

Aus der Neurologischen Klinik
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

**Untersuchungen zu Schwann-Zell-Transplantationen
zur Unterstützung axonaler Regeneration nach
traumatischen peripheren Nervenläsionen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Laura Christine Holtmann

2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: PD Dr. med. Helmar Lehmann

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Tim Lögters

Zusammenfassung

Das periphere Nervensystem ist im Gegensatz zum zentralen Nervensystem prinzipiell in der Lage, nach einer Läsion vollständig zu regenerieren. Klinisch kommt es jedoch nach einer peripheren Nervenschädigung häufig zu einer inkompletten Regeneration und zu bleibenden funktionellen Defiziten.

In verschiedenen Tiermodellen wird nach Therapieansätzen gesucht, welche die funktionellen Leistungen nach der abgeschlossenen Heilung verbessern sollen. Unklar ist bisher, ob die Transplantation von Schwann-Zellen in Segmente peripherer Nerven die Regeneration von Axonen nach einer chronischen Nervenschädigung verbessern könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Tiermodell einer chronischen Denervierung verwendet. Hierzu wurde in Ratten zunächst der *N. tibialis* durchtrennt. Nach drei Monaten wurde der *N. fibularis* durchtrennt und dessen frischer proximaler Anteil an den distalen, seit drei Monaten diskonnektierten *Tibialisstumpf* genäht. Simultan wurden intraoperativ Schwann-Zellen transplantiert. Anschließend wurde der Verlauf der axonalen Regeneration elektrophysiologisch durch wöchentliche elektroneurographische Messungen dokumentiert. Durch Immunhistochemie wurde die Verweildauer der transplantierten Schwann-Zellen am Transplantationsort untersucht.

Es zeigte sich, dass nach Transplantation von Schwann-Zellen eine deutliche Verbesserung der axonalen Regeneration im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden konnte. Wurden im Vorfeld entnommene autologe Schwann-Zellen transplantiert, konnten diese Effekte weiter verstärkt werden. Die implantierten Schwann-Zellen ließen sich jedoch nur über einen kurzen Zeitraum im peripheren Nerven nachweisen.

Obwohl die implantierten Schwann-Zellen offenbar nur kurzzeitig im peripheren Nerven überleben, führte die Transplantation zu einer deutlich verbesserten axonalen Regeneration. Dies könnte damit erklärt werden, dass die transplantierten Zellen in diesem kurzen Zeitraum pro-regenerative Faktoren ausschütten, die das Auswachsen von Axonen, die sich zu diesem Zeitpunkt in enger räumlicher Nähe zu den Transplantaten befinden, verbessern. Dafür spricht auch, dass Schwann-Zellen, die in weiter distal gelegene Nervensegmente transplantiert wurden, einen deutlich geringeren pro-regenerativen Effekt aufwiesen. Der molekularbiologische Mechanismus, der sich hinter dieser Beobachtung verbirgt, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend klären. In Folgeexperimenten wäre es daher interessant, näher zu analysieren, was den Verbleib der Schwann-Zellen limitiert und welche Faktoren von den transplantierten Zellen exprimiert werden, um die Regeneration von Axonen zu unterstützen.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BSA	bovine serum albumine
ca.	circa
cDNA	complementary/copy DNA
CIDP	chronische inflammatorische Polyradikuloneuropathie
cm	Zentimeter
CMAP	compound muscle action potential
CNTF	ciliary neurotrophic factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dASCs	differentiated adipose-derived stem cells
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser, mit DEPC behandelt
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphate
DRG	dorsal root ganglion
dsDNA	double-stranded DNA
dTTP	DesoxyThymidin-Triphosphat
dUTP	DesoxyUracil-Triphosphat
ECM	extracellular matrix
ENG	Elektroneurogramm
engl.	englisch
GAP-43	growth associated protein-43
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFP	green fluorescent protein
HGF	hepatocyte growth factor
HHU	Heinrich-Heine-Universität
IGF-1	Insulin-like growth factor
LIK	leukaemia inhibitory factor
M.	Musculus
mA	Milliampere
MAG	myelin-associated glycoprotein
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
min	Minute
ml	Milliliter
mm/h	Millimeter pro Stunde
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSAP	Muskelsummenaktionspotential
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
N-CAM	neural cell adhesion molecule
N.	Nervus

n. s.	nicht signifikant
NAD⁺	Nicotinsäureamid-Thymidin-Dinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NGF	nerve growth factor
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NT-3	Neurotrophin 3
OECs	olfactory ensheathing cells
p75NTR	p75 neurotrophin receptor
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Performaldehyd
PNS	peripheres Nervensystem
Proc.	Processus
PSA	polysialic acid
qPCR	quantitative Realtime-Polymeraseketten-Reaktion
RAG	regeneration associated genes
RNA	ribonucleic acid
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
SEM	Standard error of the mean
SKP-SCs	skin-derived precursor cells derived stem cells
sog.	sogenannt
ssDNA	single-stranded DNA
STABW	Standardabweichung
SZ	Schwann-Zellen
TGF-β	transforming growth factor beta
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
TrK	tropomyosin-related kinase
TVA	Tierversuchsanlage
u. a.	unter anderem
UK	United Kingdom
USA	United States of America
VEGF	vascular endothelial growth factor
ZNS	zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Darstellungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das periphere Nervensystem	1
1.1.1 Nervenzellen	1
1.1.2 Schwann-Zellen	2
1.2 traumatische Läsionen peripherer Nerven	3
1.2.1 Klinische Klassifikation traumatischer peripherer Nervenverletzungen und chirurgische Versorgung	4
1.2.2 Elektrophysiologische Veränderungen nach einer peripheren Nervenverletzung	6
1.3 Pathophysiologie peripherer Nervenläsionen	6
1.3.1 Veränderungen am distalen Nervensegment (Wallersche Degeneration)	6
1.3.2 Die Rolle der Schwann-Zellen im Rahmen der Wallerschen Degeneration	8
1.3.3 Neurotrophe Faktoren	10
1.3.4 Reaktionen der neuronalen Umgebung	11
1.3.5 Veränderungen am proximalen Nervensegment	12
1.4 Faktoren einer unzureichenden Regeneration	13
Ziele der Arbeit	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialliste	17
2.2 Versuchstiere	19
2.2.1 Genehmigung des Versuches nach dem Tierschutzgesetz	19
2.2.2 Tierstamm und Tierhaltung	19
2.3 Tiermodell der axonalen Regeneration nach chronischer Denervierung	19
2.3.1 perioperatives <i>Setting</i>	19
2.3.2 Durchtrennung des <i>N. tibialis</i>	20
2.3.3 Konjunktion des <i>N. tibialis</i> mit <i>N. fibularis</i>	22
2.3.4 Schwann-Zellen	23
2.3.5 Injektion	24
2.4 Versuchsaufbau	25
2.5 Elektroneurographie	27
2.6 Organasservierung	28
2.6.1 Asservierung von Nerven- und Muskelgewebe zur histologischen Analyse	28
2.6.2 Asservierung von Nervengewebe zur molekulargenetischen Analyse	28
2.6.3 Asservierung von Spinalganglien zur molekulargenetischen Analyse	28
2.7 Probenaufbereitung	29
2.7.1 Histologie und Immunhistochemie	29
2.7.2 Färbeprotokoll	29
2.7.3 Mikroskopische Auswertung	30
2.8 Semidünnschnitte	31
2.8.1 Aufbereitung der Proben	31
2.8.2 Auswertung der Semidünnschnitte	31

2.9 Molekulargenetische Analyse	31
2.9.1 mRNA-Extraktion	31
2.9.2 cDNA-Synthese	34
2.9.3 <i>Quantitative Realtime-PCR</i>	35
2.9.4 <i>Primer</i>	36
2.9.5 Statistische Auswertung der qPCR	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Transplantierte Schwann-Zellen besitzen einen positiven Einfluss auf elektrophysiologische Parameter axonaler Regeneration	38
3.2 Die Transplantation von autologen Schwann-Zellen verstärkt den positiven Einfluss auf die Elektrophysiologie	39
3.3 Die quantitative Analyse der Axone korreliert mit den Ergebnissen der Elektrophysiologie	42
3.3.1 Nach einer proximalen Transplantation von postnatalen P(0)-Schwann-Zellen finden sich statistisch signifikant mehr myelinisierte Axone als in der Kontrollgruppe	42
3.3.2 Nach einer Transplantation von autologen Schwann-Zellen finden sich statistisch signifikant mehr myelinisierte Axone als in der Kontrollgruppe	44
3.4 Die Viabilität der injizierten Schwann-Zellen im Modell des chronisch denervierten Nerven ist limitiert	46
3.5 Expression von Neurotrophinen nach Schwann-Zell-Transplantation	48
3.5.1 BDNF-Expression	48
3.5.2 NGF-Expression	49
3.5.3 GDNF-Expression	50
4 Diskussion	51
4.1 Modell der chronischen Denervierung	51
4.2 Elektrophysiologische Parameter und Semidünnschnitte als Maßstäbe für Regeneration	55
4.3 Schwann-Zellen	58
4.4 Verweildauer der Zellen	59
4.5 <i>Boost</i> durch Schwann-Zellen	59
4.6 Autologe und allogene Zellreihen im Vergleich	64
Schlussfolgerungen	66
Literaturverzeichnis	68
Danksagung	78

Darstellungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klassifikation peripherer Nervenläsionen	4
Tabelle 2:	Antikörper	17
Tabelle 3:	Liste der verwendeten Geräte	17
Tabelle 4:	Verwendete Chemikalien	18
Tabelle 5:	Diverses	18
Tabelle 6:	Übersicht erste Versuchsreihe	25
Tabelle 7:	Übersicht zweite Versuchsreihe	26
Tabelle 8:	Übersicht dritte Versuchsreihe	26
Tabelle 9:	Liste der verwendeten Primärantikörper	29
Tabelle 10:	Liste der verwendeten Sekundärantikörper	30
Tabelle 11:	MasterMix-Ansatz für die reverse Transkription	34
Tabelle 12:	Verzeichnis der verwendeten <i>Primer</i> für die Analyse der nervalen Genexpression via qPCR	36
Tabelle 13:	Amplifikations-Standardprogramm qPCR	37

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Wallersche Degeneration und axonale Regeneration nach einer peripheren Nervenverletzung	8
Abbildung 2:	Übersicht des <i>N. ischiadicus</i> und seiner Äste am Hinterlauf	21
Abbildung 3:	Durchtrennung <i>N. tibialis</i>	21
Abbildung 4:	Situs postoperativ	21
Abbildung 5:	Durchtrennung <i>N. fibularis</i>	22
Abbildung 6:	Konnektion	22
Abbildung 7:	Orte der Schwann-Zell-Transplantationen	24
Abbildung 8:	Übersicht des Versuchsaufbaus	25
Abbildung 9:	Formel zur Berechnung der Kontamination mit Proteinen	33
Abbildung 10:	Temperaturprofil zur Herstellung der cDNA	34
Abbildung 11:	Mittelwerte der distalen MSAPs des <i>N. tibialis</i> über einen Zeitraum von acht Wochen nach der Nervenadaptation	38
Abbildung 12:	Mittelwert des distalen MSAP des <i>N. tibialis</i> im Zeitraum von acht Wochen nach Nervenadaptation und autologer Schwann-Zell-Transplantation	39
Abbildung 13:	MSAPs des <i>N. tibialis</i> vor der Diskonnektion	40
Abbildung 14:	MSAPs acht Wochen nach der Rekonnektion	40
Abbildung 15:	Vergleich der MSAPs der Kollektive "proximal/autolog" mit der Kontrolle acht Wochen nach der Rekonnektion	41
Abbildung 16:	Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Semidünnschnitte des <i>N. tibialis</i>	42
Abbildung 17:	Anzahl der myelinisierten Axone im Vergleich	43
Abbildung 18:	Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Semidünnschnitte des <i>N. tibialis</i>	44
Abbildung 19:	Anzahl der myelinisierten Axone nach der Kreuznaht	45
Abbildung 20:	In-vitro Aufnahmen der Schwann-Zellen	46
Abbildung 21:	Immunhistochemische Färbungen der Schwann-Zellen	47
Abbildung 22:	Mittelwerte der BDNF-Expressionsmenge nach Schwann-Zell-Transplantation	48
Abbildung 23:	Mittelwerte der NGF-Expressionsmenge nach Schwann-Zell-Transplantation	49
Abbildung 24:	Mittelwerte der GDNF-Expressionsmenge nach Schwann-Zell-Transplantation	50

1. Einleitung

Das periphere Nervensystem

Das Nervensystem besteht in der Hauptsache aus zwei Zellarten: Nervenzellen und Neuroglia. Während die Nervenzellen die funktionelle Einheit bilden, indem sie über elektrische Signale Informationen übermitteln, sind Gliazellen u. a. für die Ernährung der Axone, Immunantworten sowie die Einbettung der Axone in das Gewebe zuständig. Spezialisierte Gliazellen sind darüber hinaus für die Markscheidenbildung der Axone verantwortlich.

Das periphere Nervensystem (PNS) umschließt alle Teile des Nervensystems außerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) inklusive der Hirnnerven. Seine Aufgabe besteht darin, Rezeptororgane (Sensoren) und Ausführungsorgane (Effektoren) der Peripherie mit dem ZNS zu verbinden.

Nervenzellen

Nervenzellen besitzen einen charakteristischen Aufbau aus Perikaryon, Dendriten und Axon. Im Perikaryon befinden sich der meistens zentral gelegene Zellkern und die Zellorganellen. Es besitzt überwiegend trophische Funktionen. Dendriten sind Zellfortsätze, die der afferenten Erregungsleitung dienen. Sie nehmen Signale auf und leiten sie an Perikaryon und Axon weiter. In der Regel besitzt eine Nervenzelle mehrere Dendriten, es findet sich jedoch nur ein einzelnes Axon. Das Axon dient der efferenten Erregungsleitung zu anderen Neuronen oder einem Endorgan (z. B. Muskel). Es bildet mit seinem kolbenförmigen Ende den präsynaptischen Anteil einer Synapse, über die es mit nachfolgenden Zellen kommunizieren kann.

Jedes Axon wird von kollagenem Bindegewebe umgeben, dem Endoneurium. Mehrere Axone werden zu Faszikeln zusammengefasst. Diese werden vom Perineurium begrenzt. Der Bereich zwischen Perineurium und Endoneurium wird als Endoneuralraum bezeichnet. Das Perineurium fungiert durch zahlreiche *tight junctions* als Diffusionsbarriere zwischen endoneuralem Raum und Interstitium. Als äußerste Bindegewebshülle folgt das Epineurium. Es fasst die Faszikel zu einem Nerv zusammen und führt größere Blutgefäße, über welche die Ernährung des Nervs gewährleistet werden kann (Stewart 2003).

Schwann-Zellen

Schwann-Zellen sind spezialisierte Zellen der Neuroglia. Ihr Vorkommen ist auf das periphere Nervensystem begrenzt; als Pendant im zentralen Nervensystem finden sich Oligodendrozyten. Beide Zelltypen sind neuroektodermaler Herkunft, besitzen jedoch jeweils hochspezifische Eigenschaften. Schwann-Zellen bilden mit den Axonen peripherer Nerven eine funktionelle Einheit, die im ständigen Signalaustausch steht. Sie halten ein Milieu aufrecht, das die Voraussetzung für die funktionierende Signalübertragung im Nervensystem bildet (Nave 2008).

Unreife Schwann-Zellen differenzieren nach der Geburt in myelinisierende oder nicht-myelinisierende Schwann-Zellen (Woodhoo 2008). Sie umgeben die Axone des peripheren Nervensystems, die abhängig von der Anzahl von Myelinlamellen als markhaltiges (myelinisiertes) oder markloses Axon bezeichnet werden.

Man unterscheidet vier verschiedene Gruppen von Schwann-Zellen: myelinisierende, nicht-myelinisierende, terminale Schwann-Zellen und Satellitenzellen.

Terminale Schwann-Zellen sind die gliale Komponente von Synapsen und damit funktioneller Bestandteil einer synaptischen Einheit. Sie besitzen Einfluss auf die Entwicklung von Synapsen und deren Wiederausbildung nach neuronaler Regeneration. Des Weiteren sind sie in der Lage, synaptische Aktivität zu regulieren, und sind so für die uneingeschränkte Funktion einer Synapse essentiell (Sugiura 2011). Satellitenzellen umhüllen sensorische Neurone. Sie befinden sich an den Perikaryen, und man vermutet einen Anteil an der Signalerzeugung und -übermittlung in den sensorischen Ganglien (Hanani 2005). Nicht-myelinisierende Schwann-Zellen bilden eine Hülle um kleinkalibrige Axone oder sog. C-Fasern. Diese werden vor allem von sensorischen oder postganglionären sympathischen Neuronen gebildet. Jede nicht-myelinisierende Schwann-Zelle umhüllt bis zu zehn Axone zu sog. Remak-Bündeln, hält die einzelnen Axone jedoch durch dünne Zellmembran-Ausläufer ihres Zellkörpers voneinander getrennt. Eine Störung der Kommunikation zwischen nicht-myelinisierender Schwann-Zelle und unmyelinisiertem Axon führt zu sensiblen Empfindungsstörungen und langfristig zu einem Untergang von Axonen. Daher wird den Schwann-Zellen eine essentielle Stellung für die trophische Versorgung der marklosen Axone zugeschrieben. Sie werden auch mit der Entstehung von peripheren Neuropathien in Verbindung gebracht (Bunge 1994; Chen 2003; Nave 2008).

Myelinisierende Schwann-Zellen legen sich im Rahmen der Myelogenese zunächst dem Axon an. Anschließend verlängert sich die Oberflächenmembran der Schwann-Zelle, bis

sie das Axon von beiden Seiten umhüllt. Die Oberflächenmembran der einen Seite schiebt sich nun unter die der anderen Seite und wickelt sich um das Axon herum. Im weiteren Verlauf verkleben die einzelnen Lamellen zu kompaktem Myelin (Bunge 1986). Als sog. Schmidt-Lantermann-Einkerbungen oder nicht-kompaktes Myelin werden die Bereiche zusammengefasst, in denen das Zytoplasma der Zellen bestehen bleibt. Hier finden sich der Kern und die Zellorganellen der Schwann-Zelle (Zoupi 2011).

