expression nachgewiesen werden.

Eine Expression von SDF-1 im intakten Gewebe wurde auch in anderen Studien detektiert. Allerdings variierten die Aussagen dahingehend, dass sowohl eine schwache (Hill et al., 2004), als auch eine starke Expression des SDF-1-Proteins (Tham et al., 2001) unter physiologischen Bedingungen beschrieben wird.

Diese Unterschiede in der Dauer und der Stärke der Expression von SDF-1 lassen sich möglicherweise durch die Analyse von mRNA versus Protein erklären.

Mit der zur weiteren Analyse der SDF-1-Expression herangezogenen Methode des Immunoblots war es in dieser Arbeit nicht möglich, SDF-1 in Hirnhomogenaten nach hypoxisch-ischämischem Hirnschaden nachzuweisen. Obwohl der verwendete Antikörper rekombinantes SDF-1 erkannte, ließen sich keine spezifischen Immunreaktionen auf Höhe des erwarteten Molekulargewichts von SDF-1 (10 kD) detektieren. Es ist möglich, dass die sezernierte SDF-1-Menge im Rattenhirn zu gering war um mittels Immunoblot nachgewiesen werden zu können. In weiterführenden Analysen müsste daher eine höhere Proteinkonzentration verwendet werden.

5.5.2 Der zelluläre Ursprung von SDF-1

In dieser Arbeit wurde neben dem räumlichen Expressionsmuster des Chemokins SDF-1 auch der zelluläre Ursprung dieses Proteins im Läsionsareal untersucht.

Mittels immunohistochemischer Analysen von SDF-1 und dem astrozytären Markerprotein GFAP konnte eine Kolokalisation dieser beiden Proteine in der vorliegenden Arbeit verifiziert werden. Somit konnten reaktive Astrozyten im Läsionsareal als Ursprung der Expression des SDF-1-Proteins nach induziertem hypoxisch-ischämischem Hirnschaden identifiziert werden.

In anderen Studien wurde über andere neurale Zellen als mögliche Expressionsquelle von SDF-1 berichtet. Es wurden sowohl Neurone und Oligodendrozyten (Gleichmann et al., 2000) als auch Endothelzellen (Stumm et al., 2002) und Astrozyten (Ohtani et al., 1998) als mögliche Quelle diskutiert.

Diese Diskrepanzen in der Identifikation des Ursprungsortes von SDF-1 resultieren möglicherweise aus der Detektion verschiedener Isoformen von SDF-1 (Shirozu et al., 1995). Die in dieser Arbeit beobachtete Steigerung der SDF-1-Expression in reaktiven Astrozyten nach Läsion, konnte auch nach Applikation pro-inflammatorischer Agentien in anderen Studien beobachtet werden (Guillemin et al., 2003; Hill et al., 2004; Krumbholz et al., 2006).

Der in dieser Arbeit beobachtete signifikante Anstieg der SDF-1-Expression nach hypoxisch-ischämischem Insult kann möglicherweise mehrere Funktionen haben. Sowohl bei der Angiogenese als auch bei der Vaskulogenese konnte dem Protein SDF-1 positive Eigenschaften zugewiesen werden (Hiasa et al., 2004; Mirshahi et al., 2000). Somit könnte SDF-1 bei der Reparatur des geschädigten Gewebes eine entscheidende Rolle spielen.

Des Weiteren könnte der erhöhte SDF-1-Proteinlevel chemoattraktiv sowohl auf endogene, als auch auf exogene Zellen wirken (Bleul et al., 1996; Hill et al., 2004; Tabatabai et al., 2005), die potentiell ebenfalls zur Regeneration des Gehirns beitragen.

5.5.3 Expression des Chemokins SDF-1 nach Transplantation von umbilikalen Zellen im Levine-Modell

Die immunhistochemische Analyse von SDF-1 und HLA-DR als Markerprotein für die humanen Zellen zeigten im untersuchten Modell zum Zeitpunkt P21 eine unmittelbare Nachbarschaft der HLA-DR-exprimierenden Zellen und des Proteins SDF-1 in denselben Hirnarealen. Hervorzuheben ist dabei, dass nicht in allen Hirnregionen, in denen SDF-1-Protein detektiert wurde, auch transplantierte Zellen aus hNSB detektiert werden konnten. Nach Transplantation umbilikaler Zellen konnte ein weiterer Anstieg der SDF-1-Expression mittels immunhistochemischer Untersuchungen an Hirnschnitten beobachtet werden. Diese Erhöhung der SDF-1-Immunreaktivität war gegenüber Tieren ohne Zell-Transplantation signifikant.