Auf diese Weise wird das Axon ähnlich einem Stromkabel mit einer isolierenden Schicht versehen. Der elektrische Widerstand der Membran wird erhöht und die Kapazität gesenkt. Dies ermöglicht eine erhöhte Geschwindigkeit der elektrischen Reizweiterleitung und damit einen schnelleren Austausch von Informationen. Die Myelinscheide wird in regelmäßigen Abständen durch ca. 1 µm lange, unmyelinisierte Abschnitte unterbrochen, sog. Ranvier'sche Schnürringe (Zoupi 2011). An diesen Stellen können durch ungehinderten Ionenfluss über die Membran Aktionspotentiale generiert werden. Die Aktionspotentiale werden also nicht kontinuierlich entlang eines Axons fortgeleitet, sondern springen von einem Schnürring zum nächsten. Es entsteht eine „saltatorische Erregungsleitung“ (Hodgkin 1952). Die Myelinscheide zwischen zwei Ranvier'schen Schnürringen wird auch als „Internodium“ bezeichnet. Am Übergang zwischen Internodium und Ranvier'schem Schnürring finden sich fingerförmige Ausziehungen des kompakten Myelins (engl. *paranodal loops*). Diese werden untereinander durch *adherent junctions* und mit dem Axon durch *tight junctions* verankert (Fannon 1995). An dieser Übergangszone findet ein intensiver molekularer Austausch zwischen einzelnen *paranodal loops*, der die Schwann-Zelle umgebenden Matrix und dem Axon statt (Pedraza 2001). Hier wird auch Myelin abgeschieden und wieder aufgebaut.

Traumatische Läsionen peripherer Nerven

Traumatische Verletzungen des peripheren Nervensystems liegen bei etwa zwei bis drei Prozent aller Patienten vor, die in Traumazentren notfallmäßig versorgt werden. Zählt man Plexusläsionen und Verletzungen der Nervenwurzeln hinzu, liegt die Inzidenz bei bis zu fünf Prozent (Noble 1998). Die zahlenmäßig am häufigsten vorkommenden Verletzungen stellen Überdehnungen nervaler Strukturen dar (z. B. bei Motorradunfällen). Bis zu 30 % der mittel- bis hochgradigen Verletzungen sind Schnittwunden, die durch scharfkantige Gegenstände (v. a. Glas, Messer, Autometall, Sägeblätter) oder durch Frakturen langer Röhrenknochen verursacht werden (Campbell 2008). Da sie in bis zu 60 % mit traumatischen Verletzungen des ZNS assoziiert sind, ist die Diagnosestellung in

vielen Fällen erschwert. In der Folge werden periphere Nervenverletzungen häufig erst mit zeitlicher Verzögerung erkannt und therapiert (Noble 1998).

Klinische Klassifikation traumatischer peripherer Nervenverletzungen und chirurgische Versorgung

Periphere Nervenläsionen lassen sich abhängig von ihrem Schweregrad in verschiedene Stadien einteilen. Die Klassifikation nach Seddon und die Klassifikation nach Sunderland stellen die im klinischen Alltag gebräuchlichste Beschreibung dar (Seddon 1975; Sunderland 1978).

Tabelle 1: Klassifikation peripherer Nervenläsionen

Klassifikation nach Seddon	Klassifikation nach Sunderland	Pathologie
Neurapraxie	Grad 1	Myelinschädigung/-ischämie
Axonotmesis		Axonläsion mit Stromaschädigung variablen Ausmaßes
	Grad 2	Axonläsion, Endo-/Peri-/Epineurium intakt
	Grad 3	Axonläsion, Endoneurium durchtrennt, Peri-/Epineurium intakt
	Grad 4	Axonläsion, Endo-/Perineurium durchtrennt, Epineurium intakt
Neurotmesis	Grad 5	Axonläsion, Endo-/Peri-/Epineurium durchtrennt

Tabelle 1: Klassifikation peripherer Nervenläsionen

Modifiziert nach Dillingham (Dillingham 1998)

Sunderland teilte das Ausmaß von Nervenläsionen in Grad 1 bis 5 ein (Tabelle 1) und orientierte sich dabei an dem anatomischen Aufbau eines peripheren Nervens inklusive der diesen umgebenden bindegewebigen Strukturen:

Grad 1: Die schwächste Form einer Nervenschädigung. Hierbei kommt es zu einer umschriebenen Myelinschädigung oder Ischämie, z. B. durch Druck auf den Nerven. Es findet keine Wallersche Degeneration statt. Diese Form der Schädigung ist nach einigen Wochen reversibel.

Grad 2: In diesem Stadium ist die Kontinuität des Axons unterbrochen. Die anderen Strukturen sind erhalten. Langfristig kommt es in den meisten Fällen spontan zu einer vollständigen Erholung.

Grad 3: Die Myelinscheide und das Endoneurium sind durchtrennt. Das Ausmaß der Erholung hängt davon ab, wie gut das regenerierende Axon die distalen endoneuralen Strukturen auffindet.

Grad 4: Dieses Stadium ist durch eine Durchtrennung des Nervens mit Ausnahme des Epineuriums definiert. Die Prognose gilt als unsicher.

Grad 5: Alle nervalen Strukturen sind durchtrennt. Eine spontane Erholung gilt als äußerst unwahrscheinlich.

Hierbei entsprechen Grad 1 der Neurapraxie, Grad 2 - 4 der Axonotmesis und Grad 5 der Neurotmesis nach Seddon (Seddon 1975): Die Neurapraxie definierte Seddon als vorübergehenden Leitungsblock durch eine umschriebene Myelinschädigung. Dabei kommt es zu keiner Durchtrennung von Strukturen. Eine vollständige Erholung kann innerhalb von Stunden eintreten oder bis zu einigen Monaten andauern.

Ist das Axon durchtrennt, das bindegewebige Gerüst jedoch erhalten, resultiert daraus eine Axonotmesis. Es kommt zur Wallerschen Degeneration. Das aussprossende Axon kann die intakte endoneurale Hülle als Leitstruktur nutzen.

Liegt eine komplette Kontinuitätsunterbrechung des Nervens einschließlich des Epineuriums vor, besteht eine Neurotmesis. Sie liegt auch vor, wenn die nervalen Strukturen in einem Ausmaß mit Narbengewebe durchsetzt sind, dass keinerlei Regeneration mehr möglich ist.

Ab Grad 3 nach Sunderland ist die Indikation zur operativen Versorgung gestellt. Darüber hinaus können auch bei Nervenläsionen Grad 1/2 operative Maßnahmen indiziert sein, wenn gleichzeitig Fibrosierungen des epifaszikulären oder interfaszikulären Epineuriums vorliegen.

Die chirurgische Versorgung stellt derzeit die einzige am Patienten angewandte Therapie dar. Aktuell gilt die autologe Transplantation eines sensorischen Nervenabschnittes als Goldstandard. Um kleine Defekte zu überbrücken, werden zunehmend synthetische und biologische Nerven-*Conduits* eingesetzt. Allogene Nerventransplantate bedürfen einer anschließenden immunmodulierenden Therapie. End-zu-Seit-Reparaturen, bei welchen der distale Nervenstumpf lateral an einen gesunden Nerv genäht wird, lassen sich nur bei Verletzungen bestimmter Nerven, z. B. des Plexus brachialis, durchführen (Maripuu 2012).

Elektrophysiologische Veränderungen nach einer peripheren Nervenverletzung

Bei einer Nervenläsion Grad 1 bzw. Neurapraxie ist im Rahmen der elektrophysiologischen Ableitung von Muskelsummenaktionspotentialen (MSAPs) ein sog. umschriebener Leitungsblock typisch. Hierbei werden die stimulierenden Elektroden zunächst proximal der Läsion platziert. Es resultiert daraus ein abgeschwächtes bzw. fehlendes MSAP des innervierten Muskels, da die Nervenfasern blockiert sind. Im Folgenden werden die Stimulationselektroden distal der Läsion platziert. An dieser Stelle können weiterhin regelrechte MSAPs abgeleitet werden. Das distale MSAP sinkt während der Regenerationsphase nicht ab, denn es kommt nicht zur Wallerschen Degeneration. Ab Amplitudendifferenzen zwischen proximal und distal von mehr als 20 % über eine Distanz von 25 cm oder weniger kann von einem umschriebenen Leitungsblock ausgegangen werden (Robinson 2000).

Bei Nervenläsionen ab Grad 2 bzw. Axonotmesis und Neurotmesis kommt es zu konformen elektrophysiologischen Veränderungen. Dies ist darin begründet, dass die äußeren neuralen Hüllstrukturen, nach welchen die Abstufungen in den Klassifikationen erfolgen, keinen Einfluss auf Veränderungen der MSAPs besitzen. Unmittelbar nach der Verletzung sind bei distaler Stimulation zunächst keine pathologischen MSAPs oder eine verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeit detektierbar. Bei proximaler Stimulation zeigen sich jedoch verminderte oder fehlende MSAPs. Es besteht folglich ebenfalls ein umschriebener Leitungsblock, so dass unmittelbar nach einer Nervenverletzung keine Graduierung durch elektrophysiologische Diagnostik möglich ist. Erst einige Tage später, wenn die Wallersche Degeneration erfolgt ist (s. unten), lässt sich eine progrediente Minderung der Amplituden der MSAPs auch bei Stimulation distal der Läsion erkennen. Dabei ist die Amplitude der MSAPs in etwa proportional zu der Anzahl nicht durch die Verletzung durchtrennter Axone innerhalb eines Nervens. Sind alle Axone durchtrennt worden, resultiert ein Nulllinien-MSAP (Robinson 2000).

Pathophysiologie peripherer Nervenläsionen

Veränderungen am distalen Nervensegment (Wallersche Degeneration)

Wird im Rahmen einer Verletzung das Axon von der Nervenzelle getrennt, kommt es im distalen Nervenstumpf zu einer Degeneration von Axolemm und Axoplasma. Durch eine Signalkaskade nicht-neuronaler Zellen werden die Zelltrümmer abgeräumt und eine

Umgebung generiert, die im weiteren Verlauf das Einwachsen des regenerierenden Axons optimal unterstützt (Abb.1). Dieser auch als „Wallersche Degeneration“ bezeichnete Prozess wurde erstmals 1850 durch August Volney Waller beschrieben und konnte seitdem immer detaillierter nachvollzogen werden (Waller 1850). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt geht man von drei Phasen der Degeneration nach einer Nervenläsion aus (Wang 2012):

Phase 1: Akute Degeneration

Innerhalb der ersten Stunde kommt es einige hundert Mikrometer proximal und distal der Nervenläsion zu einem Einstrom von Calciumionen durch calciumspezifische Ionenkanäle in das noch intakte Axolemm. Die erhöhte Calciumkonzentration aktiviert calciumabhängige Effektormoleküle und Proteasen (z. B. Calpain, eine Serin/Threonin-Protease), die das axonale Cytoskelett zersetzen (George 1995).

Phase 2: Latenzphase

Im distalen Nervenstumpf folgt nun eine Ruhephase, in der die Axone ihre physiologischen Funktionen weitgehend beibehalten. Sie sind weiterhin in der Lage Aktionspotentiale zu generieren, jedoch nimmt diese Fähigkeit mit fortschreitender Zeit ab. So liegen zwischen Verletzung und Degeneration bei Axonen von Nagetieren etwa 24 - 48 Stunden, bei menschlichen Axonen sogar einige Tage (Lubínska 1977; Chaudhry 1992). Die Aktivierung des intrinsischen Ubiquitin/Proteasom-Systems wird als einer der wichtigsten Gründe für die darauf folgenden Prozesse angesehen: Proteasome sind für den Abbau von Proteinen in der Zelle zuständig. Mit der Aktivierung des Systems könnte also die Konzentration eines für das Überleben des Axons essentiellen Proteins zunehmend sinken. Verschiedene Arbeitsgruppen bringen die sinkende Konzentration von Nmnat2, einem Katalysator der NAD⁺-Synthese (Nicotinsäureamid-Thymidin-Dinukleotid), mit der anschließenden axonalen Degeneration in Verbindung (Gilley 2010; Wang 2012). Zweitens soll das Ubiquitin/Proteasom-System eine wichtige Rolle bei der Auflösung der axonalen Strukturen spielen. So inhibiert es Mikrotubuli-assoziierte Proteine und führt so zu einer fortschreitenden Desorganisation des mikrotubulären Gerüsts (Zhai 2003).

Phase 3: Granuläre Fragmentierung

Mit Abschluss der Latenzphase beginnt eine abrupt einsetzende, asynchrone Fragmentierung des distalen Nervenstumpfes. Sie schreitet mit Spitzengeschwindigkeiten von bis zu 24 mm/h fort (Gilley 2010). Die Myelinhülle bricht auf und formt sog. Myelinovoide, die mit den axonalen Zelltrümmern abgeräumt werden (Stoll 1989).

Wallerische Degeneration und axonale Regeneration nach einer peripheren Nervenverletzung

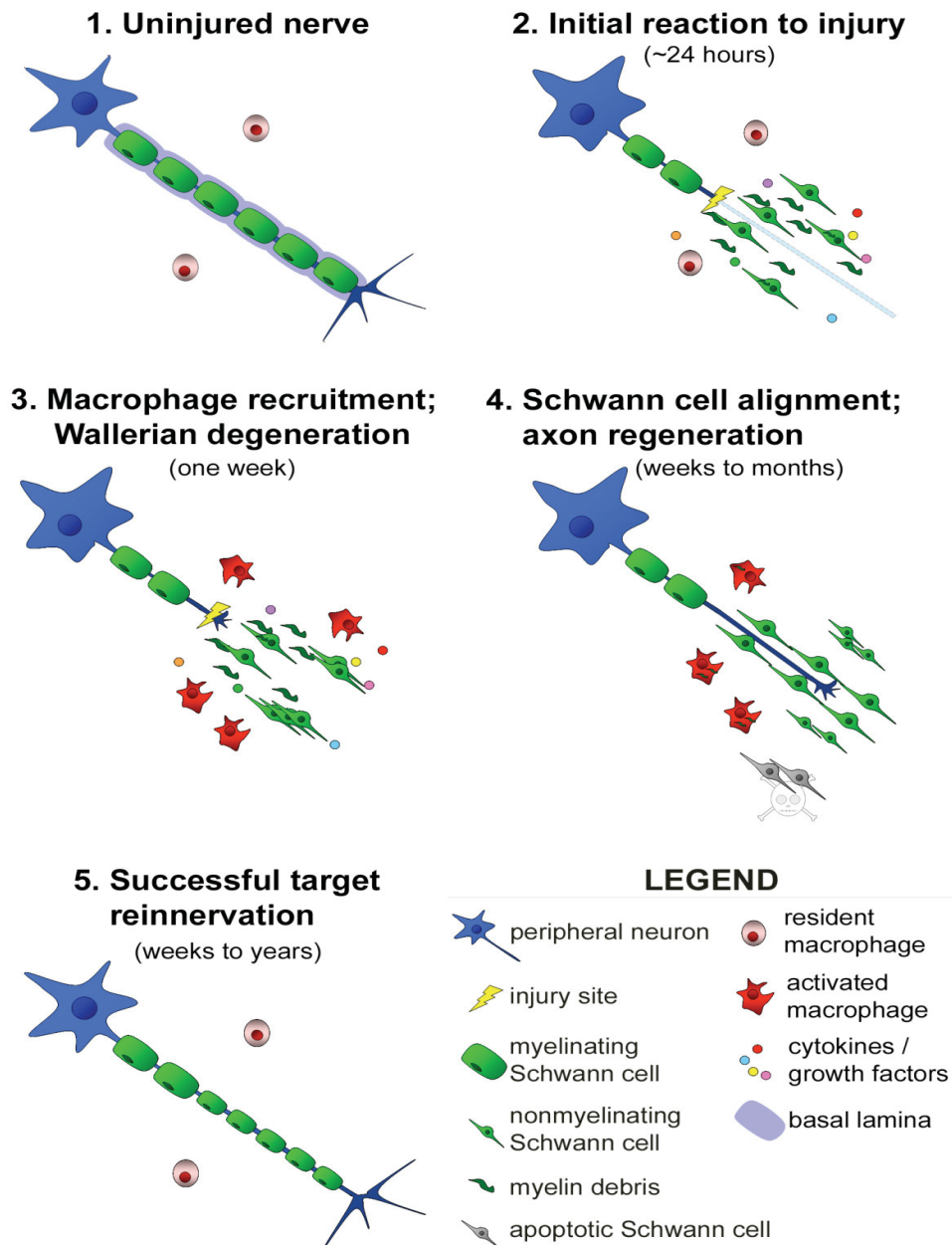


Abb. 1: Wallersche Degeneration und axonale Regeneration nach einer peripheren Nervenverletzung.
 Originaltitel: Progression of Wallerian degeneration and axon regeneration after peripheral nerve injury
 (Gaudet 2001)

Die Rolle der Schwann-Zellen im Rahmen der Wallerschen Degeneration

Parallel zu den Vorgängen im Axon reagieren auch die das Axon umgebenden Schwann-Zellen auf die Nervenläsion. Sie wandeln sich um in eine dedifferenzierte, unmyelinisierte Form, die ihren embryonalen Vorläuferzellen ähnelt, und beginnen sich zu teilen. Etwa vier Tage nach der Nervenverletzung erreichen sie die höchste Proliferationsrate (Gaudet

2011). Zeitgleich mit der Proliferation stoppen die Schwann-Zellen die Myelinproduktion und stoßen vorhandenes Myelin ab.

Schwann-Zellen besitzen die Fähigkeit, die entstandenen Myelintrümmer zu phagozytieren und abzubauen. Es konnte gezeigt werden, dass myelinassoziierte Proteine, z. B. MAG (engl. *myelin-associated glycoprotein*), einen starken inhibitorischen Effekt auf die weitere axonale Regeneration ausüben können (Shen 1998). Die Entfernung des Myelins gilt somit als wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Regeneration. Dazu werden in der Schwann-Zelle Enzyme, vor allem Phospholipase-A₂, aktiviert, die durch eine Umwandlung der Phospholipidbestandteile den Myelinabbau einleitet.

Um diesen Ablauf zu beschleunigen, exprimieren Schwann-Zellen Zytokine, u.a. TNF- α (engl. *tumor necrosis factor- α*) und MCP-1 (engl. *monocyte chemoattractant protein-1*). Dies hat zur Folge, dass etwa 48 bis 72 Stunden nach einer Nervenverletzung Makrophagen aus den Blutgefäßen wandern, den distalen Nervenstumpf infiltrieren und sich den ovoiden Myelinresten anlagern (Liefner 2000). Die Makrophagen penetrieren die Basallamina der Schwann-Zellen und unterstützen die Phagozytierung des Myelins über einen Zeitraum von mindestens 21 Tagen (Stoll 1989; Avellino 1995). Die bei einem intakten Nerv bestehende Blut-Nerven-Schranke wird zeitgleich mit Beginn der Wallerschen Degeneration auf ganzer Länge des distalen Nervenstumpfes aufgehoben, so dass Makrophagen ungehindert passieren können (Gaudet 2011).

Nach Abschluss der Proliferationsphase ordnen sich die Schwann-Zellen tunnelförmig zu Büngner-Bändern an. Diese Bänder dienen als Führungsschiene für das regenerierende Axon, das frisch aus dem proximalen Nervenende in den distalen Nervenstumpf aussprosst. Diese Führungstubes generieren ein auf das Axon abgestimmtes, wachstumsförderndes Milieu und liefern zahlreiche Substrate und Wachstumsfaktoren.

Schwann-Zellen nehmen in der axonalen Regeneration eine Schlüsselrolle ein. Sie sind nicht nur in Prozesse der Wallerschen Degeneration und der Remyelinisierung involviert, sie besitzen ebenfalls erheblichen Einfluss auf das axonale Wachstum.

48 Stunden nach der Nervenverletzung ändert sich die Genregulation in den Schwann-Zellen: die Aktivität für Gene, die für die Transkription von Myelinproteinen codieren, wird heruntergefahren; dafür werden vermehrt RAGs (engl. *regeneration associated genes*) exprimiert. Hierunter werden Gene, die an der axonalen Regeneration teilhaben, zusammengefasst, u.a. GAP-43 (engl. *growth associated protein-43*), neurotrophe Faktoren und ihre Rezeptoren, Neuregulin und Schwann-Zell-Proliferationsfaktor (Fu 1997; Boyd 2003). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Axone von transgenen

Mäusen, die kein Neuregulin-1 exprimieren, langsamer auswachsen, schwach myelinisiert sind und ein diffuses Aussprossen an der neuromuskulären Synapse zeigen (Fricker 2011). Des Weiteren sezernieren Schwann-Zellen nach einer Nervenverletzung vermehrt ECM-Proteine (engl. *extracellular matrix*), v.a. Laminin und Kollagene. Laminine sind essentiell für das erfolgreiche Einwachsen des neu aussprossenden Axons in den distalen Nervenstumpf. Sie binden Rezeptoren der Neurone und Schwann-Zellen und stabilisieren so die neu entstehenden Verbindungen zwischen Extrazellulärmatrix und Cytoskelett (Gaudet 2011).

Neurotrophe Faktoren

Unter dem Begriff der neurotrophen Faktoren wird eine Familie von Polypeptiden zusammengefasst, die sich durch ähnliche genetische Sequenzen und das Bindungsverhalten an Rezeptoren in drei Gruppen unterteilen lässt: die Neurotrophine, die Neurokine und die TGF- β -Familie (engl. *transforming growth factor β*). Die Gruppe der Neurotrophine setzt sich u.a. aus NGF (engl. *nerve growth factor*), BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*) und NT-3 (engl. *neurotrophin-3*) zusammen. Neurokine sind z. B. LIF (engl. *leukaemia inhibitory factor*) und CNTFs (engl. *ciliary neurotrophic factors*). Aus der TGF- β -Familie ist insbesondere GDNF (engl. *glial cell line-derived factor*) für die neuronale Regeneration von Bedeutung (Terenghi 1999; Gordon 2009).

Neurotrophe Faktoren spielen eine wesentliche Rolle für die regelrechte Ausbildung neuronaler Strukturen während der Entwicklung. Ist die Entwicklung abgeschlossen, werden sie u. a. von den innervierten Zielstrukturen exprimiert und über retrograden Transport zum Neuron gebracht. Sie dienen dabei als eine Art Fortbestehungssignal für die Neurone (Skaper 2008). Werden neuronale Strukturen verletzt, wird dieser Transport unterbrochen. Stattdessen beginnen der proximale Axonstumpf, Schwann-Zellen und nicht-neuronale Zellen (z. B. Fibroblasten) mit einer intensiven Synthese neurotropher Faktoren. Die fertiggestellten Faktoren diffundieren über den Läsionsort hinweg zum proximalen Axonabschnitt und unterstützen dort das regelrechte Aussprossen sowie den weiteren Wachstumsprogress (Reynolds 1993). Erlangt das auswachsende Axon Kontakt zu den Schwann-Zellen, kommt es zu einer zweiten Phase der Schwann-Zell-Proliferation mit erneuter Sekretion von Wachstumsfaktoren. Dauert die Verletzungsphase jedoch an, kann die hohe Produktion von neurotrophen Faktoren nicht aufrechterhalten werden. Dies scheint bei prolongierten Denervierungen ein wichtiger Grund für die unzureichende Regeneration zu sein (Gordon 2009).

NGF ist das am längsten bekannte Neurotrophin. Es unterstützt vor allem sensorische und sympathische Neurone bei ihrer Entwicklung, besitzt jedoch nach heutigen Erkenntnissen nur einen geringen Effekt auf das Aussprossen von Motoneuronen (Terenghi 1999). Nach einer Verletzung, z. B. nach einer Durchtrennung des *N. ischiadicus*, ist im Gegensatz dazu ein positiver regenerativer Effekt sowohl auf sensorische als auch motorische Axone gezeigt worden, wenn NGF exogen zugeführt wird. Dies scheint durch indirekte Einflüsse, z.B. aufgrund der Hochregulation von schwach-affinen NGF-Rezeptoren (p75 Rezeptoren) in den Motoneuronen und Schwann-Zellen nach einer Verletzung, begründet zu sein. Es wird angenommen, dass durch das gleichzeitige Ansteigen von NGF und schwach-affinen NGF-Rezeptoren die initiale Proliferation der Schwann-Zellen im Rahmen der Wallerschen Degeneration angeregt wird (Anton 1994).

BDNF und GDNF gelten als wichtige Wachstumsfaktoren für motorische Axone. BDNF besitzt einen neuroprotektiven Einfluss auf Motoneurone während der Entwicklung und wird nach einer Nervenläsion von den denervierten Schwann-Zellen vermehrt exprimiert (Funakoshi 1993). Führt man BDNF nach einer Nervenläsion exogen hinzu, sind positive Effekte auf die Regeneration von Motoneuronen nachweisbar (Boyd 2003). Dies scheint stark dosisabhängig zu sein: niedrige Konzentrationen unterstützen die axonale Regeneration, hohe Konzentrationen besitzen einen inhibitorischen Effekt auf das Aufwachsen des Axons (Boyd 2003). GDNF wird zu der Gruppe der TGF- β -Familie gezählt, besitzt jedoch auch neurotrophine Eigenschaften. Es wird vor allem im Skelettmuskel gebildet und über retrograden Transport den Motoneuronen zugeführt (Yan 1995). GDNF wird innerhalb kürzester Zeit nach einem *sciatic nerve crush* von den distalen Schwann-Zellen heraufreguliert, und in den proximalen Anteilen der durchtrennten Motoneurone werden Untereinheiten des GDNF-Rezeptors verstärkt produziert (Naveilhan 1997; Höke 2002). Führt man GDNF exogen nach einer Nervenläsion hinzu, verbessert sich die axonale Regeneration, unabhängig von der Dosierung (Boyd 2003).

Reaktionen der neuronalen Umgebung

Zeitgleich der Wallerschen-Degeneration schütten Schwann-Zellen, Makrophagen und umgebende Fibroblasten zahlreiche proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine aus, so dass eine zeitlich limitierte Entzündungsreaktion entsteht. Diese gleicht in der Hauptsache Entzündungen nach Verletzungen in nicht-neuronalen Geweben und soll ebenfalls zu einer zügigen Entfernung der Myelintrümmer beitragen, weitere Makrophagen

rekrutieren und die Expression von Neurotrophen (v. a. NGF) beeinflussen (Shamash 2002; Martini 2008).

Auch das endoneurale Interstitium und die Nervenhüllen verändern sich. Während das Endoneurium zunächst ödematös anschwillt, schrumpft es nach der Abräumung von Myelin und Axonbestandteilen wieder. Kommt es langfristig zu keiner erfolgreichen Reaussprossung des proximalen Axonabschnittes in den distalen Nervenstumpf, steigt der Kollagengehalt an und die einzelnen Zelllagen lockern sich auf.

Veränderungen am proximalen Nervensegment

Gleichzeitig mit den Veränderungen am distalen Nervensegment kommt es zu Veränderungen des proximal der Läsion gelegenen Axonabschnittes. Hierbei degeneriert das Axon in Richtung des Perikaryons, meist jedoch lediglich bis zum ersten Ranvier'schen-Schnürring. Bei diesem auch als retrograde Degeneration bezeichneten Prozess finden sich ähnliche Reaktionsmuster von Schwann-Zellen und Makrophagen wie bei der Wallerschen Degeneration (Fenrich 2004). Das proximale Ende der Läsion schwillt zu axonalen Endkolben an. Diese Endkolben wurden erstmals von Santiago Ramón y Cajal 1928 beschrieben und seitdem immer detaillierter untersucht (Cajal 1928). Hier akkumulieren Abbauprodukte des Axoplasmas und Moleküle wie NO (Stickstoffmonoxid), Substanz P und Neurofilamente (Zochodne 2001). Nach 10 bis 20 Tagen bildet sich an der Demarkationsstelle ein Wachstumskolben.

Die Veränderungen am Perikaryon werden als „Zellkörper-Reaktion“ zusammengefasst und lassen sich vor allem in den ersten drei Wochen nach einer Axotomie beobachten. Zunächst schwillt der Zellkörper an, anschließend wird das Perikaryon chromatolytisch, d. h. es stößt weite Teile des basophilen endoplasmatischen Retikulums ab. Dabei gehen die mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziierten Chromosomen bzw. *nissl bodies* verloren. Gleichzeitig werden wie in den Schwann-Zellen RAGs hinaufreguliert. Vor allem Gene, die für Proteine des Zytoskelettes codieren (β -Tubulin, Aktin, *cytoskeleton-associated protein 23*), werden verstärkt exprimiert, aber auch zahlreiche Neuropeptide und Wachstumsfaktoren werden gebildet. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Ausmaß der GAP-43-Expression die Form des Wachstumskolbens und das Aussprossen der Axone beeinflussen kann (Strittmatter 1994). Das genaue Muster synergistischer Effekte von RAGs im Perikaryon und im distalen Nervenstumpf konnte bis jetzt noch nicht vollständig nachvollzogen werden. So wird z. B. die Expression von CGRP (engl. *Calcitonin gene-related peptide*) in Perikarya sensorischer Nerven nach einer

Verletzung deutlich herunterreguliert, in regenerierenden, distalen Anteilen des Axons jedoch heraufreguliert (Zochodne 2012).

Zeitgleich wird die Expression von Neurofilamenten drastisch reduziert, und neuronale Transportvorgänge durch Mikrotubuli, die nicht das Auswachsen betreffen, kommen fast vollständig zum Erliegen. Kerschensteiner und Mitarbeiter konnten demonstrieren, dass die ersten nachwachsenden axonalen Strukturen schon wenige Stunden nach einer Axotomie am proximalen Stumpf detektierbar sind (Kerschensteiner 2005). Das Axon sprosst nun mit einer Geschwindigkeit von 1 - 3 mm/Tag aus. Dabei stehen der Wachstumskolben und die distalen Schwann-Zellen im engen Austausch miteinander. So induziert z. B. Neuregulin, das sowohl von Wachstumskolben als auch von den Schwann-Zellen exprimiert wird, eine weitere mitotische Teilung der Schwann-Zellen, sobald sie in Kontakt mit dem Wachstumskolben gelangen (Carroll 1997). Aussprossende Axone wachsen entlang der Schwann-Zellen bzw. nutzen deren Basallamina, sobald sie den distalen Nervenstumpf erreichen.

Faktoren einer unzureichenden Regeneration

Obwohl durch die oben beschriebenen Reparationsmechanismen nach einer Nervenverletzung ein erneutes Aussprossen des Axons in den distalen Nervenstumpf generell möglich ist, sind die Ergebnisse der funktionellen Erholung häufig enttäuschend. So gewinnt lediglich jeder zehnte Patient mit einer Nervenläsion und anschließender Naht beider Nervenenden eine normale Funktion zurück (Brushart 1998).

Nach einer chirurgischen Intervention können neben dem Grad der Nervenverletzung zahlreiche Faktoren das Ausmaß der funktionellen Erholung beeinflussen. So wird dem Alter des Patienten der größte Einfluss auf das *outcome* zugeschrieben. Je jünger der Patient, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass Funktionen der Zielorgane zufriedenstellend zurückkehren. Je früher die Operation durchgeführt wird, desto besser sind die Ergebnisse. Ein Aneinanderlegen der Nervenenden in den ersten Tagen nach der Läsion wird als weiterer positiver prognostischer Marker angesehen (Maripuu 2012). Doch selbst bei bestmöglicher Erfüllung aller genannten Kriterien, ist der Benefit einer Operation ungewiss. Dies liegt u. a. darin begründet, dass intrinsische Prozesse innerhalb des proximalen und distalen Nervenabschnittes nur bedingt durch chirurgische Interventionen beeinflussbar sind.

Einer der größten Einflussfaktoren für eine erfolgreiche Reinnervation ist der Zeitraum, in welchem das aussprossende Axon den distalen Nervenstumpf erreicht. In einem akut

denervierten distalen Nervenstumpf ordnen sich die Schwann-Zellen longitudinal zu den Büngner-Bändern an. Erlangt das Axon Kontakt zu den Schwann-Zellen, kommt es zu einer zweiten Phase der Schwann-Zell-Proliferation mit erneuter Sekretion von Wachstumsfaktoren (Dong 1995). Schwann-Zellen können in dieser Anordnung etwa acht Wochen nach einer Nervenläsion ohne Kontakt zu einem Axon überleben. Hat das Axon sie bis zu diesem Zeitpunkt nicht erreicht, werden sie zunächst atrophisch. Sie desensibilisieren zunehmend gegenüber Wachstumsfaktoren und sterben schließlich durch Apoptose. Dies gilt sowohl für Schwann-Zellen chronisch denervierter Nerven im Tiermodell als auch für humane Nerven (Terenghi 1998). Die Schwann-Zellen lassen zunächst ihre Basallamina zurück, die im Anschluss ebenfalls abgebaut wird (Dedkov 2002). In der Basallamina befinden sich für das axonale Auswachsen notwendige Moleküle der extrazellulären Matrix (z. B. Laminin und Kollagen Typ-IV), außerdem dient sie als Speicher für die von den Schwann-Zellen sezernierten Wachstumsfaktoren (Bunge 1986). Des Weiteren schirmen Büngner-Bänder und Schwann-Zellen das einsprossende Axon von wachstumshemmenden Molekülen (v. a. Chondroitinsulfat-Proteoglykane) des Endoneuriums ab. Steigt die Konzentration von Chondroitinsulfat-Proteoglykanen, werden vermehrt hemmende Signalkaskaden im Wachstumskegel aktiviert und die aussprossende Axone wachsen langsamer (Cheng 2008). Das Axon muss also auf seinem Weg zum Zielorgan ohne das generierte wachstumsfördernde Milieu auskommen und ist gleichzeitig wachstumshemmenden Molekülen ausgesetzt, wenn Büngner-Bänder und Schwann-Zellen atrophiert sind.

Das Axon ist in der Folge nur bedingt in der Lage, eigenständig den distalen denervierten Nervenstumpf aufzufinden oder den ursprünglichen Wachstumspfad nachzuvollziehen. Selbst wenn sich der distale Nervenstumpf in unmittelbarer Nähe befindet, wächst das Axon nur sporadisch in dessen Richtung, wenn Büngner-Bänder und Schwann-Zellen fehlen. Einige der ungerichtet aussprossenden Axone drehen ihre Wachstumsrichtung um und penetrieren das Epineurium des proximalen Stumpfes (Zochodne 2012).

Regenerierende Axone eines proximalen Nerven wachsen nicht zeitgleich in den distalen Nervenstumpf ein, sondern sprießen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit aus. Selbst wenn die Nervenenden chirurgisch so präzise wie möglich zusammengefügt werden, führen mikroskopisch kleine Lücken zu Abweichungen im optimalen Regenerationsprozess. Einige Axone schicken Äste nach lateral aus und legen sich zunächst für eine gewisse Strecke an den proximalen Stumpf, bevor sie ihn penetrieren. Ein Axon kann sich dabei in 10 bis 40 kleinere Äste aufteilen, sog. *sprouting*. Diese

erreichen jedoch eher selten das Zielorgan, da auf diese Weise zu viele Axone untereinander um Wachstumsfaktoren und begleitende Schwann-Zellen konkurrieren (Witzel 2005).