Der weitere Anstieg der SDF-1-Expression nach Transplantation humaner Zellen könnte unterschiedliche Ursachen haben. Da der in dieser Arbeit verwendete Antikörper nicht zwischen SDF-1 aus Mensch und Ratte unterscheidet, kann das detektierte SDF-1 sowohl

von den endogenen als auch den transplantierten Zellen sezerniert worden sein. Andere Studien haben gezeigt, dass Zellen aus Nabelschnurblut unter Zugabe neuraler Wachstumsfaktoren in Kultur in der Lage sind SDF-1 zu sezernieren (Neuhoff et al., 2007). Daher wäre es denkbar, dass die im Läsionsareal detektierbaren humanen Zellen das SDF-1-Protein selber ausgeschüttet haben. Des Weiteren wäre es aber auch vorstellbar, dass die umbilikalen Zellen die endogenen Zellen im läsierten Rattenhirn zur gesteigerten SDF-1-Produktion anregen. In weiterführenden Studien müsste durch spezifische Antikörper getestet werden, welcher Herkunft (Human oder Ratte) das nach Zell-Transplantation signifikant erhöhte SDF-1 ist.

Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Stärke der SDF-1-Expression und der Anzahl detektierbarer Zellen aus hNSB im Läsionsareal wurde durch einen rein visuellen Vergleich zum Zeitpunkt P21 vorgenommen. Anhand der mikroskopischen Durchsicht von Hirnschnitten, die immunhistochemisch mit Antikörpern gegen SDF-1 und HLA-DR behandelt waren, konnte keine Übereinstimmung zwischen der Zahl der Zellen und der Intensität des SDF-1-Immunsignals festgestellt werden. Möglicherweise ist die visuelle Durchsicht für diese Aussage nicht hinreichend geeignet. In weiterführenden Studien müsste eine exakte Quantifizierung der SDF-1-Expression in Kombination mit einer genauen Zählung der humanen Zellen durchgeführt werden.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, kann davon ausgegangen werden, dass das chemoattraktive Protein SDF-1 an der gerichteten Migration systemisch applizierter humaner Zellen aus Nabelschnurblut in das infarzierte Hirnareal beteiligt ist. Damit die humanen Zellen auf die Expression von SDF-1 reagieren können, müssten sie den entsprechenden Rezeptor für SDF-1 besitzen.

5.6 Der SDF-1-Rezeptor CXCR4

SDF-1 ist der Ligand für zwei Rezeptoren, CXCR4 (Ganju et al., 1998) und CXCR7 (Balabanian et al., 2005). Bei beiden Proteinen handelt es sich um Transmembranproteine aus der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Für CXCR4, auch CD184 genannt, ist SDF-1 der einzig bekannte Ligand. Dabei bindet CXCR4 alle bisher bekannten SDF-1-Isoformen (Ganju et al., 1998). Dagegen bindet CXCR7, früher als RDC1 bekannt, zusätzlich zu SDF-1 (CXCL12) auch noch ITAC (CXCL11) (Thelen and Thelen, 2008). Trotz der phylogenetischen Ähnlichkeit der beiden Rezeptoren scheint CXCR7 im

Gegensatz zu CXCR4 nicht an der Migration von Zellen beteiligt zu sein (Thelen and Thelen, 2008).

5.6.1 Humane Zellen exprimieren CXCR4

Da die SDF-1 / CXCR4 Interaktion für das „Homing“ diverser Zellen verantwortlich zu sein scheint, wurde in weiteren Analysen der vorliegenden Arbeit die Expression des SDF-1-Rezeptors CXCR4 auf den umbilikalen Zellen mittels Immunzytochemie untersucht.

Das Protein CXCR4 konnte auf frisch isolierten mononukleären Zellen aus Nabelschnurblut nachgewiesen werden, wobei nicht jede Zelle eine positive Immunreaktion für CXCR4 zeigte.

In anderen Studien wurde die Präsenz von CXCR4 auf umbilikalen Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurde gezeigt, dass innerhalb der mononukleären Fraktion 82,24% der Lymphozyten und 96,99% der Monozyten CXCR4 exprimieren (Rosenkranz et al., 2010).

Da umbilikale Zellen sowohl den SDF-1-spezifischen Rezeptor CXCR4 tragen, als auch in Regionen migrieren, in denen SDF-1 im läsierten Hirngewebe exprimiert wird, ist anzunehmen, dass die SDF-1 / CXCR4 Interaktion beim „Homing“ der humanen Zellen eine entscheidende Rolle spielt.

In anderen Studien wurde gezeigt, dass mit CXCR4 transfizierte mesenchymale Stammzellen aus Nabelschnurblut verstärktes Migrationsverhalten zu SDF-1-exprimierenden Glioma-Zellen aufweisen (Park et al., 2011). Des Weiteren konnten im Levine-Modell zum Zeitpunkt P9 CXCR4-positive humane Zellen im Bereich der Läsion nachgewiesen werden (Rosenkranz et al., 2010). In weiterführenden Analysen müsste der Nachweis von CXCR4 auf transplantierten umbilikalen Zellen im Gehirn auch zum Zeitpunkt P21 durchgeführt werden.

Die funktionelle Relevanz der SDF-1 / CXCR4 Interaktion konnte von Rosenkranz et al. (2010) gezeigt werden. Nach Applikation SDF-1 neutralisierender Antikörper waren weniger umbilikale Zellen im Schadensareal detektierbar. Eine vollständige Verhinderung der gerichteten Zell-Migration war allerdings nicht zu beobachten. Das ließe sich einerseits durch technische Fehlerquellen (z.B. Konzentration des Antikörpers, Zeitpunkt und Frequenz der Applikation) erklären, andererseits spricht einiges dafür, dass es möglicherweise auch zusätzliche chemotaktisch wirksame Faktoren gibt. Die

Chemoattraktion von Zellen kann von einer Vielzahl an Zytokinen vermittelt werden. So wurde auch für das Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) (Carr et al., 1994; Sotsios et al., 1999) und das Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α) (Schall et al., 1993; Taub et al., 1995) chemoattraktive Eigenschaften beschrieben. In einem experimentellen Schlaganfall-Modell wurden die Chemokine MCP-1 und MIP-1 α als bedeutende Mediatoren für die Migration transplanteder umbilikaler Zellen beschrieben (Jiang et al., 2008).

Für die Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC), eine Subpopulation der umbilikalen Zellen, konnte im Schlaganfall-Modell gezeigt werden, dass der Hepatocyte Growth Factor (HGF) an der gerichteten Migration dieser Zellen beteiligt ist (Trapp et al., 2008).

Die Analyse dieser möglicherweise ebenfalls chemoattraktiv wirkenden Faktoren auf das Migrationsverhalten umbilikaler Zellen in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens steht noch aus.

5.6.2 Die Bedeutung der SDF-1 / CXCR4 Interaktion

Die Stimulation von CXCR4 durch die Interaktion mit SDF-1 führt zur Aktivierung diverser Signalkaskaden. So konnte ein Einfluss dieser Interaktion auf Phosphatidylinositol-3-Kinase, sowie die Extracellular regulated-Kinase (ERK 1/2) gezeigt werden (Bajetto et al., 2001; Ganju et al., 1998; Sotsios et al., 1999). Diese Kinasen sind an der Kontrolle der Genexpression, als auch an der Zelldifferenzierung und der Proliferation von Zellen beteiligt.

Daher wäre es denkbar, dass durch die Chemoattraktion umbilikaler CXCR4-exprimierender Zellen durch SDF-1 positive Effekte auf das geschädigte Gewebe vermittelt werden.

Die in dieser Arbeit am Levine-Modell gezeigte erhöhte Expression von SDF-1 und das Vorhandensein des entsprechenden Rezeptors CXCR4 auf den umbilikalen Zellen deuten die Relevanz dieser möglichen Interaktion an. In Kombination mit der von Rosenkranz et al. (2010) gezeigten funktionellen Bedeutung des SDF-1 Proteins ist es sehr wahrscheinlich, dass die SDF-1 / CXCR4 Interaktion eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der therapeutischen Effekte der transplantierten umbilikalen Zellen spielt.

So wurde kürzlich in einer Studie gezeigt, dass die Transplantation umbilikaler Zellen nach hypoxisch-ischämischen Hirnschaden zur Verbesserung der Läsions-bedingten Einschränkungen neuraler Prozesse im somatosensorischen Kortex führt (Geissler et al.,

2011). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass SDF-1 sowohl für die Proliferation kortikaler Vorläuferzellen, als auch für die Differenzierung γ -Aminobutyrat abhängiger Neurone notwendig ist. Des Weiteren zeigten die Analysen, dass auch CXCR4 für die Zell-Proliferation und Differenzierung γ -Aminobutyrat abhängiger Neurone erforderlich ist (Pritchett et al., 2007). Diese Daten weisen auf eine mögliche Beteiligung der SDF-1 / CXCR4 Interaktion an der Regeneration der kortikalen Plastizität hin. Diese Interaktion wird durch die Transplantation umbilikaler Zellen in das Modell des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens erst möglich.

Die Daten dieser Arbeit geben neue Hinweise, wie Zellen aus Nabelschnurblut nach systemischer Applikation das Areal des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens erreichen können und stellen die Sekretion von SDF-1 im Läsionsareal und die Interaktion mit umbilikal exprimiertem CXCR4 als möglichen Beitrag zum „Homing“ der Zellen dar.

6 Literaturverzeichnis

1. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC (1997) The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 185:111-120
2. Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH (2008) Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29:325-342
3. Bai XF, Zhu J, Zhang GX, Kaponides G, Hojberg B, van der Meide PH, Link H (1997) IL-10 suppresses experimental autoimmune neuritis and down-regulates TH1-type immune responses. *Clin Immunol Immunopathol* 83:117-126
4. Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Piccioli P, Pirani P, Florio T, Schettini G (2001) Stromal cell-derived factor-1 α induces astrocyte proliferation through the activation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 pathway. *J Neurochem* 77:1226-1236
5. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F (2005) The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280:35760-35766
6. Balduini W, De Angelis V, Mazzoni E, Cimino M (2000) Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Res* 859:318-325
7. Berger R, Garnier Y (2000) Perinatal brain injury. *J Perinat Med* 28:261-285
8. Berger R, Garnier Y, Jensen A (2002) Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig* 9:319-328
9. Berger R, Garnier Y. (1998) Pathophysiologie perinataler Hirnschäden. Springer Verlag:661-679
10. Berger R, Garnier Y. (1999) *Brain Research Reviews*.107-134
11. Berger R, Middelanis J, Vaihinger HM, Mies G, Wilken B, Jensen A (2004) Creatine protects the immature brain from hypoxic-ischemic injury. *J Soc Gynecol Investig* 11:9-15
12. Billiards SS, Pierson CR, Haynes RL, Folkerth RD, Kinney HC (2006) Is the late preterm infant more vulnerable to gray matter injury than the term infant? *Clin Perinatol* 33:915-933
13. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA (1996) A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184:1101-1109