Wenn proximales und distales Nervenende chirurgisch rekonnektiert werden oder die Axone eigenständig regenerieren, erhalten sie erfolgreich Anschluss an die Büngner-Bänder des Nervenstumpfes. Normalerweise werden dabei motorische und sensorische Axone des gemischten peripheren Nerven durch die spezifische Expression von Wachstumsfaktoren zu den zugehörigen Nervenästen geleitet (Höke 2006). Dennoch wachsen nicht selten motorische Axone fälschlicherweise in sensorische Nervenäste ein und umgekehrt. Nachfolgend werden die Zielorgane nicht adäquat innerviert.

Selbst bei erfolgreichem Einwachsen des Axons erlangt der Muskel nur selten das ursprüngliche Ausmaß an Kraft zurück. Vor allem Axone motorisch/sensorisch gemischter Nerven tendieren dazu, ungeordnet in den Zielmuskel einzusprossen. Die einzelnen Motoaxone wachsen dabei unwillkürlich an unterschiedlichen Stellen in den Muskel ein. In der Folge bleibt die funktionelle Erholung suboptimal, da die Rekrutierung der motorischen Einheiten nicht mehr koordiniert erfolgen kann. Auch der fibrotische Umbau eines über einen längeren Zeitraum nicht mehr innervierten Muskels kann die synergistische Kontraktion erschweren (Sumner 1990).

Ziele der Arbeit

Einerseits können die regenerativen Mechanismen nach einer Nervenverletzung im peripheren Nervensystem immer detaillierter nachvollzogen werden. Andererseits sind erfolgreiche, interventionelle Therapieoptionen bisher nicht ausreichend etabliert. Langfristig soll diese Arbeit einen Beitrag dazu leisten, neue Therapieansätze für Verletzungen des peripheren Nervensystems zu erforschen.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die Transplantation von Schwann-Zellen in chronisch denervierte Nervensegmente dazu geeignet ist, die Regeneration peripherer Axone zu verbessern. Dabei sollte das Tiermodell die vorherrschenden Bedingungen einer chronischen Denervierung beim Menschen möglichst real abbilden.

Eine mögliche verbesserte Regeneration sollte auf funktioneller, bildmorphologischer und genexpressiver Ebene untersucht werden. Ziel sollte sein, einen möglichst umfassenden Einblick in die Prozesse nach der Schwann-Zell-Transplantation zu erhalten. So wurde die Auswirkung der Schwann-Zellen auf die funktionelle Erholung und die Remyelinisierung des Nervens durch elektrophysiologische Messungen überprüft. Um Veränderungen auf genexpressiver Ebene, die möglicherweise den Regenerationsprozess beeinflussen, besser nachzuvollziehen, wurde das Expressionsmuster von Neurotrophinen der einzelnen Nerven analysiert. Unter der Fragestellung, ob die Lokalisation der Transplantation Einfluss auf den Heilungsprozess verletzter Nerven besitzt, wurden die Zellen in zwei unterschiedlichen Entfernungen zum Ort der Läsion transplantiert.

In der Folge wurde ermittelt, inwiefern die Entität der Schwann-Zelle die Regeneration beeinflusst. Aus diesem Grund wurden in verschiedenen Versuchsrunden sowohl allogene, postnatale P(0)-Schwann-Zellen, als auch autologe Schwann-Zellen transplantiert und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Die vorliegende Arbeit soll grundsätzliche Einblicke über den Einfluss der Transplantation von Schwann-Zellen auf die axonale Regeneration liefern. Die Erkenntnisse, die aus den Ergebnissen dieser Arbeit gewonnen werden, sollen als Grundlage für weitere Experimente dienen.

2. Material und Methoden

Materialliste

Tabelle 2: Antikörper

Primärantikörper	Antigen	Wirt	Hersteller	Ort
Anti-GFP	GFP	Kaninchen	Abcam	Cambridge/UK
Anti-S100	S100	Kaninchen	SIGMA	St. Louis/USA

Sekundärantikörper	Antigen	Wirt	Hersteller	Ort
Alexa-Fluor 594-gekoppelt	Kaninchen	Ziege	Invitrogen	Paisley/UK
Alexa-Fluor 488-gekoppelt	Kaninchen	Ziege	Invitrogen	Paisley/UK

Tabelle 2: Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 3: Geräteliste

Bezeichnung	Hersteller	Ort
7900 HAT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Life Technologies	Carlsbad/USA
Amplifier GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Life Technologies	Carlsbad/USA
AxioCamHRC-Mikroskopkamera	Carl Zeiss AG	Jena/Deutschland
Axioplan 2 Imaging Mikroskop	Carl Zeiss AG	Jena/Deutschland
CMA 450 Temperature Controller	SDR Scientific	Sydney/Australien
Flaming/Brown Micropipette Puller	Sutter Instruments Co.	Novato/USA
Homogenisator Polytron PTO2100	Kinematica AG	Luzern/Schweiz
MicroAmp® Fast Optical Reaction Plate 0.1 ml	Applied Biosystems, Life Technologies	Carlsbad/USA
Mikrotom Kryostat CM 3050	Leica	Wetzlar/Deutschland
NanoDrop® Spectrophotometers	Thermo Fisher Scientific	Wilmington/USA
PC-Programm Scope-tm 4	Applied Biosystems, Life Technologies	Carlsbad/USA
PowerLab signal acquisition set-up	ADInstruments	Grand Junction/USA
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen N.V.	Hilden/Deutschland

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

Tabelle 4: Chemikalien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller	Ort
4',6-Diamidin-2-phenylindol	Vectashield®mounting medium with DAPI	Vector Laboratories Inc. Burlingame	Burlingame/UK
Glutardialdehyd 3,9% mit Phosphatpuffer	25% Glutardialdehyd + 0,4 M Phosphatpuffer (Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat) + di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei + Aqua bidest	Universitätsklinikum Aachen	Aachen/Deutschland
high capacity RT Kit mit RT-Inhibitor	s. Abschnitt „Material/Methoden“	Applied Biosystems, Life Technologies	Carlsbad/USA
PBS	Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH	Pasching/Österreich
PFA 4%	40g PFA + 1 L PBS + 5 NaOH	Eigene	Düsseldorf/Deutschland
RNase free DNase Set	s. Abschnitt „Material/Methoden“	Qiagen N.V.	Hilden/Deutschland
SYBR®Green		Applied Biosystems, Life Technologies	Carlsbad/USA
TRIzol® Reagent		Invitrogen	Paisley/UK
Zellmedium	Dulbecco's modified Eagle Medium	PAA Laboratories	Pasching/Österreich

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Tabelle 5: Diverses

Bezeichnung	Hersteller	Ort
Faden 10-0 Ethilon	Ethicon	New Brunswick/USA
Hautnaht 5-0 Vicryl	Ethicon	New Brunswick/USA
Isofluran-Narkosegas	Actavis Deutschland	München/Deutschland
Spritze Hamilton 0,10 ml	Hamilton Company	Reno/USA
Tissue-Tek®O.C.T™ Compound	Weckert Labortechnik	Kitzingen/Deutschland
Wundklammer Michel 7,5 x 1,75 mm	Braun/Aesculap Germany	Tuttlingen/Deutschland

Tabelle 5: Weitere verwendete Materialien

Versuchstiere

Genehmigung des Versuches nach dem Tierschutzgesetz

Sämtliche Maßnahmen an den Tieren erfolgten nach Genehmigung des Tierversuchsvorhabens mit der Az-Nummer 8.87-50.10.37.09.296 nach § 8 Abs. 1 gemäß dem Tierschutzgesetz. Alle Experimente erfolgten in der Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in enger Abstimmung mit den dortigen Tierärzten und Mitarbeitern. Im Vorfeld der Versuche wurde an einem Kurs für Versuchstierkunde mit erfolgreichem Abschluss teilgenommen.

Tierstamm und Tierhaltung

Die Versuche wurden an weiblichen Ratten vom Stamm Wistar durchgeführt. Zum Zeitpunkt der ersten Operation waren die Tiere durchschnittlich drei Monate alt. Das Versuchskollektiv lebte unter den konstanten Bedingungen von Tag/Nacht-Zyklus, Temperatur (22 °C +/- 2 °C), Luftfeuchtigkeit (60 % +/- 5 %), Luftbewegung (22-facher Luftwechsel/h) und Geräuschpegel der TVA Düsseldorf. Wasser und Futter standen *ad libitum* zu Verfügung.

Tiermodell der axonalen Regeneration nach chronischer Denervierung

Perioperatives Setting

Grundlage der Experimente war ein *in vivo* Modell axonaler Regeneration nach chronischer Denervierung. Alle Eingriffe erfolgten unter aseptischen Bedingungen in dafür vorgesehenen Räumlichkeiten der TVA Düsseldorf.

Die Ratten wurden per Inhalationsnarkose mit Isofluran betäubt und während der gesamten Operationsdauer per Maske beatmet (Inhalationsgemisch: 20 % O₂, 40 % N₂O, 1,5 % Isofluran). Um einer Auskühlung vorzubeugen, wurde ein CMA/450 *Temperature Controller*, eingestellt auf 37 °C, als Unterlage verwendet. Zum Schutz vor Austrocknung der Augen wurde Augensalbe aufgetragen.

Durchtrennung des *N. tibialis*

Vorbereitend wurde von allen Tieren eine Elektroneurographie des linken *N. tibialis* erstellt. So konnte eine vorherige Beeinträchtigung des Nerven ausgeschlossen werden. Die Versuchstiere wurden zunächst in Bauchlage gebracht und der linke Hinterlauf wurde nach außen rotiert und fixiert. Im Anschluss an Sprühdesinfektion und Rasur des dorsomedialen Oberschenkels erfolgte die Durchtrennung der dermalen und subkutanen Schichten im oberen Drittel. Nach Fasziotomie der oberflächlichen Muskelschicht konnte das *Caput mediale* des *M. gastrocnemius* beiseite geschoben werden. Der *N. tibialis* wurde bis zur Trifurkation von Bindegewebe freipräpariert, vorsichtig mobilisiert und schließlich soweit proximal wie möglich durchtrennt (s. Abb. 2 - 4). Der distale Anteil wurde in eine Muskellasche des *M. gastrocnemius*, der proximale Anteil in einen *Recessus* der oberen Flexoren gelegt. Ziel dieses Schrittes war es, eine Rekonnektion beider Nervenenden im Zeitraum bis zum zweiten Eingriff zu verhindern. Es folgten Fasiennaht (5-0 Vicryl®, Ethicon) und Hautklammerung. Die verschlossene Wunde wurde mit Kochsalz gereinigt und die Tiere wurden zum Aufwachen in ihren Käfig gelegt. Nach ein bis zwei Stunden bewegten sie sich agil in ihrem Käfig und nahmen Nahrung zu sich.

Übersicht des *N. ischiadicus* und seiner Äste am Hinterlauf der Ratte

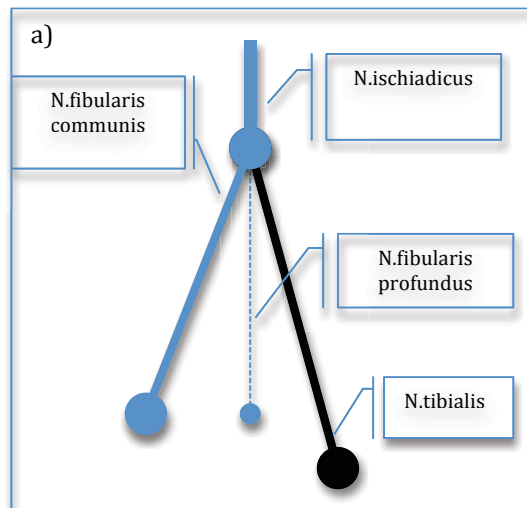


Abb. 2: Übersicht des *N. ischiadicus* und seiner Äste am Hinterlauf der Ratte

Durchtrennung *N. tibialis*

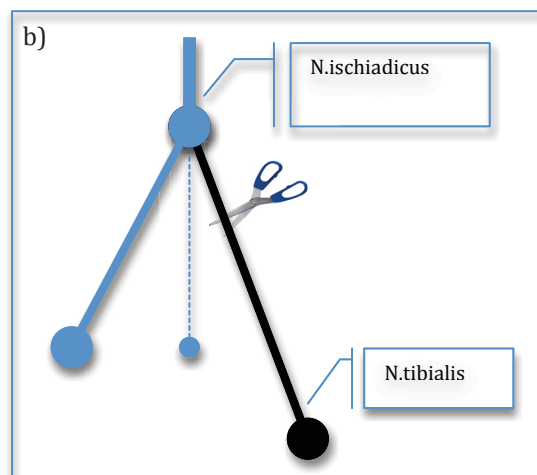


Abb. 3: Durchtrennung *N. tibialis*

Situs postoperativ

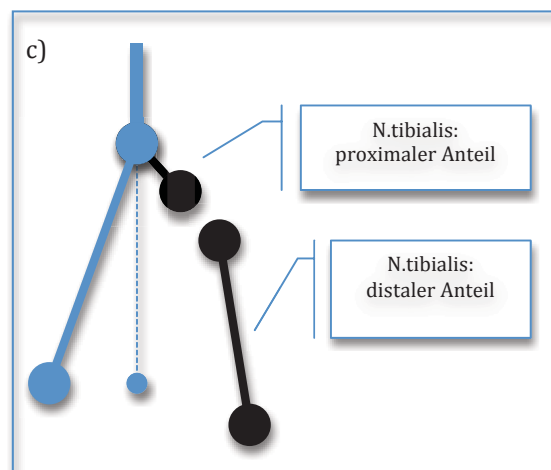


Abb. 4: Situs postoperativ

Konjunktion des *N. tibialis* mit *N. fibularis*

Die Versuchstiere wurden in Rechtsseitenlage gebracht, der linke Hinterlauf wurde extendiert und fixiert. Der dorsolaterale Anteil des Oberschenkels wurde desinfiziert und rasiert. Es folgte ein 1,5 cm großer Hautschnitt caudal des *M. quadriceps femoris*. *M. biceps femoris* wurde durchtrennt, so dass der tiefe Ast des *N. fibularis* freigelegt wurde. Der Nerv wurde so weit nach proximal wie möglich freipräpariert und mobilisiert, jedoch noch nicht durchtrennt, sondern lediglich durch einen Faden markiert. In einem zweiten Schritt wurde der in der ersten Operation vom proximalen Anteil abgetrennte Stumpf des *N. tibialis* unter dem medialen Kopf des *M. gastrocnemius* aufgesucht und auf den Muskelbauch gelegt. Nach Abschätzung der nötigen Länge des *N. fibularis*, um eine spannungsfreie Nahtstelle zu erreichen, wurde dieser nun auch durchtrennt (s. Abb. 5). Die Schnittstelle des *N. fibularis* wurde vorsichtig mit einer feinen Pinzette umgriffen und ca. 1 mm proximal durchstoßen (10-0 Ethilon®, Ethicon). Im Anschluss wurde auch der *Tibialisstumpf* ca. 1 mm distal des Stumpfes mit selbigem Faden durchstoßen. Dieser Vorgang wurde bei jedem Nerv dreimal wiederholt, bis eine sichere Konnektion gewährleistet schien (s. Abb. 6)

Durchtrennung *N. fibularis*

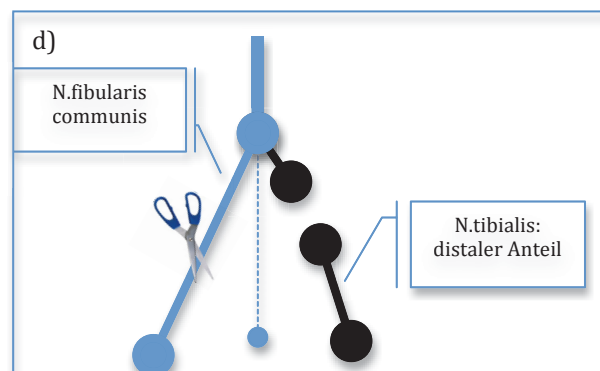


Abb. 5: Durchtrennung *N. fibularis*

Konnektion

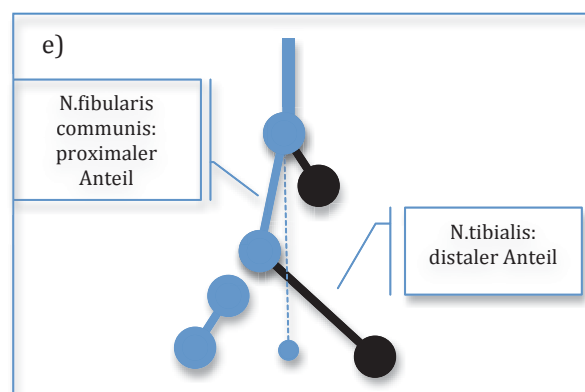


Abb. 6: Konnektion

Schwann-Zellen

Die Präparation, Kultivierung und Transfektion der Schwann-Zellen erfolgte durch Herrn Dr. Andre Heinen, Klinik für Neurologie, HHU Düsseldorf. Schwann-Zellen der Generation P0 wurden nach dem Protokoll von Brockes et al. behandelt (Brockes 1979), adulte Schwann-Zellen in abgewandelter Form mit Komplementlyse nach Haastert (Haastert 2007).

Injektion

Zur Injektion der Schwann-Zellen wurden im Vorfeld der Operation Glaskanülen mittels Flaming/Brown *Micropipette Puller* (Sutter Instruments Co.) angefertigt und durch Heißwachs luftdicht mit der Hohnadel der Spritze verbunden.