14. Bona E, Aden U, Gilland E, Fredholm BB, Hagberg H (1997) Neonatal cerebral hypoxia-ischemia: the effect of adenosine receptor antagonists. *Neuropharmacology* 36:1327-1338
15. Bona E, Andersson AL, Blomgren K, Gilland E, Puka-Sundvall M, Gustafson K, Hagberg H (1999) Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatr Res* 45:500-509
16. Bonner-Weir S, Weir GC (2005) New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol* 23:857-861
17. Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR (2004) Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* 35:2385-2389
18. Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI (1999) Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 5:298-302
19. Bunting MD, Comerford I, McColl SR (2011) Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunol Cell Biol* 89:185-196
20. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD (1987) Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:729-738
21. Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA (1994) Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3652-3656
22. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M (2001) Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 32:2682-2688
23. Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469
24. Christopherson KW, 2nd, Hango G, Broxmeyer HE (2002) Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells. *J Immunol* 169:7000-7008
25. Constantin G (2008) Chemokine signaling and integrin activation in lymphocyte migration into the inflamed brain. *J Neuroimmunol* 198:20-26
26. Dammann O, Leviton A (2000) Brain damage in preterm newborns: biological response modification as a strategy to reduce disabilities. *J Pediatr* 136:433-438

27. de Haas AH, van Weering HR, de Jong EK, Boddeke HW, Biber KP (2007) Neuronal chemokines: versatile messengers in central nervous system cell interaction. *Mol Neurobiol* 36:137-151
28. Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118:503-508
29. Dobbing J (1974) The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* 53:2-6
30. Du Y, Bales KR, Dodel RC, Hamilton-Byrd E, Horn JW, Czilli DL, Simmons LK, Ni B, Paul SM (1997) Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:11657-11662
31. Faris RA, Konkin T, Halpert G (2001) Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease. *Artif Organs* 25:513-521
32. Felderhoff-Mueser U, Ikonomidou C (2000) Mechanisms of neurodegeneration after paediatric brain injury. *Curr Opin Neurol* 13:141-145
33. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groopman JE (1998) The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem* 273:23169-23175
34. Gantert M, Been JV, Gavilanes AW, Garnier Y, Zimmermann LJ, Kramer BW (2010) Chorioamnionitis: a multiorgan disease of the fetus? *J Perinatol* 30 Suppl:21-30
35. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, Hudson JE, Chen N, Davis CD, Sanberg PR (2003) Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 12:255-270
36. Garnier Y, (2004) Prävention perinataler Hirnschäden. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 64:1235-1238
37. Geissler M, Dinse HR, Kumbruch S, Kreikemeier K, Meier C (2011) Human umbilical cord blood cells restore brain damage induced changes in rat somatosensory cortex. *PLoS One* (in press)
38. Gilland E, Puka-Sundvall M, Andine P, Bona E, Hagberg H (1994) Hypoxic-ischemic injury in the neonatal rat brain: effects of pre- and post-treatment with the glutamate release inhibitor BW1003C87. *Brain Res Dev Brain Res* 83:79-84
39. Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, Bosse F, Greiner-Petter R, Auer J, Muller HW (2000) Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci* 12:1857-1866

40. Gluckman PD, Gunn AJ, Wyatt JS (2006) Hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 354:1643-1645
41. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, Polin RA, Robertson CM, Thoresen M, Whitelaw A, Gunn AJ (2005) Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 365:663-670
42. Green EJ, Dietrich WD, van Dijk F, Busto R, Markgraf CG, McCabe PM, Ginsberg MD, Schneiderman N (1992) Protective effects of brain hypothermia on behavior and histopathology following global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 580:197-204
43. Guillemin GJ, Croitoru-Lamoury J, Dormont D, Armati PJ, Brew BJ (2003) Quinolinic acid upregulates chemokine production and chemokine receptor expression in astrocytes. *Glia* 41:371-381
44. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM (1998) Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 273:4282-4287
45. Hagberg H, Bona E, Gilland E, Puka-Sundvall M (1997) Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta Paediatr Suppl* 422:85-88
46. Hagberg H, Ichord R, Palmer C, Yager JY, Vannucci SJ (2002) Animal models of developmental brain injury: relevance to human disease. A summary of the panel discussion from the Third Hershey Conference on Developmental Cerebral Blood Flow and Metabolism. *Dev Neurosci* 24:364-366
47. Hanson DR, Gottesman, II (2005) Theories of schizophrenia: a genetic-inflammatory-vascular synthesis. *BMC Med Genet* 6:7
48. Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, Sata M, Ichiki T, Takeshita A, Egashira K (2004) Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation* 109:2454-2461
49. Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, Maeda M, Fagan SC, Carroll JE, Conway SJ (2004) SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:84-96
50. Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI, Der TC, Dikranian K, Sesma MA, Olney JW (1999) Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 408:461-476
51. Iuvone L, Geloso MC, Dell'Anna E (1996) Changes in open field behavior, spatial memory, and hippocampal parvalbumin immunoreactivity following enrichment in rats exposed to neonatal anoxia. *Exp Neurol* 139:25-33

52. Ivacko JA, Sun R, Silverstein FS (1996) Hypoxic-ischemic brain injury induces an acute microglial reaction in perinatal rats. *Pediatr Res* 39:39-47
53. Jacobs S, Hunt R, Tarnow-Mordi W, Inder T, Davis P (2007) Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003311
54. Jensen A, Berger R (1991) Fetal circulatory responses to oxygen lack. *J Dev Physiol* 16:181-207
55. Jensen A, Garnier Y, Berger R (1999) Dynamics of fetal circulatory responses to hypoxia and asphyxia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 84:155-172
56. Jensen A, Garnier Y, Middelani J, Berger R (2003) Perinatal brain damage--from pathophysiology to prevention. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110 Suppl 1:70-79
57. Jensen A, Hohmann M, Kunzel W (1987) Dynamic changes in organ blood flow and oxygen consumption during acute asphyxia in fetal sheep. *J Dev Physiol* 9:543-559
58. Jensen A, Roman C, Rudolph AM (1991) Effects of reducing uterine blood flow on fetal blood flow distribution and oxygen delivery. *J Dev Physiol* 15:309-323
59. Jiang L, Newman M, Saporta S, Chen N, Sanberg C, Sanberg PR, Willing AE (2008) MIP-1alpha and MCP-1 Induce Migration of Human Umbilical Cord Blood Cells in Models of Stroke. *Curr Neurovasc Res* 5:118-124
60. Johnston MV (2005) Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain Pathol* 15:234-240
61. Johnston MV, Coyle JT (1981) Development of central neurotransmitter systems. *Ciba Found Symp* 86:251-270
62. Klüver H, Barrera E (1953) A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 12:400-403
63. Kogler G, Somville T, Gobel U, Hakenberg P, Knipper A, Fischer J, Adams O, Krempe C, McKenzie C, Ruttgers H, Meier W, Bellmann O, Streng H, Ring A, Rosseck U, Rocha V, Wernet P (1999) Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the EUROCORD/NETCORD Bank Germany. *Klin Padiatr* 211:224-232
64. Kramer BW, Ladenburger A, Kunzmann S, Speer CP, Been JV, van Iwaarden JF, Zimmermann LJ, Gantert M, Garnier Y (2009) Intravenous lipopolysaccharide-induced pulmonary maturation and structural changes in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 200:195 e191-110
65. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisakk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E

- (2006) Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 129:200-211
66. Ladeby R, Wirenfeltdt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B (2005) Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 48:196-206
 67. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
 68. Laing KJ, Secombes CJ (2004) Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28:443-460
 69. Levine S (1960) Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* 36:1-17
 70. Lewis JP, Trobaugh FE, Jr. (1964) Haematopoietic Stem Cells. *Nature* 204:589-590
 71. Liao SL, Chen WY, Raung SL, Kuo JS, Chen CJ (2001) Association of immune responses and ischemic brain infarction in rat. *Neuroreport* 12:1943-1947
 72. Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, Li Y, Wang L, Sanchez-Ramos J, Chopp M (2002) Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant* 11:275-281
 73. Maksym RB, Tarnowski M, Grymula K, Tarnowska J, Wysoczynski M, Liu R, Czerny B, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ (2009) The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol* 625:31-40
 74. Meier C, Middelanis J, Wasielewski B, Neuhoff S, Roth-Haerer A, Gantert M, Dinse HR, Dermietzel R, Jensen A (2006) Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res* 59:244-249
 75. Migliaccio G, Migliaccio AR, Petti S, Mavilio F, Russo G, Lazzaro D, Testa U, Marinucci M, Peschle C (1986) Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac----liver transition. *J Clin Invest* 78:51-60
 76. Miller JT, Bartley JH, Wimborne HJ, Walker AL, Hess DC, Hill WD, Carroll JE (2005) The neuroblast and angioblast chemotactic factor SDF-1 (CXCL12) expression is briefly up regulated by reactive astrocytes in brain following neonatal hypoxic-ischemic injury. *BMC Neurosci* 6:63
 77. Mirshahi F, Pourtau J, Li H, Muraine M, Trochon V, Legrand E, Vannier J, Soria J, Vasse M, Soria C (2000) SDF-1 activity on microvascular endothelial cells: consequences on angiogenesis in in vitro and in vivo models. *Thromb Res* 99:587-594
 78. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A