Nach Spülung der Wundhöhle mit 3 ml Kochsalzlösung folgte das vorsichtige Aufziehen der Spritze (Hamilton 0,10 ml, Hamilton Company) mit Schwann-Zell/Medium-Gemisch bei Tieren der Interventionsgruppe bzw. reinem *Dulbecco's modified Eagle Medium* (Life Technologies) für die Kontrolltiere. Der frisch konnektierte *Tibialis*stumpf wurde erneut aufgesucht und mittels einer untergelegten Pinzette als Widerlager fixiert. Die Kanüle wurde nun in einem spitzen Winkel in das Nervengewebe eingebracht. Die Injektion erfolgte in 2 µl-Schritten in einem Zeitraum von 3 Minuten (s. Abb. 7). Ziel dieser Applikationsmethode war es, dem Entstehen eines Vakuums innerhalb des Spritzensystems mit konsekutiver Ejektion der Lösung aus dem Nerven während des Herausziehens vorzubeugen. Abschließend wurde der Nerv spannungsarm in die Muskellogen gebettet, das Operationsgebiet wurde auf persistierende Blutungsquellen hin überprüft und die Wunde schrittweise via Fasziennaht und epidermaler Klammerung verschlossen. Nach Aufhebung der Betäubung wurden die Tiere zur postoperativen Beobachtung zurück in ihren Käfig gelegt. Nach zwei Stunden bewegten sich die Tiere rege und nahmen Wasser und Nahrung zu sich. Die so präparierten Tiere wurden nach einer einwöchigen Ruhephase regelmäßig alle sieben Tage über einen Zeitraum von acht Wochen elektroneurographisch untersucht.

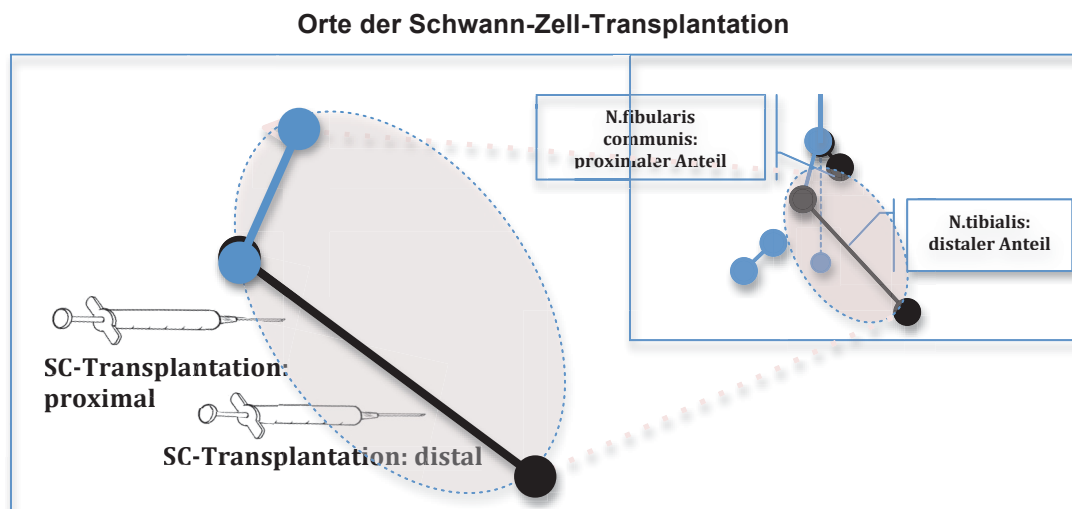


Abb. 7: Orte der Schwann-Zell-Transplantation SC = engl. Schwann cell (deutsch: Schwann-Zelle)

Versuchsaufbau

Es wurden insgesamt drei Versuchsreihen durchgeführt. Einen Überblick der chronologischen Abfolge des Versuches gibt Abb. 8.

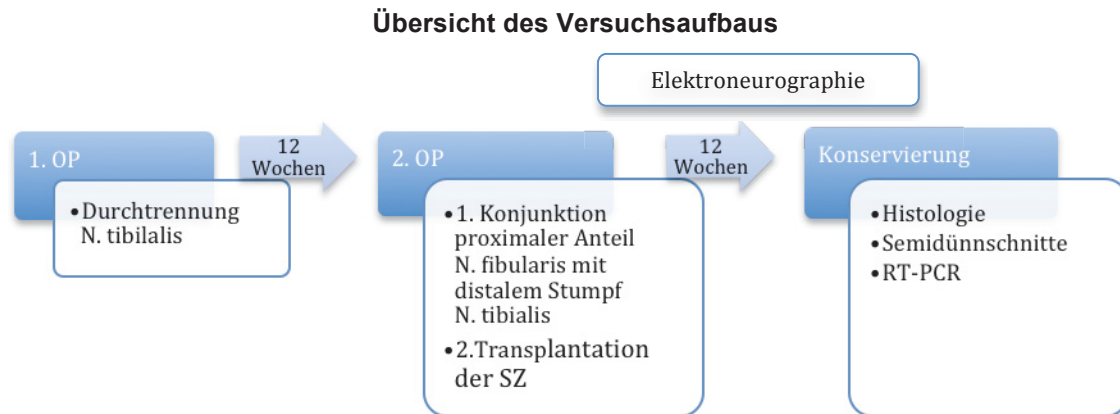


Abb. 8: Übersicht des Versuchsaufbaus

In einer ersten Operation wurde bei allen Tieren der linke *N. tibialis* durchtrennt. Nach dreimonatiger Ruhephase erfolgte die Nervenadaptation des distalen *Tibialis*stumpfes mit dem proximalen Anteil des *N. fibularis* mit simultaner Transplantation postnatale (P0)-Schwann-Zellen in den *N. tibialis* proximal und weiter distal zur Nahtstelle (s. Tabelle 2). Im Anschluss daran wurden wöchentlich MSAPs (Muskelsummenaktionspotentiale) des *N. tibialis* abgeleitet. Das Experiment endete nach Ablauf der acht Wochen mit Konservierung des zu untersuchenden Materials für die Auswertung.

Tabelle 6: Übersicht erste Versuchsreihe

Lokalisation am <i>Tibialis</i> stumpf (postnatale P(0)-Schwann-Zellen)	GFP-Markierung	Anzahl Tiere	
proximal	ja	8	
distal	ja	8	
proximal	nein	2	
distal	nein	1	
proximal	nein	5	Kontrolle
	Gesamt	24	

Tabelle 6: Übersicht erste Versuchsreihe GFP = engl.: green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)

Zweite Versuchsreihe:

Die zweite Versuchsreihe orientiert sich im Wesentlichen an dem Versuchsprotokoll des ersten und dritten Versuches. Folgende Änderungen wurden vorgenommen:

Ort der Schwann-Zell-Transplantation war bei allen Versuchstieren der proximale Abschnitt des frisch mit *N. fibularis* konnektierten *Tibialisstumpfes* (s. Tabelle 3).

Die Tiere wurden nach der zweiten Operation nicht elektroneurographisch untersucht. Nach 14 Tagen erfolgte die Konservierung des Nerven zur histologischen und molekulargenetischen Analyse. Semidünnschnitte wurden nicht angefertigt.

Tabelle 7: Übersicht zweite Versuchsreihe

Lokalisation am <i>Tibialisstumpf</i> (postnatale P(0)-Schwann-Zellen)	GFP-Markierung	Anzahl Tiere	
proximal	ja	6	
proximal	nein	6	Kontrolle
	Gesamt	12	

Tabelle 7: Übersicht zweite Versuchsreihe GFP = engl.: green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)

Dritte Versuchsreihe:

Der Aufbau der dritten Versuchsreihe gleicht dem des ersten Versuches. Folgende Änderung wurde vorgenommen: Im Rahmen der ersten Operation wurden von allen Tieren 0,5 cm lange Proben aus dem *Tibialisstumpf* entnommen. Hieraus wurden die Schwann-Zellen extrahiert. Schließlich konnten jedem Tier der Interventionsgruppe die Zellen autolog transplantiert werden (s. Tabelle 4).

Tabelle 8: Übersicht dritte Versuchsreihe

Lokalisation am <i>Tibialisstumpf</i> (autologe Schwann-Zellen)	GFP-Markierung	Anzahl Tiere	
proximal	nein	5	
proximal	nein	5	Kontrolle
	Gesamt	10	

Tabelle 8: Übersicht dritte Versuchsreihe GFP = engl.: green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)

Elektroneurographie

Sämtliche elektroneurographischen Daten wurden über *PowerLab signal acquisition set-up* (ADInstruments, Grand Junction, USA) erhoben. Über die elektrische Stimulation des *N. ischiadicus* durch zwei ins Gewebe eingebrachte Reiznadeln bildet sich ein fortleitendes Aktionspotential. Mithilfe zweier Ableitelektroden kann das Antwortpotential des Muskels visualisiert werden.

Durch Lagerung der Tiere auf einer CMA/450 *Temperature Controller* Unterlage bei konstanten 37°C sollten temperaturbedingte inter- und intraindividuelle Schwankungen der Nervenleitgeschwindigkeit sowie eine Auskühlung der Tiere vermieden werden. Das zu untersuchende Tier wurde zunächst über eine Isofluran-Narkose betäubt und auf die rechte Seite gelagert.

Nach einer Sprühdeseinfektion des linken Hinterlaufes konnten die Nadelelektroden wie folgt platziert werden:

Um die korrekte Lage der Reizelektroden im Verlauf des *N. ischiadicus* zu gewährleisten, wurden zunächst von der Wirbelsäule ausgehend *Spina ischiadica posterior superior* und *Trochanter major femoris* ertastet. Die Elektroden wurden nun nah am *Trochanter* in den *M. gluteus medius* bzw. den kranialen Anteil des *M. biceps femoris* senkrecht eingestochen. Es ist darauf zu achten, nicht zu weit distal zu stechen, da sich der Nerv bereits nach 3 – 5 mm distal des *Trochanters* in seine weiterführenden Äste teilt. Als Erdung wurde eine Neutralelektrode in den proximalen Abschnitt des Schwanzes eingebracht. Zwei Ableitelektroden wurden im *M. flexor digitorum profundus* platziert. Dieser wird durch *N. tibialis* innerviert, welcher sich an der medialen Seite des Unterschenkels zwischen eben genanntem Muskel und der gut als Orientierungspunkt verwendbaren Achillessehne befindet.

Es wurden 0.2 s dauernde Spannungspulse von 1 bis 8 mV und einem maximalen Strom von 5 mA angelegt.

Von allen Versuchstieren wurden drei Werte pro Messpunkt erhoben, um eine möglichst genaue Annäherung an die realen Werte zu gewährleisten.

Konnten innerhalb einer zehnminütigen Narkosedauer keine verwertbaren Daten erfasst werden, wurde die Untersuchung zum Schutze des Tierwohles abgebrochen.

Die Messergebnisse wurden über das auf die Benutzerin lizenzierte Programm *ScopeTM 4* (ADInstruments, USA) elektronisch bearbeitet und gespeichert.

Organasservierung

Die Gewinnung der im Folgenden genannten Materialien erfolgte stets aus beiden Körperhälften. Die Tiere wurden zunächst durch eine Isofluran-Narkose betäubt und dann durch einen Genickschlag getötet.

Asservierung von Nerven- und Muskelgewebe zur histologischen Analyse

Der Körper wurde in Bauchlage auf eine Styroporplatte gelegt und durch Nadeln an Vorder- und Hinterläufen fixiert.

Mit einer Schere wurde am Hinterlauf auf einer Strecke von Sprunggelenk bis Mitte des *Femurs* breitflächig die Haut eröffnet. Es folgte die vorsichtige Präparation durch Faszie und Muskulatur bis zum *N. fibularis* / *N. tibialis*. Dieser wurde in seiner Länge bis zum *N. ischiadicus* dargestellt und von umgebendem Bindegewebe befreit. Schließlich wurde der Nerv proximal und distal durchtrennt und dem Operationssitus entnommen.

Nun wurden Proben des *M. flexor digitorum longus* mit dem darüberliegenden Hautabschnitt entnommen.

Für histologische Analysen folgte eine achtestündige Konservierung in vierprozentiger PFA-Lösung (Performaldehyd) im ersten Versuch bzw. Glutardialdehyd 3,9 % mit Phosphatpuffer im dritten Versuch. Im Anschluss daran wurde das Gewebe in PBS-Lösung (engl. *phosphate buffered saline*) umgebettet und kühl gelagert.

Asservierung von Nervengewebe zur molekulargenetischen Analyse

Aus den Abschnitten des *N. tibialis*, in welche intraoperativ Schwann-Zellen injiziert worden waren, wurden kleine Proben herausgeschnitten. Diese wurden unmittelbar auf Trockeneis gebettet und zur späteren Auswertung bei – 80 °C gelagert.

Asservierung von Spinalganglien zur molekulargenetischen Analyse

Das Tier wurde nun in Rückenlage gebracht und median von *Proc. xyphoideus* bis Genitalpapille laparotomiert. Nach radikaler Entfernung aller Organ- und Gefäßsysteme erschloss sich ein freier Blick auf die Rückenmuskulatur. Nun wurde der *N. ischiadicus* von ventral aus aufgesucht und bis zu seinem Ursprung aus L4 - L6 verfolgt. Durch vorsichtiges Ziehen mithilfe zweier anatomischer Pinzetten an den einzelnen Nervenfasern konnten die Hinterstrangganglien (engl. *dorsal root ganglion*) aus dem Spinalkanal geborgen werden. Sie wurden von umgebenden Nervenfasern befreit, zügig auf Trockeneis gelegt und bis zur Weiterverwendung bei – 80 °C gelagert.

Probenaufbereitung

Histologie und Immunhistochemie

Möglichst nahe der Injektionsstelle der Schwann-Zellen wurde eine 0,5 - 0,8 cm messende Probe vorsichtig herausgeschnitten, in *Tissue-Tek®* eingebettet und auf Stickstoff schockgefroren.

Am Kryotom (Kryostat, Leica CM3050) folgte das Einspannen in longitudinaler Position und der Zuschnitt auf 10 µm Dicke.

Verwertbare Schnitte wurden jeweils in Fünferreihen auf Objektträger aufgenommen und bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei – 20 °C gelagert.

Färbeprotokoll

1. Auftragung Primärantikörper

Nach zehnminütiger Fixierung der Schnitte in 4 %iger PFA-Lösung schloss sich eine zweimalige jeweils fünfminütige Auswaschung mit PBS an.

Um eine Bindung des Antikörpers an unspezifische Bindungsstellen zu verhindern, wurden diese durch das Auftragen einer Blocklösung (5 % BSA (engl. *bovine serum albumine*) in 0,1 % Triton) blockiert. Durch das Beifügen von 0,1 % Triton X-100 zu der Blocklösung wurde die Zellwand permeabilisiert; so konnten auch innerhalb der Zellkerne Antigene angefärbt werden.

Nach einstündiger Inkubation der Blocklösung bei Raumtemperatur wurde der Primärantikörper aufgetragen: Je nach Art des Primärantikörpers erfolgte die Titration mit Blocklösung (5 % BSA in 0,1 % Triton) und PBS auf die gewünschte Verdünnung (s. Tabelle 5). Blocklösung und PBS wurden stets zu gleichen Teilen zugegeben. Pro Schnitt wurden 50 µl verwendet.

Der Primärantikörper inkubierte über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Anti-GFP	GFP	Kaninchen	1 : 350	Abcam
Anti-S100	S100	Kaninchen	1 : 500	SIGMA

Tabelle 9: Liste der verwendeten Antikörper

2. Auftragung Sekundärantikörper

Durch dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS wurden zunächst Rückstände des Primärantikörpers entfernt.

Nun wurde der Sekundärantikörper mit PBS in einem Verhältnis von 1 : 500 verdünnt und aufgetragen (s. Tabelle 6). Die Schnitte wurden zur Inkubation für eine Stunde in eine Dunkelkammer gelegt. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift.

Nach erfolgter Antikörperfärbung wurden alle Schnitte mit 1 Tropfen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) beträufelt. DAPI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich in Adenin-Thymin-reichen Regionen der DNA (engl. *desoxyribonucleic acid*) anreichert. Dieser Arbeitsschritt sollte die spätere Auswertung erleichtern, da auf diese Weise Nuclei der Zellen klar abgrenzbar sind. Abschließend erfolgten eine Abdeckung und die Abdichtung der Schnitte durch Ethylacetat.

Die fertigen Proben wurden bei – 20 °C gelagert.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Antigen	Wirt	Verdünnung	Hersteller
Alexa-Fluor 594-gekoppelt	Kaninchen	Ziege	1 : 500	Invitrogen
Alexa-Fluor 488-gekoppelt	Kaninchen	Ziege	1 : 500	Invitrogen

Tabelle 10: Liste der verwendeten Antikörper

Mikroskopische Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Organpräparate wurden durch ein Axioplan 2 *Imaging* Mikroskop mit einer AxioCamHRC-Mikroskopkamera (beides ZEISS, Deutschland) und der Bildbearbeitungssoftware *Axiovision 4.8* ausgewertet. Die Geräteeinstellungen wurden für Präparate der gleichen Färbung immer konstant gehalten.

Semidünnschnitte

Aufbereitung der Proben

Dem operierten Nerv wurden möglichst in der Mitte des *tibialen* Anteils 0,3 - 0,5 cm lange Stücke entnommen und in PBS eingebettet.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben an das *University of Texas Health Science Center at Houston* in Houston, Texas (USA) überstellt.

Ein Teil der Proben wurde im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Aachen aufgearbeitet.

Auswertung der Semidünnschnitte

Die zurückerhaltenen Schnitte wurden über das Mikroskop einzeln abfotografiert.

Mithilfe der Anwendung *CellCounter* der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* wurden alle myelinisierten Axone quantifiziert.

Molekulargenetische Analyse

Zur Untersuchung der Veränderungen auf genexpressiver Ebene wurden Nervenabschnitte und DRGs in mehreren Schritten aufbereitet, so dass eine Quantifizierung der mRNA-*Level* (engl. *messenger ribonucleic acid*) bestimmter Gene über qPCR (quantitative Polymerase Kettenreaktion) möglich war.

Die Protokolle für Neurone und DRGs folgen dem gleichen Schema und unterscheiden sich lediglich in Mengenangaben der hinzuzufügenden Reagenzien, so dass auf eine getrennte Darstellung verzichtet werden kann.

mRNA-Extraktion

Bei dem Umgang mit RNA wurde darauf geachtet, dass der Arbeitsplatz und alle benötigten Materialien nicht mit Ribonukleasen (RNasen) verunreinigt werden. Eine Kontamination mit RNase-haltigen Stoffen führt in der Regel zu einer Anverdauung der RNA durch die Enzyme mit konsekutiver Degeneration der Proben.