- (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-56
79. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S (2004) Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2670-2676
 80. Narayanan R, Dougherty KJ, Johnston D (2010) Calcium store depletion induces persistent perisomatic increases in the functional density of h channels in hippocampal pyramidal neurons. *Neuron* 68:921-935
 81. Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A (1993) Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol* 40:163-221
 82. Neuhoff S, Moers J, Rieks M, Grunwald T, Jensen A, Dermietzel R, Meier C (2007) Proliferation, differentiation, and cytokine secretion of human umbilical cord blood-derived mononuclear cells in vitro. *Exp Hematol* 35:1119-1131
 83. Newman MB, Willing AE, Manresa JJ, Davis-Sanberg C, Sanberg PR (2005) Stroke-induced migration of human umbilical cord blood cells: time course and cytokines. *Stem Cells Dev* 14:576-586
 84. Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ (2001) Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiol Dis* 8:207-219
 85. Ohno N, Kajiume T, Sera Y, Sato T, Kobayashi M (2008) Short-Term Culture of Umbilical Cord Blood-Derived CD34 Cells Enhances Engraftment into NOD/SCID Mice Through Increased CXCR4 Expression. *Stem Cells Dev* 8:1221-6
 86. Ohtani Y, Minami M, Kawaguchi N, Nishiyori A, Yamamoto J, Takami S, Satoh M (1998) Expression of stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 chemokine receptor mRNAs in cultured rat glial and neuronal cells. *Neurosci Lett* 249:163-166
 87. Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Forster R, Lipp M, Littman DR, Cyster JG (2002) Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* 196:65-75
 88. Palmer C (1995) Hypoxic-ischemic encephalopathy. Therapeutic approaches against microvascular injury, and role of neutrophils, PAF, and free radicals. *Clin Perinatol* 22:481-517
 89. Park SA, Ryu CH, Kim SM, Lim JY, Park SI, Jeong CH, Jun JA, Oh JH, Park SH, Oh W, Jeun SS (2011) CXCR4-transfected human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells exhibit enhanced migratory capacity toward gliomas. *Int J Oncol* 38:97-103

90. Pimentel-Coelho PM, Magalhaes ES, Lopes LM, Deazevedo LC, Santiago MF, Mendez-Otero R (2010) Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells Dev* 19:351-358
91. Pritchett J, Wright C, Zeef L, Nadarajah B (2007) Stromal derived factor-1 exerts differential regulation on distinct cortical cell populations in vitro. *BMC Dev Biol* 7:31
92. Rath W, Gembruch U, Schmidt S, (Hgs) Geburtshilfe und Perinatalmedizin Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (2010) Intrapartale Hypoxie von Schmidt S.:568-569
93. Rath W, Gembruch U, Schmidt S, (Hgs) Geburtshilfe und Perinatalmedizin Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (2010) Das Frühgeborene von Speer C.P.:702-705
94. Rice JE, 3rd, Vannucci RC, Brierley JB (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 9:131-141
95. Rosenkranz K, Kumbruch S, Lebermann K, Marschner K, Jensen A, Dermietzel R, Meier C (2010) The chemokine SDF-1 / CXCL12 contributes to the 'homing' of umbilical cord blood cells to a hypoxic-ischemic lesion in the rat brain. *J Neurosci Res* 88:1223-1233
96. Rothwell N, Allan S, Toulmond S (1997) The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J Clin Invest* 100:2648-2652
97. Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR (2003) Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematother Stem Cell Res* 12:271-278
98. Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV (1993) Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 177:1821-1826
99. Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST (2000) CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39:777-787
100. Schulz JB, Bremen D, Reed JC, Lommatzsch J, Takayama S, Wullner U, Loschmann PA, Klockgether T, Weller M (1997) Cooperative interception of neuronal apoptosis by BCL-2 and BAG-1 expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species. *J Neurochem* 69:2075-2086

101. Schurr A (2004) Neuroprotection against ischemic/hypoxic brain damage: blockers of ionotropic glutamate receptor and voltage sensitive calcium channels. *Curr Drug Targets* 5:603-618
102. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T (1995) Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28:495-500
103. Sotsios Y, Whittaker GC, Westwick J, Ward SG (1999) The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol* 163:5954-5963
104. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57:563-581
105. Stumm RK, Rummel J, Junker V, Culmsee C, Pfeiffer M, Kriegelstein J, Hollt V, Schulz S (2002) A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J Neurosci* 22:5865-5878
106. Tabatabai G, Bahr O, Mohle R, Eyupoglu IY, Boehmler AM, Wischhusen J, Rieger J, Blumcke I, Weller M, Wick W (2005) Lessons from the bone marrow: how malignant glioma cells attract adult haematopoietic progenitor cells. *Brain* 128:2200-2211
107. Taub DD, Proost P, Murphy WJ, Anver M, Longo DL, van Damme J, Oppenheim JJ (1995) Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 95:1370-1376
108. Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H (1999) Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 9:93-117
109. Tham TN, Lazarini F, Franceschini IA, Lachapelle F, Amara A, Dubois-Dalcq M (2001) Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 13:845-856
110. Thelen M, Thelen S (2008) CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* 198:9-13
111. Thomas ED, Ashley CA, Lochte HL, Jr., Jaretzki A, 3rd, Sahler OD, Ferrebee JW (1959) Homografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation. *Blood* 14:720-736
112. Trapp T, Kogler G, El-Khattouti A, Sorg RV, Besselmann M, Focking M, Buhrle CP, Trompeter I, Fischer JC, Wernet P (2008) Hepatocyte growth factor/c-MET axis-mediated tropism of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for neuronal injury. *J Biol Chem* 283:32244-32253

113. Vannucci SJ, Hagberg H (2004) Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* 207:3149-3154
114. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM (1994) Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9857-9860
115. Vescovi AL, Galli R, Gritti A (2001) The neural stem cells and their transdifferentiation capacity. *Biomed Pharmacother* 55:201-205
116. Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A (2000) Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 31:2325-2329
117. Volpe JJ. (2008). *Neurology of the newborn*. Philadelphia: Elsevier Health Sciences. 1-1042 p.
118. Widmann R, Miyazawa T, Hossmann KA (1993) Protective effect of hypothermia on hippocampal injury after 30 minutes of forebrain ischemia in rats is mediated by postischemic recovery of protein synthesis. *J Neurochem* 61:200-209
119. Williams CE, Gunn AJ, Mallard C, Gluckman PD (1992) Outcome after ischemia in the developing sheep brain: an electroencephalographic and histological study. *Ann Neurol* 31:14-21
120. Wilson EH, Weninger W, Hunter CA (2010) Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J Clin Invest* 120:1368-1379
121. Yasuhara T, Hara K, Maki M, Xu L, Yu G, Ali MM, Masuda T, Yu SJ, Bae EK, Hayashi T, Matsukawa N, Kaneko Y, Kuzmin-Nichols N, Ellovitch S, Cruz EL, Klasko SK, Sanberg CD, Sanberg PR, Borlongan CV (2010) Mannitol facilitates neurotrophic factor upregulation and behavioral recovery in neonatal hypoxic-ischemic rats with human umbilical cord blood grafts. *J Cell Mol Med* 14:914-921
122. Yenari MA, Hemmen TM (2010) Therapeutic hypothermia for brain ischemia: where have we come and where do we go? *Stroke* 41:S72-74
123. Zhang G, Nakamura Y, Wang X, Hu Q, Suggs LJ, Zhang J (2007) Controlled release of stromal cell-derived factor-1 alpha in situ increases c-kit⁺ cell homing to the infarcted heart. *Tissue Eng* 13:2063-2071
124. Zhu C, Qiu L, Wang X, Hallin U, Cande C, Kroemer G, Hagberg H, Blomgren K (2003) Involvement of apoptosis-inducing factor in neuronal death after hypoxia-ischemia in the neonatal rat brain. *J Neurochem* 86:306-317
125. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC (2010) Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7:22-30

7 Eigene Veröffentlichungen

The chemokine SDF-1 / CXCL12 contributes to the ‘homing’ of umbilical cord blood cells to a hypoxic-ischemic lesion in the rat brain

Rosenkranz, K, Kumbruch, S, **Lebermann, K**, Marschner, K, Jensen, A, Dermietzel, R, and Meier, C,

J Neurosci Res 2010; 88(6):1223-1233.

7.1 Poster und Kongressbeiträge

Umbilical cord blood in the therapy of hypoxic-ischemic brain injury

Katja Rosenkranz, Sandra Kumbruch, **Katrin Lebermann**, Caroline May, Katrin Marschner, Arne Jensen, Rolf Dermietzel, Katrin Marcus, and Carola Meier

Jahrestagung Medizinisches Proteom-Center, Rauschholzhausen, Dezember 2009

The chemokine SDF-1 mediates ‘homing’ of human umbilical cord blood cells to hypoxic-ischemic brain lesions

Katja Rosenkranz, Sandra Kumbruch, **Katrin Lebermann**, Katrin Marschner, Arne Jensen, Rolf Dermietzel, and Carola Meier

5th International Symposium on Neuroprotection and Neurorepair, Magdeburg, Germany, Mai 2008

Das Chemokin SDF-1 vermittelt die gerichtete Migration transplantierte umbilikaler Zellen zum experimentellen perinatalen Hirnschaden

Katja Rosenkranz, Sandra Kumbruch, **Katrin Lebermann**, Katrin Marschner, Arne Jensen, Rolf Dermietzel, and Carola Meier

207. Konferenz der NWGGG (Niederrheinisch-Westfälische Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe), Bochum, Deutschland, April 2008

The chemokine stromal derived factor-1 (SDF-1) constitutes a putative ‘homing’ factor for human umbilical cord blood cells under hypoxic-ischemic conditions in rat brains

Katja Rosenkranz, Sandra Kumbruch, **Katrin Lebermann**, Katrin Marschner, Arne Jensen, Rolf Dermietzel, and Carola Meier

55th Annual Scientific Meeting of the Society for Gynecologic Investigation, San Diego, USA, März 2008

The chemokine stromal derived factor-1 (SDF-1) induces ‘homing’ of human umbilical cord blood cells to a hypoxic-ischemic lesion in the rat brain

Katja Rosenkranz, Sandra Kumbruch, **Katrin Lebermann**, Katrin Marschner, Arne Jensen, Rolf Dermietzel, and Carola Meier

4th International Meeting of the Stem Cell Network North Rhine-Westphalia, Duesseldorf, Germany, Oktober 2007