Um unerwünschte chemische Reaktionen in den Präparaten zu verlangsamen, wurden sie zwischen allen Arbeitsschritten gekühlt.

Die für die Herstellung benötigten Lösungen wurden mit RNase-freiem ddH₂O DEPC angesetzt.

1. Homogenisierung der RNA

Die Probe (entspricht 1 Nerv/3 DRGs) wurde mit TRIzol® Reagent (700/500 µl) und Chloroform (140/100 µl) vermischt. Durch viermaliges Mixen der Probe für sechs Sekunden mittels eines Homogenisators (Polytron PTO2100, Kinematica AG) wurden alle Organbestandteile zerkleinert und vermischt.

Durch die Zugabe des Chloroforms und Zentrifugierung (15 Minuten bei 13.300 rpm bei 4 °C) des Homogenisates wurden drei Phasen sichtbar: oben eine klare wässrige Schicht, welche die gesuchte RNA enthielt, sodann eine Interphase und zuunterst eine rote trübe Schicht mit DNA und Proteinen. Die farblose, oberste Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues, steriles Tube überführt. Zur Präzipitation der RNA aus der Lösung wurde nun das dreifache Volumen Ethanol zugegeben.

2. Aufreinigung der RNA

Zur weiteren Verarbeitung wurde das *Eluat* in eine *RNeasy Spin* Säule des Qiagen *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) überführt und zentrifugiert (15 Sekunden bei 13.300 rpm bei 4 °C). Durch die vorangegangene Ethanol-Beimischung wurde eine erhöhte Bindungskapazität der mRNA erzielt, so dass diese besser an der Silica-Membran der *RNeasy Spin* Säule haften kann.

Für die Eliminierung unerwünschter Kontamination mit genomischer DNA wurde die RNA-Extraktion um eine DNase-Behandlung mit einem *RNase free DNase Set* (Qiagen) ergänzt. Zunächst wurde die Probe mit RW1-Puffer einmal gewaschen. Dann wurden 10 µl der DNase I Basislösung (1500 Kunitz *units*) mit 70 µl RDD-Puffer vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf der Säule inkubiert. Um alle potentiell gelösten Verunreinigungen zu entfernen, schloss sich nun ein zweimaliger Waschdurchgang mit RPE-Puffer und Zentrifugierung (15 Sekunden und 2 Minuten bei 13.300 rpm) an. Die zweite, längere Zentrifugierung diente zusätzlich dazu, residuelles Ethanol, das spätere Schritte verfälschen könnte, zu entfernen.

Die *RNeasy Spin* Säule wurde nun in ein frisches *Tube* überführt. Für die abschließende Extraktion der RNA aus der Säule wurden 40 µl RNase-freien Wassers (Qiagen) direkt auf die Säulenmembran pipettiert. Durch die anschließende Zentrifugierung (1 Minute bei 13.300 rpm) entstand ein neues, aufgereinigtes *Eluat* von RNA mit RNase-freiem Wasser. Um die Konzentration noch zu erhöhen erfolgte eine erneute Zentrifugierung des *Eluats* ohne weiteres

Zugeben von RNase-freiem Wasser. Die RNA wurde sofort auf Trockeneis gestellt oder bis zur weiteren Verarbeitung bei – 80 °C gelagert.

3. Photometrische Bestimmung und Qualitätsüberprüfung

Für die genaue Bestimmung des RNA-Gehaltes wurde 1 µl der Probe mithilfe des *NanoDrop*® Spectrophotometers und entsprechender Software (ND-1000) photometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte analysiert. Die Konzentrationen wurden bei dem Absorptionsmaximum von RNA (Wellenlänge von 260 nm) bestimmt und in ng/µl angegeben.

Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Zur Detektion etwaiger Proteinkontamination wurden die Absorptionsmaxima von RNA und Proteinen in Verhältnis zueinander gesetzt (s. Abb. 9).

Formel zur Berechnung der Kontamination mit Proteinen

$$\frac{\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l] bei 260 nm}}{\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l] bei 280 nm}} = 1.8 - 2.1$$

Abbildung 9: Formel zur Berechnung der Kontamination mit Proteinen

nm = Nanometer, ng = Nanogramm, µl = Mikroliter

Bei purifizierter RNA beträgt der Quotient etwa 1.8 - 2.1.

cDNA-Synthese

Um einsträngige cDNA (engl. *complementary* bzw. *copy desoxyribonucleic acid*) zu gewinnen, wurde die isolierte mRNA wie folgt weiterverarbeitet:

Alle Proben wurden im Vorfeld mit ddH₂O_{DEPC} auf 200 ng verdünnt, so dass am Ende des Protokolls die jeweils gleiche Konzentration an cDNA pro 20 µl gewährleistet sein konnte. Für die reverse Transkription wurde pro *Sample* der *Mastermix*-Ansatz (*high capacity RT Kit* mit RT-Inhibitor, Applied Biosystems) folgendermaßen zusammengesetzt (s. Tabelle 7):

Tabelle 11: MasterMix-Ansatz für die reverse Transkription

Menge [µl]	Komponente
3,0	Random Primers (Hexamere)
3,0	RT-Buffer
1,2	dNTP
1,5	Reverse Transkriptase
1,5	Inhibitor
Gesamt: 10,2	

Tabelle 11: *MasterMix*-Ansatz für die reverse Transkription

µl = Mikroliter

Zuerst wurden die ersten drei Komponenten miteinander vermischt, danach folgten die Reverse Transkriptase und abschließend der Inhibitor. 10 µl des *Mastermix*-Ansatzes wurden mit der jeweiligen Menge mRNA und ddH₂O_{DEPC} in einem 0,2 ml *Cup* zusammengebracht. Die reverse Transkription erfolgte im *Amplifier* (GeneAmp® PCR System 9700) nach folgendem Temperaturprofil (s. Abb. 10):

Temperaturprofil zur Herstellung der cDNA

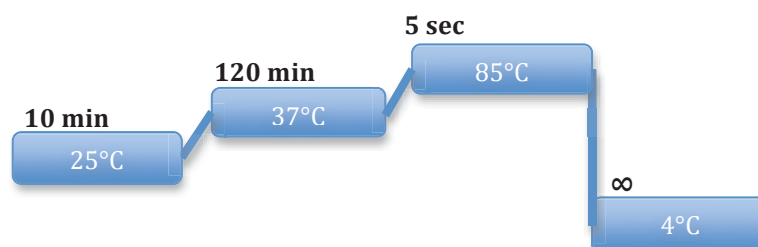


Abbildung 10: Temperaturprofil zur Herstellung der cDNA

min = Minute, sec = Sekunde, °C = Grad Celsius, ∞ = gegen unendlich

Die gewonnene cDNA wurde mit 180 µl ddH₂O_{DEPC} verdünnt und bis zur weiteren Analyse bei – 20 °C gelagert.

Quantitative *Realtime*-PCR

Die so gewonnene cDNA konnte nun für die quantitative Analyse der im Vorfeld isolierten und revers transkribierten mRNA genutzt werden.

Die PCR-Methode ermöglicht die Amplifikation auch kleinster Mengen DNA mittels sequenzspezifischer *Primer*. Nach jedem Amplifikationszyklus wird die Menge des Amplikons photometrisch quantifiziert.

Diese wächst nicht konstant, sondern gliedert sich in verschiedene Phasen. Eine Aussage über die Expressionsaktivität des Gens erfolgt mit Erreichen der Plateauphase der Vervielfachung als sogenannte Endpunktdetektion.

Quantitative *Realtime*-PCR (qPCR) erlaubt im Gegensatz zur konventionellen PCR-Methode eine simultane DNA-Amplifikation und Detektion. Dies wird durch die Sammlung der Daten während der exponentiellen Wachstumsphase der PCR ermöglicht, in welcher die Menge des PCR-Produktes direkt proportional zum Expressionslevel der einzelnen Gene ist.

Die Phase exponentieller Akkumulation des PCR-Produktes ist der Zeitpunkt, zu welchem die präziseste Datenerhebung erfolgen kann, da alle Reagenzien in ausreichender Menge vorhanden sind. Nur während der exponentiellen Wachstumsphase kommt es zu der Herstellung eines Amplikons pro Zyklus (Ginzinger 2002; Biosystems 2012).

Die qPCR wurde mit einem 7900 *HAT Fast Real-Time* PCR System (AppliedBiosystems) durchgeführt. Zur photometrischen Detektion wurde ein *SYBR®Green MasterMix* hinzugefügt. *SYBR®Green* ist ein Farbstoff, der bei Bindung an doppelsträngige DNA (dsDNA) fluoresziert. Die Menge emittierten Lichtes bei bestimmter Wellenlänge kann so als indirekter Messparameter für die Quantität synthetisierter dsDNA herangezogen werden. Durch interne Standardisierung besteht ein Bezugswert für die Emission des *SYBR®Green*/dsDNA-Komplexes, so dass eventuelle Abweichungen in Volumen und Konzentration durch Normierung ausgeglichen werden können.

Der verwendete *SYBR®-Green MasterMix* (Applied Biosystems) enthält neben *SYBR®Green*-Farbstoff zusätzlich DNA Polymerase (AmpliTaQ Gold®), Pufferlösung und Nukleotide mit dUTP anstatt dTTP. Durch Austausch des Nukleotids und AmpErase Uracil-N-Glycosylase(UNG)-Behandlung sollen eventuelle Kontaminationen durch Sequenzen vorangegangener Amplifikationen vermieden werden. Das Enzym hydrolysiert hochspezifisch dUTP-Nukleotide aus möglicherweise vorliegender ssDNA oder dsDNA. So kann diese nicht weiter quantifiziert werden. Auf die zu untersuchende, dTTP-haltige Probe hat dies keinerlei Effekt (Biosystems 2012).

Primer

Folgende *Primer* kamen für die Analyse der Nerven auf genexpressiver Ebene zur Anwendung (s. Tabelle 8):

Tabelle 12: Verzeichnis der verwendeten Primer für die Analyse der nervalen Genexpression via qPCR..

Gen	Primerpaar
NGF	fwd: TTC CAG GCC CAT GGT ACA A rev: GGT GGA TGA GCG CTT GCT
BDNF	fwd: AGG CAC TGG AAC TCG CAA TG rev: AAG GGC CCG AAC ATA CGA TT
GDNF	fwd: ACT TGG GTT TGC ACG AA rev: CAG GAA CCG CTA CAA TAT CGA AA
p57kip2	fwd: CAG GAC GAG AAT CAG GAG CTG A rev: TTG GCG AAG AAG TCG TTC G
GAPDH	fwd: GAA CGG GAA GCT CAC TGG C rev: GCA TGT CAG ATC CAC AAC GG

Tabelle 12: Verzeichnis der verwendeten Primer für die Analyse der nervalen Genexpression via qPCR.

GAPDH wurde als Referenzgen herangezogen. Die Primer stammen von der Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg

fwd = engl. forward (deutsch: vorwärts), rev = engl. reverse (deutsch: rückwärts)

Pro 96-Well Reaction Plate (MicroAmp® Fast Optical Reaction Plate 0.1 ml, AppliedBiosystems) wurden 15 µl SYBR®-Green MasterMix, je 1,8 µl des 5'-Primers und 3'-Primers und 6,4 µl ddH₂O_{DEPC} vermischt, so dass pro Well ein Endvolumen von 25 µl vorlag.

Für alle cDNA-Proben wurden je *Primer* zur Doppelbestimmung zwei Ansätze pipettiert. Des Weiteren wurde pro *Primer* eine Blindprobe (ddH₂O_{DEPC} anstelle der cDNA) in Doppelbestimmung hinzugefügt. Amplifikationen in diesen *Wells* würden auf Kontaminationen hinweisen. Auf jede Platte wurde außerdem GAPDH als *Housekeeping*-Gen aufgetragen. GAPDH wird im Rahmen der im Experiment verwendeten Zelltypen von Zellzyklusphase und externen Einflüssen auf den Organismus unabhängig exprimiert und kann als Referenz in Verhältnis zu den anderen amplifizierten *Primern* gesetzt werden.

Das Amplifikationsstandardprogramm setzte sich wie folgt zusammen (s. Tabelle 9):

Tabelle 13: Amplifikations-Standardprogramm qPCR

Dauer	Temperatur [°C]	Zyklen
10 min	95	1
2 min	50	1
15 sec	95	45
1 min	60	45

Tabelle 13: Amplifikations-Standardprogramm qPCR

min = Minute, sec = Sekunde, °C = Grad Celsius

Statistische Auswertung der qPCR

Die Ergebnisse wurden entsprechend der Delta-Delta-Ct-Methode relativ quantifiziert. Hierbei wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens (engl.: *housekeeping gene*) bezogen und aus den Delta-Ct-Werten beider Gruppen anschließend der Delta-Delta-Ct-Wert gebildet. Um den Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen zu ermitteln wird dieser Wert anschließend in die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ eingesetzt. Zur Berechnung der Signifikanz wurden der T-Test für zwei Stichproben bzw. der Multiway ANOVA-Test für mehrere Stichproben verwendet. Ein Signifikanzniveau von < 0.05 wurde als statistisch signifikant definiert.

3. Ergebnisse

1. Transplantierte Schwann-Zellen besitzen einen positiven Einfluss auf elektrophysiologische Parameter axonaler Regeneration

Das Ausmaß der axonalen Regeneration nach Konnektion des proximalen *N. fibularis*-Anteiles mit dem distalen *Tibialis*stumpf und simultaner Schwann-Zell-Transplantation wurde mit Hilfe der Elektroneurographie untersucht. Die Größe des distalen MSAP erlaubt hierbei einen Rückschluss auf die Anzahl regenerierender Axone.

Es wurden zunächst drei Gruppen untereinander verglichen. In Gruppe 1 erfolgte eine Injektion von postnatalen P(0)-Schwann-Zellen in das proximale Segment des *N. tibialis*, in Gruppe 2 in das distale Segment, und Gruppe 3 diente als Kontrollgruppe (Injektion von Medium in das proximale Segment).

In allen drei Gruppen konnte im Zeitraum von acht Wochen eine Zunahme der MSAP beobachtet werden. Die MSAP waren ab Woche drei signifikant ($p < 0,05$) größer in der Gruppe, in der postnatale (P0)-Schwann-Zellen im proximalen Abschnitt transplantiert wurden. Die übrigen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (s. Abb. 11). Zwischen Axonen mit distalem Transplantationsort der postnatalen (P0)-Schwann-Zellen und denen der Kontrollgruppe besteht kein statistisch belegbarer Unterschied.

Mittelwerte der distalen MSAP des *N. tibialis* über einen Zeitraum von acht Wochen nach der Nervenadaptation.

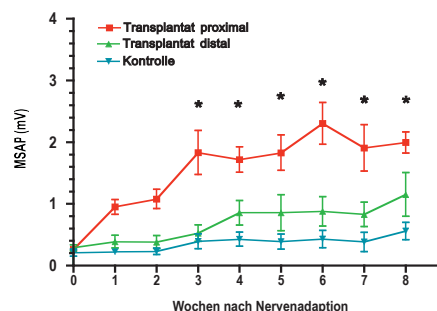


Abbildung 11: Mittelwerte der distalen MSAP des *N. tibialis* über einen Zeitraum von acht Wochen nach der Nervenadaptation. Tiere, welchen proximal allogene Schwann-Zellen appliziert worden waren, zeigen ab der dritten Woche signifikant höhere MSAPs als die Kontrolltiere. Tiere nach einer Behandlung mit distal applizierten allogenen Schwann-Zellen zeigen kein signifikant höheres MSAP als die Kontrolltiere.

(* = $p < 0,05$, Anova-Test, Graph Pad Prism-Programm)

mV = Millivolt, MSAP = Muskelsummenaktionspotential

2. Die Transplantation von autologen Schwann-Zellen verstärkt den positiven Einfluss auf die Elektrophysiologie

In einer zweiten Versuchsrunde wurden zwei Gruppen miteinander verglichen. Gruppe 1 erhielt eine Transplantation autologer Schwann-Zellen in den proximalen Anteil des *N. tibialis*. Gruppe zwei diente als Kontrollgruppe und erhielt eine Injektion von Medium, ebenfalls in den proximalen Abschnitt. Ab der vierten Woche nach Nervenadaptation lassen sich signifikant höhere MSAP als in der Kontrollgruppe erfassen (s. Abb. 12,13,14). In Woche acht erreicht das MSAP einen höheren Wert (4,75 mV; STABW des MW (Mittlerwertes): 0,971) als nach Transplantation der postnatalen (P0)-Schwann-Zellen in der ersten Versuchsrunde (2,00 mV; STABW des MW: 0,543) (s. Abb. 15).