SDF-1alpha: a putative 'homing' factor for hUCB cells

Katja Rosenkranz, Sandra Kumbruch, **Katrin Lebermann**, Katrin Marschner, Arne Jensen, Rolf Dermietzel, and Carola Meier

GBM Fall Meeting - Molecular Life Sciences, Hamburg, Germany, September 2007

The potential role of human umbilical cord blood cells in the therapy of perinatal brain damage

B. Wasielewski, A. Roth-Härer, J. Middelanis, S. Neuhoff, **K. Lebermann**, H.R. Dinse, R. Dermietzel, A. Jensen, C. Meier

Interne Klausurtagung Herne, Kompetenznetzwerk Stammzellforschung NRW, Germany, November 2005

8 Lebenslauf

Daten zur Person:

Katrin Lebermann, geb. Wollschläger
geboren am 09.10.1972
in Schwäbisch Hall

Berufserfahrung:

Seit 10 / 2004

Selbstständige Zahnärztin in einer Praxisgemeinschaft
in Bochum

01 / 2001- 09 / 2004

Arbeit als Assistenz Zahnärztin in einer
allgemeinzahnärztlichen Praxis
Behandlungsschwerpunkte: konservierende und
Kinderzahnheilkunde

Studium:

1999

Approbation

1997

Auslandsfamulatur an der Universitätsklinik Concepcion/
Chile und an der Universitätsklinik Buenos Aires/Argentinien

1995

Physikum

1993

Beginn an der Zahnmedizinischen Klinik der
Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg

Schulbildung:

1979 – 1992

Besuch der Rudolf-Steiner-Schule in Witten

Abschluss

Abitur

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Carola Meier, die es mir ermöglicht hat, als externe Mitarbeiterin in der neuroanatomischen Abteilung meine Dissertation zu erarbeiten. Ihre Geduld und vielgeprüfte Gelassenheit haben mich in all den Jahren nicht verzweifeln lassen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Faßbender danke ich für die Übernahme der Zweitbetreuung.

Herrn Prof. Dr. Rolf Dermietzel sei an dieser Stelle auch gedankt für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut in Bochum.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Katja Rosenkranz ohne deren Fachkompetenz und geduldiges Korrekturlesen das schriftliche Ergebnis meiner Experimente bestimmt noch nicht vorlägen. Danke für Zuckerbrot und Peitsche!

Auch allen anderen „Kolleginnen“ der Arbeitsgruppe sei hier herzlich gedankt, die mir immer das Gefühl gegeben haben, dazuzugehören und im Labor willkommen zu sein.

Dabei danke ich Frau Janet Moers besonders, die mir alle technischen Apparaturen gezeigt und mich besonnen in die verschiedenen Methoden eingeführt hat.

Vielen Dank auch an das Operationsteam Frau Dr. Katja Rosenkranz und Frau Dr. Sandra Kumbruch. Ohne sie beide hätte ich gar nicht erst mit der Arbeit beginnen können!

Ein lieber Dank geht auch an Herrn Dr. Markus Gantert für die gute Idee, mich mit Frau Prof. Dr. Carola Meier bekannt zu machen.

Ein ganz liebes Dankeschön geht an meine Eltern, die mir nicht nur an vielen Tagen den Rücken gestärkt, sondern auch oft mit herrlichen Gerichten die Stimmung versüßt haben.

Ein dickes Dankeschön gilt auch meinen Schwestern Dr. Daniela Jung und Sabine Wollschläger, die stets humorig und positiv auf mich eingeredet haben, aber auch beruhigend den Doktorengrad relativiert haben.

Herbert Remmert, sowie Evelyn und Jörg Remmert danke ich, weil sie sich mit Fragen bezüglich des Arbeitsfortschrittes dieser Arbeit extrem zurückgehalten und nur ab und zu nachgefragt haben, ob der Wunsch zur Erlangung des Doktorgrades schon Früchte getragen habe.

Von ganzem Herzen gilt mein Dank meinem Freundeskreis um Linda, Birgitta und Ruth und den dazugehörigen Mannsbildern: Keinem von ihnen ist je der bisher fehlende Dokortitel aufgefallen (zumindest wurde dies bisher nicht moniert). Danke auch Justin für die Hilfe als Nativspeaker für die kompetente Fachhilfe.

Mein größtes Dankeschön gilt allerdings den besten Kindern der Welt: Marlene, Paul und Linda! Ihr wart so schön direkt und habt so manches Mal Eurem Unmut über meine Nichtanwesenheit verbal Ausdruck verliehen; viel öfter aber wart Ihr wunderbar gleichmütig und habt mich mit Euren lustigen Sprüchen aufgemuntert.

Liebster Malte, Dir gilt aller Dank der Welt! Ohne Deine liebevolle Art, Dich selbst und Deine Bedürfnisse zurückzustellen und ohne Deine übergroße Ruhe hätte ich den für mich fast nicht zu stemmenden Spagat zwischen Familie, Arbeit und dem tiefen Verlangen nach den Doktorweihen sicher nicht geschafft. Du warst und bist die beste Stütze, die ich mir vorstellen kann ...vielen Dank!