Mittelwert des distalen MSAP des *N. tibialis* im Zeitraum von acht Wochen nach Nervenadaptation und autologer Schwann-Zell-Transplantation

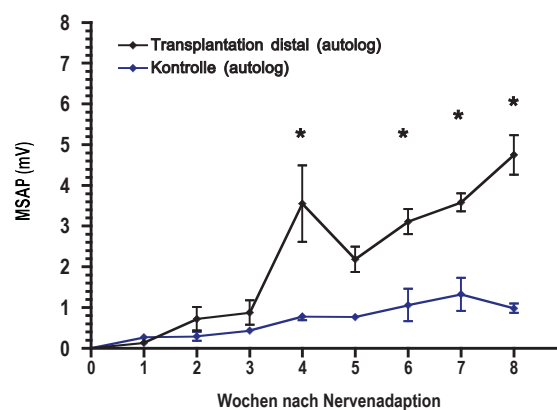


Abbildung 12: Mittelwert des distalen MSAP des *N. tibialis* im Zeitraum von acht Wochen nach Nervenadaptation. Tiere, die mit autolog transplantierten Schwann-Zellen behandelt wurden, zeigten statistisch signifikant höhere MSAP als die Kontrolltiere (* = $p < 0,05$, Anova-Test, *Graph Pad Prism*-Programm).

mV = Millivolt, MSAP = Muskelsummenaktionspotential

MSAPs des *N. tibialis* vor der Diskonnektion

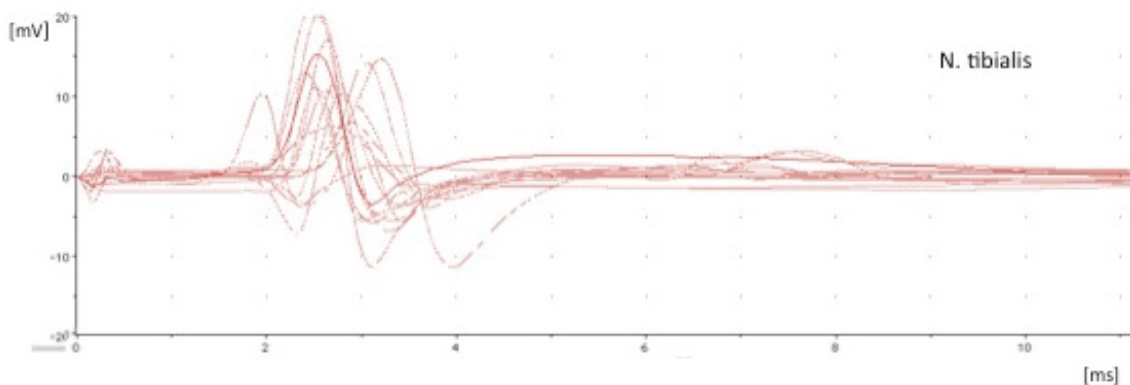


Abbildung 13: MSAPs des *N. tibialis* vor der Diskonnektion; individuelle MSAPs (gestrichelte Linien) und ein Summen-MSAP (durchgezogene Linie)

mV = Millivolt, ms = Millisekunde

MSAPs acht Wochen nach der Rekonnektion

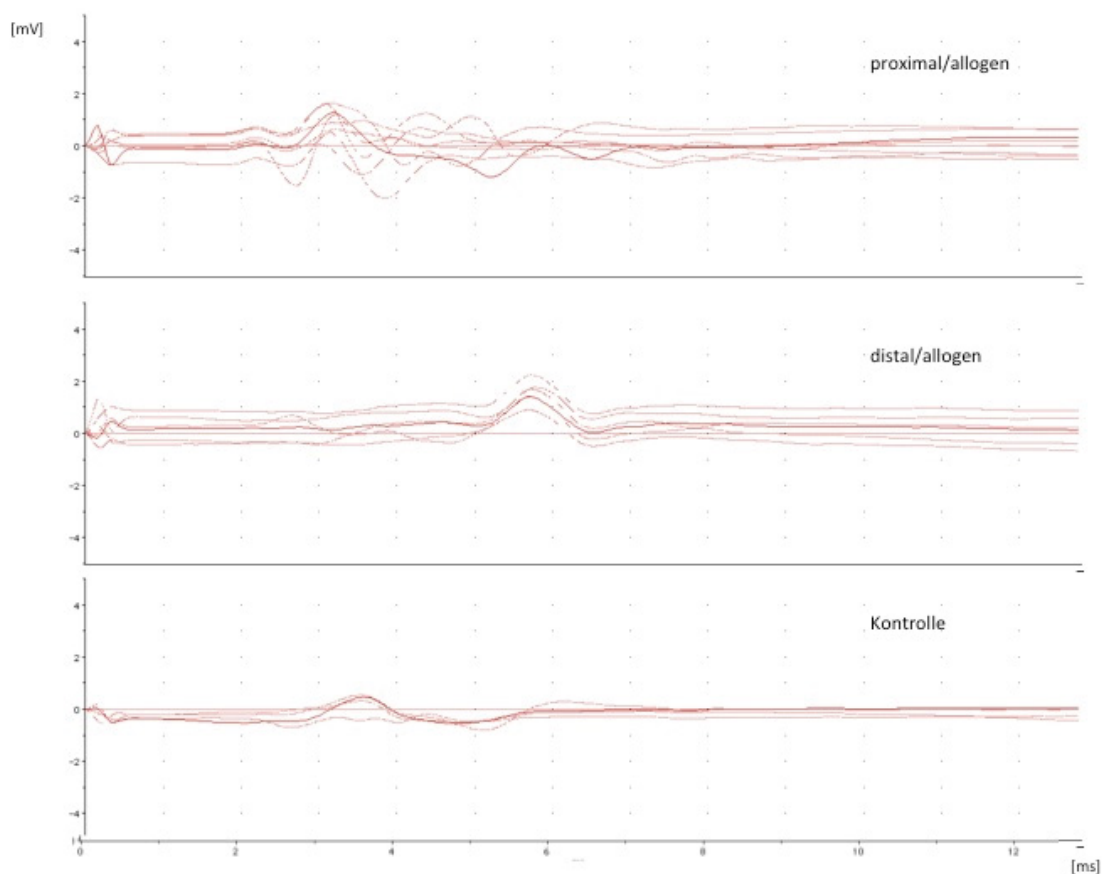


Abbildung 14: MSAPs acht Wochen nach der Rekonnektion. Einzelne (gestrichelte) MSAPs und deren Summe als durchgezogene Linie. Die Amplituden der proximal/allogenen Gruppe zeigen den höchsten Ausschlag, das Kollektiv "distal/allogen" höhere Amplituden als die Kontrolle.

mV = Millivolt, ms = Millisekunde

Vergleich der MSAPs der Kollektive "proximal/autolog" mit der Kontrolle acht Wochen nach der Rekonnektion

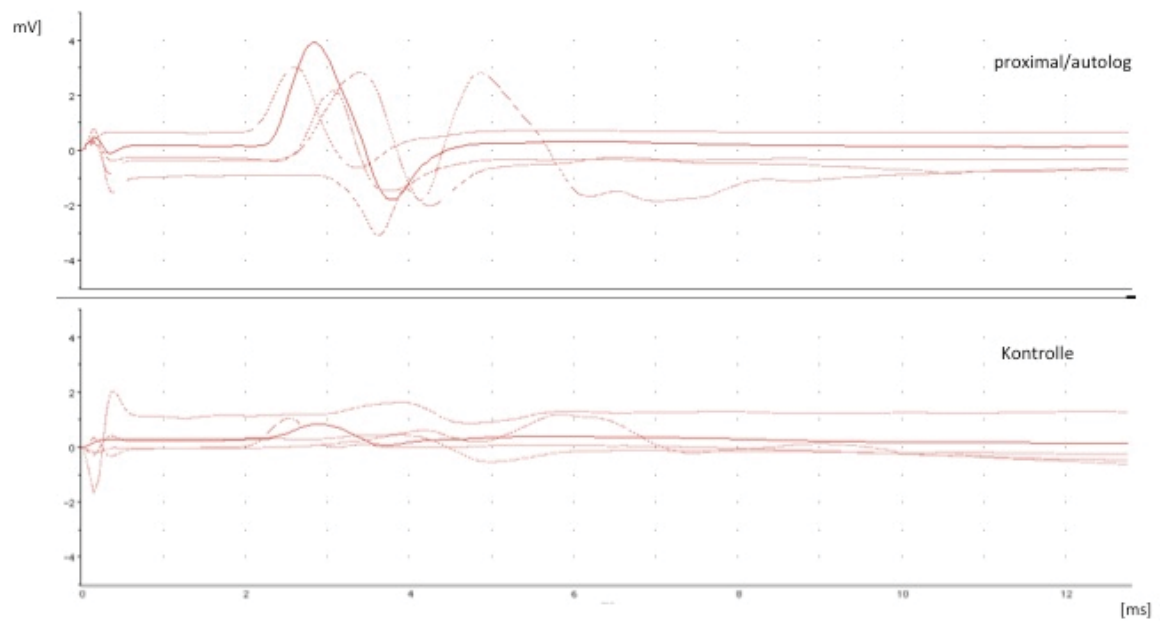


Abbildung 15: Vergleich der MSAPs der Kollektive "proximal/autolog" mit der Kontrolle acht Wochen nach der Rekonnektion. Einzelne (gestrichelte) MSAPs und deren Summe als durchgezogene Linie.

mV = Millivolt, ms = Millisekunde

3. Die quantitative Analyse der Axone korreliert mit den Ergebnissen der Elektrophysiologie

Die angefertigten Semidünnschnitte ermöglichten die direkte Quantifizierung myelinisierter Axone im Präparat (s. Abb. 16,17).

Die myelinisierten Axone je Präparat wurden mit Hilfe der *ImageJ*-Bildbearbeitungssoftware gezählt und pro Kollektiv der Mittelwert (MW) gebildet.

Nach einer proximalen Transplantation von postnatalen P(0)-Schwann-Zellen finden sich statistisch signifikant mehr myelinisierte Axone als in der Kontrollgruppe

Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Semidünnschnitte des *N. tibialis*

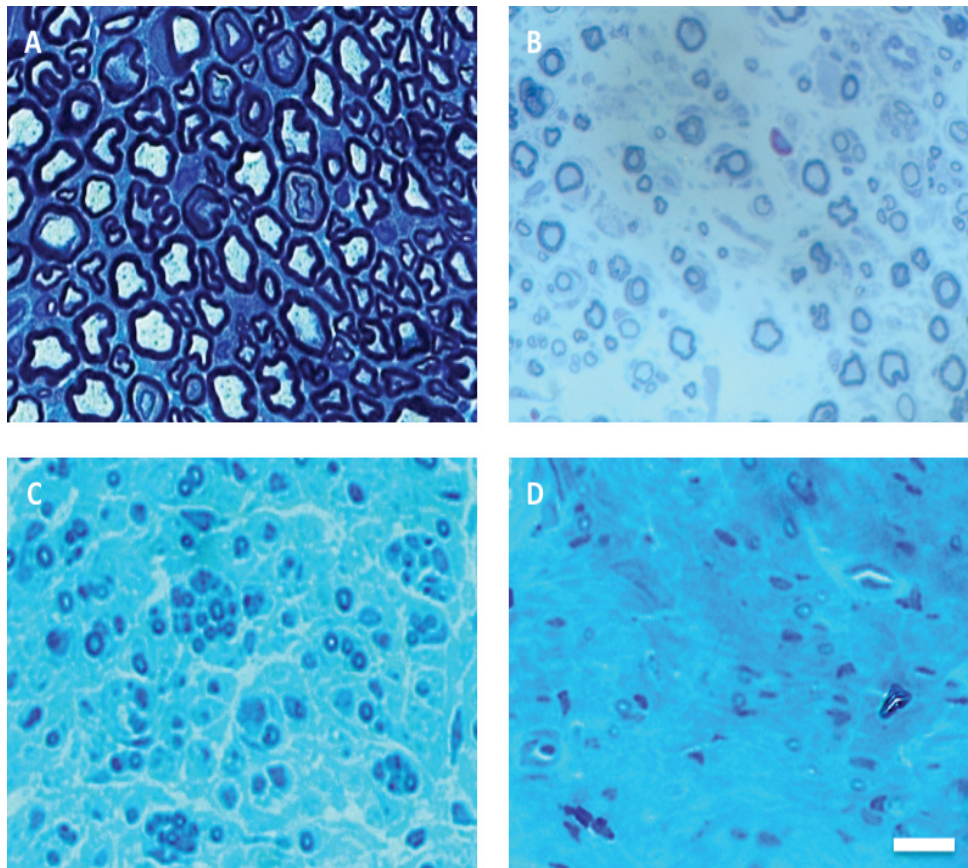


Abbildung 16: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahme der Semidünnschnitte des *N. tibialis* (A) unbehandelter *N. tibialis* (B) Schwann-Zell-Transplantation proximal (C) Schwann-Zell-Transplantation distal (D) Kontrolle (Medium). (A) demonstriert die normale Morphologie eines *N. tibialis* mit zahlreichen, gut myelinisierten Axonen. In (B) lassen sich mäßig viele Axone mit geringerer Myelinisierung erkennen. (C) zeigt Axone mit geringem Durchmesser, die sich in typischer Weise zu Regenerationskonglomeraten anordnen. Die Myelinschicht imponiert dünn. Die Kontrollgruppe (D) bildet nur vereinzelte, karg myelinisierte Axone ab, im Parenchym befindet sich hauptsächlich Bindegewebe. (Vergrößerung 400-fach) Messbalken = 20 μm

Im Kollektiv mit proximaler (P0)-Schwann-Zell-Transplantation konnte im Mittel die höchste Anzahl von Axonen (MW = 1140) festgestellt werden, darauf folgten das Kollektiv mit distaler (P0)-Schwann-Zell-Transplantation (MW = 1086) und die Kontrollgruppe (MW = 285).

Statistisch konnten signifikant ($p < 0,01$) mehr myelinisierte Axone im Kollektiv mit proximaler (P0)-Schwann-Zell-Transplantation gegenüber der Kontrollgruppe ermittelt werden (s. Abb. 17).

Die anderen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant.

Anzahl der myelinisierten Axone im Vergleich

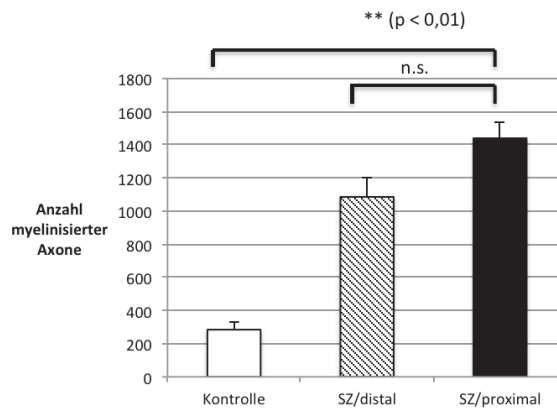


Abbildung 17: Anzahl der myelinisierten Axone im Vergleich. Signifikant ($p < 0,01$) mehr myelinisierte Axone im Kollektiv mit proximaler Transplantation der postnatalen P(0)-Schwann-Zellen (MW = 1440; STABW = +/- 93) im Vergleich zur Kontrollgruppe (MW 285; STABW = +/- 46) (** = hochsignifikant, Dunn's Multiple Comparison Test). Die Kontrollgruppe und das Kollektiv mit distaler Transplantation der postnatalen P(0)-Schwann-Zellen (MW = 1086 STABW = +/- 119) zeigen keinen signifikanten Unterschied (n. s. = nicht signifikant, Dunn's Multiple Comparison Test), SZ = Schwann-Zelle

Nach einer Transplantation von autologen Schwann-Zellen finden sich statistisch signifikant mehr myelinisierte Axone als in der Kontrollgruppe

Im zweiten Versuchsdurchgang konnte eine signifikant höhere Anzahl ($p < 0,05$) von Axonen im Kollektiv der autologen, proximalen Schwann-Zell-Transplantation im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe festgestellt werden (s. Abb. 18,19).

Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Semidünnschnitte des *N. tibialis*

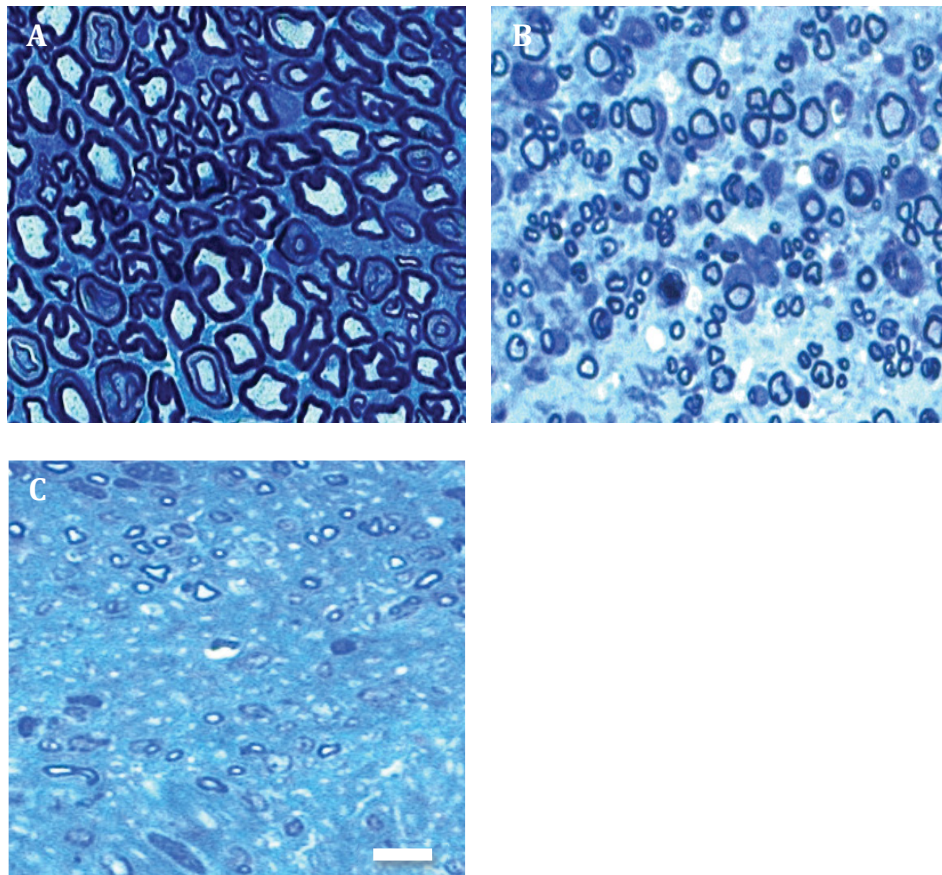


Abbildung 18: Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der Semidünnschnitte des *N. tibialis* (A) unbehandelter *N. tibialis* (B) *N. tibialis* mit autologer Schwann-Zell-Transplantation (C) Kontrolle (A) veranschaulicht die Morphologie eines intakten, unbehandelten Nerven. Die dichtgepackten, wohl-myelinisierten Axone sind deutlich erkennbar. (B) zeigt einen *N. tibialis* nach autologer Schwann-Zell-Transplantation: Die Axone besitzen einen geringeren Durchmesser und eine dünnere Myelinschicht. Die Kontrollgruppe (C) weist nur vereinzelte myelinisierte Axone auf. (400-fache Vergrößerung)

Messbalken = 20 μm

Anzahl der myelinisierten Axone nach der Kreuznaht.

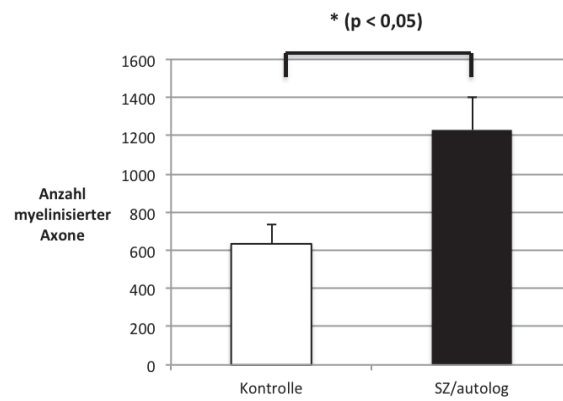


Abbildung 19: Anzahl der myelinisierten Axone nach der Kreuznaht. Das Kollektiv mit autologer Schwann-Zell-Transplantation (MW 1232, STABW = +/- 173) enthält signifikant mehr myelinisierte Axone als das der Kontrollgruppe (MW = 634, STABW +/- 99) (* = $p < 0,05$, *unpaired test*) SZ = Schwann-Zelle

5. Die Viabilität der injizierten Schwann-Zellen im Modell des chronisch denervierten Nerven ist limitiert

Die Schwann-Zellen wurden zunächst in-vitro aufgereinigt, vermehrt und transfiziert (s. Abb. 20) und dann im Rahmen der Rekonnektion in den *N. tibialis* injiziert.

In-vitro Aufnahmen der Schwann-Zellen

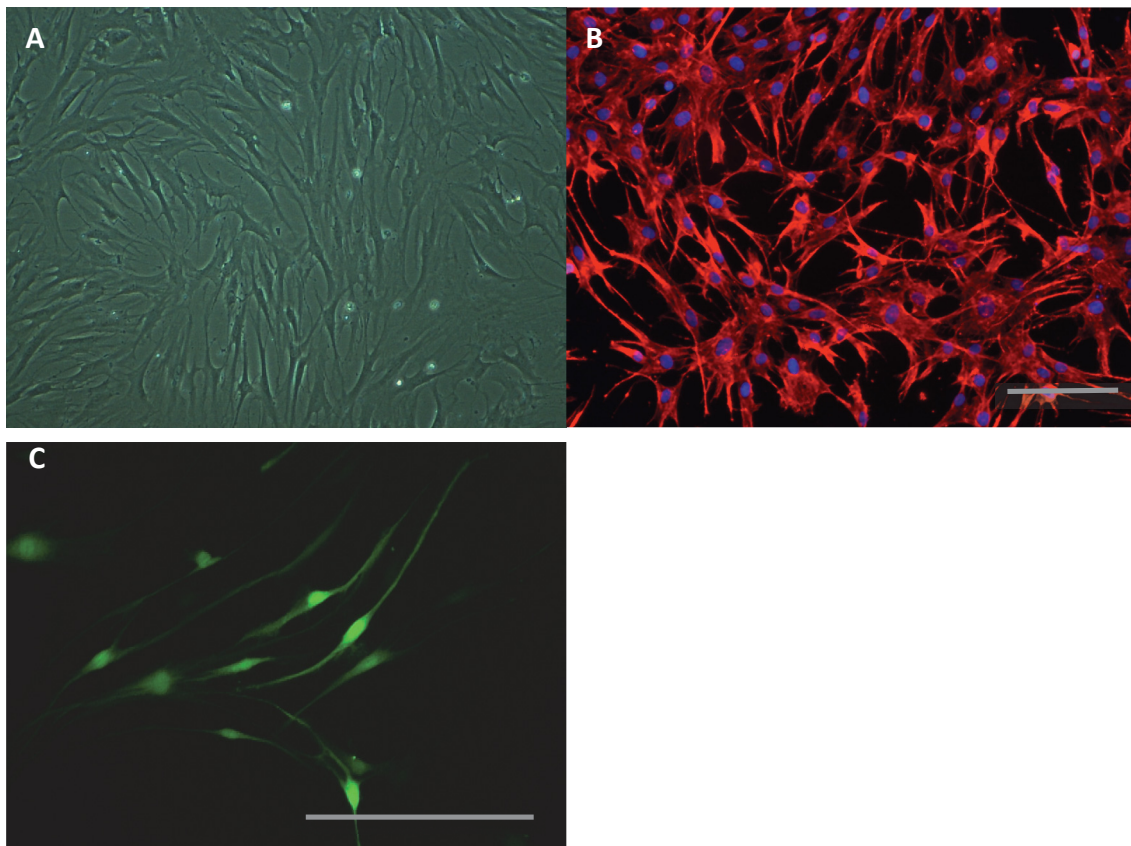


Abbildung 20: *In-vitro* Aufnahmen der Schwann-Zellen (A) stellt die Phasenkontrast-Ablichtung der autologen Schwann-Zellen mit vereinzelten Fibroblasten dar (100-fache Vergrößerung) (B) zeigt die immunocytochemische Färbung der Zellen aus (A) (100-fache Vergrößerung) (C) zeigt die Fluoreszenz der GFP-transfizierten, postnatalen Schwann-Zellen (200-fache Vergrößerung) Messbalken = 200 µm

Quelle: Dr. Andre Heinen, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

In Präparaten der ersten Versuchsreihe lag zwischen der Applikation der Schwann-Zellen und der Asservierung der Präparate ein Zeitraum von acht Wochen. In den angefärbten histologischen Schnittbildern ließen sich die GFP-markierten Schwann-Zellen nur noch vereinzelt nachweisen (s. Abb. 21).

In 14 Tagen nach der Transplantation angefertigten Nervenschnitten lassen sich deutlich die transplantierten Schwann-Zellen detektieren. Zur besseren Visualisierung wurden die Schnitte mit GFP- und S100-Antikörpern angefärbt.

Des Weiteren deutet alles darauf hin, dass die injizierten Schwann-Zellen sich nicht dauerhaft in das Nervengewebe integrieren, sondern nur für eine begrenzte Zeitspanne dort zu finden sind.

Immunhistochemische Färbungen der Schwann-Zellen

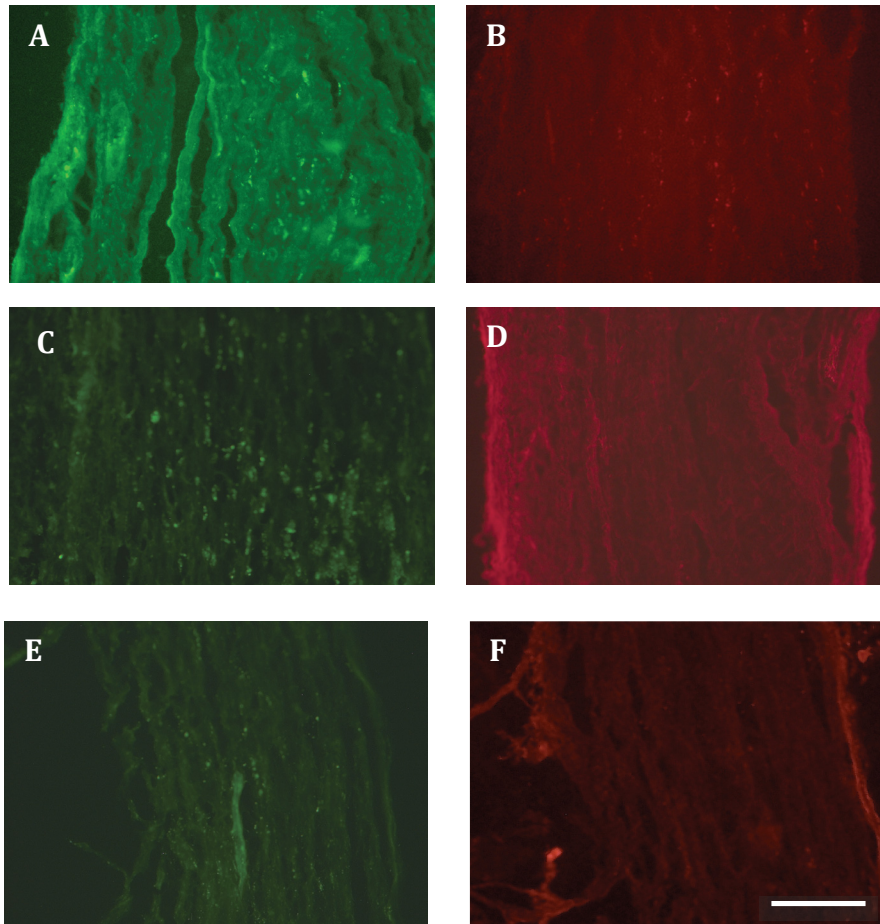


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbungen der Schwann-Zellen (A) Anfärbung der Antikörper gegen GFP (B) Anfärbung durch S100 (C,E) Ablichtung der Eigenfluoreszenz (D,F) stellen die Negativkontrollen dar (200-fache Vergrößerung) Messbalken = 20 μm

6. Expression von Neurotrophinen nach Schwann-Zell-Transplantation

In weiteren Experimenten wurde untersucht, inwieweit die Transplantation von Schwann-Zellen zu einer Änderung der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren in Schwann-Zellen und Neuronen führt. Faktoren, die hierbei untersucht wurden, waren BDNF (engl. *brain derived neurotrophic factor*), NGF (engl. *nerve growth factor*) und GDNF (engl. *glial cell-line derived neurotrophic factor*).

BDNF-Expression

Acht Wochen nach Transplantation postnataler (P0)-Schwann-Zellen wurde eine höhere Menge an BDNF-Transkript als in der Kontrollgruppe gemessen, jedoch ohne Signifikanz (T-Test = 0,78) (s. Abb. 22).

Nach einem Zeitraum von zwei Wochen zwischen P(0)-Schwann-Zell-Transplantation und Probenasservierung konnte dieser Trend ebenfalls beobachtet werden (T-Test = 0,39).

Acht Wochen nach autologer Schwann-Zell-Transplantation wird weniger BDNF exprimiert (T-Test = 0,19) als in dem Kontrollkollektiv.

Mittelwerte der BDNF-Expressionsmenge nach Schwann-Zell-Transplantation

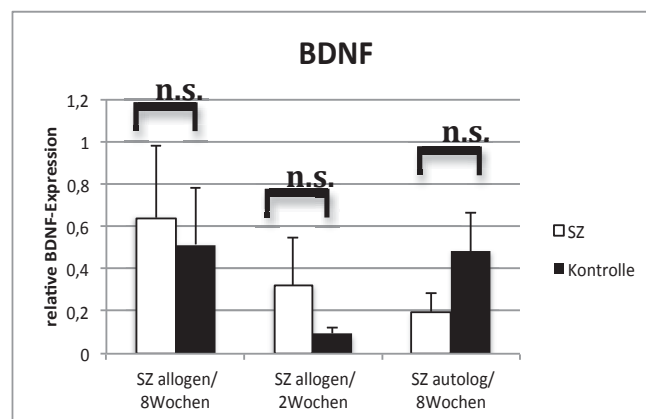


Abbildung 22: Mittelwerte der BDNF-Expressionsmenge nach Schwann-Zell-Transplantation. Acht Wochen nach allogener Schwann-Zell-Applikation (MW: 0,360; STABW des MW: 0,33) zeigt sich eine höhere BDNF-Expression als in der Kontrolle (MW: 0,515; STABW des MW: 0,269). Nach zwei Wochen lässt sich ebenfalls eine vermehrte Expression in der Interventionsgruppe (MW: 0,322; STABW des MW: 0,227) gegenüber der Kontrolle (MW: 0,093; STABW des MW: 0,029) erkennen. Acht Wochen nach autologer Schwann-Zell-Applikation ergibt sich eine geringere BDNF-Expression (MW: 0,198; STABW des MW: 0,091) als bei der Kontrolle (MW: 0,483; STABW des MW: 0,183) (n. s. = nicht signifikant) SZ = Schwann-Zelle

NGF

Acht Wochen nach Transplantation der postnatalen (P0)-Schwann-Zellen steigt die NGF-Expression gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant an (T-Test = 0,154; *Dunn's Multiple Comparison Test* $p > 0,05$).

Bei zweiwöchiger Regenerationsphase vor Konservierung der Proben wurde im Kontrollkollektiv ein statistisch nicht signifikant höherer Anstieg als in der mit Schwann-Zellen präparierten Gruppe erfasst (T-Test = 0,641; *Dunn's Multiple Comparison Test* $p > 0,05$).

Nach autologer Transplantation zeigt sich analog zum BDNF-Expressionsmuster eine geringer ausgeprägte NGF-Expression als in der Kontrollgruppe ohne statistische Signifikanz (T-Test = 0,181, *Dunn's Multiple Comparison Test* $p > 0,05$).

Mittelwerte der NGF-Expressionsmenge nach Schwann-Zell-Transplantation

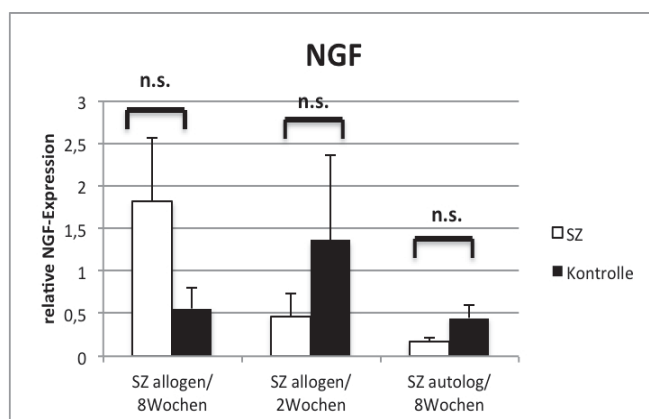


Abbildung 23: Mittelwerte der NGF-Expressionsmenge nach Schwann-Zell-Transplantation. Acht Wochen nach allogener (P0)-Schwann-Zell-Applikation wird mehr NGF exprimiert (MW=1,81; STABW des MW: 0,840) als in der Kontrollgruppe (MW: 0,56; STABW des MW: 0,253). Nach zwei Wochen findet sich weniger NGF-Expression in Individuen mit Zustand nach (P0)-Schwann-Zell-Applikation (MW: 0,474; STABW des MW: 0,254) als in der Kontrolle (MW: 0,690; STABW des MW: 0,368). Acht Wochen nach autologer Schwann-Zell-Applikation wird weniger NGF exprimiert (MW: 0,164; STABW des MW: 0,053) als im Vergleich zur Kontrolle (MW: 0,451; STABW des MW: 0,161). (n. s. = nicht signifikant, T-Test) SZ = Schwann-Zelle

GDNF

Acht Wochen nach allogener Schwann-Zell-Transplantation zeigt sich in der Interventionsgruppe eine vermehrte Expression von GDNF (s. Abb. 24). Der Unterschied zu der Kontrollgruppe ist nicht signifikant (T-Test = 0,690; Dunn's Multiple Comparison Test: $p > 0,05$). Zwei Wochen nach allogener Transplantation von (P0)-Schwann-Zellen erkennt man eine statistisch nicht signifikant höhere Transkriptmenge von GDNF als im Kontrollkollektiv (T-Test = 0,261; *Dunn's Multiple Comparison Test*: $p > 0,05$).

Acht Wochen nach autologer Schwann-Zell-Transplantation weist die Interventionsgruppe eine verminderte, nicht signifikante, GDNF-Expression im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf (T-Test = 0,008 ; *Dunn's multiple Comparison Test*: $p > 0,05$).

Mittelwerte der GDNF-Expressionsmenge nach Schwann-Zell-Transplantation

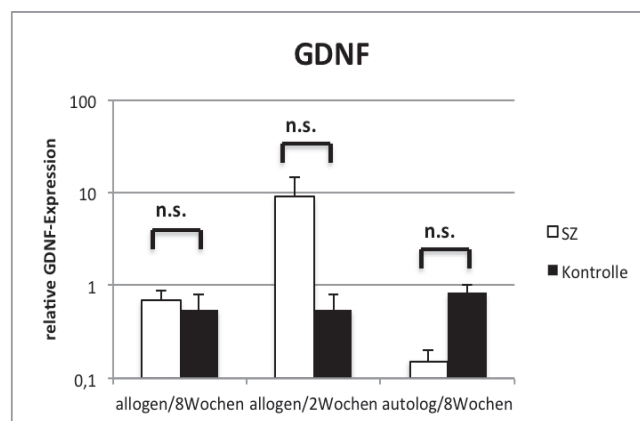


Abbildung 24: Mittelwerte der GDNF-Expressionsmenge nach Schwann-Zell-Transplantation. Acht Wochen nach allogener Schwann-Zell-Applikation wird vermehrt GDNF gebildet (MW=0,6835; STABW des MW: 0,186) als in der Kontrollgruppe (MW: 0,546; STABW des MW: 0,256). Nach zwei Wochen findet sich eine erhöhte GDNF-Expression in Individuen mit Zustand nach Schwann-Zell-Applikation (MW: 8,880; STABW des MW: 6,036) als in der Kontrolle (MW: 0,548; STABW des MW: 0,266). Acht Wochen nach autologer Schwann-Zell-Applikation wird weniger GDNF exprimiert (MW: 0,154; STABW des MW: 0,045) im Vergleich zur Kontrolle (MW:0,826; STABW des MW: 0,175). (n. s. nicht signifikant, T-Test) SZ = Schwann-Zelle

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Transplantation von Schwann-Zellen zu einer verbesserten Regeneration von chronisch denervierten Nerven führen kann. Dabei ließen sich folgende Ergebnisse feststellen:

1. Werden im Rahmen dieses Modells Schwann-Zellen intraoperativ transplantiert, zeigt sich nach elektrophysiologischen und morphologischen Kriterien eine deutliche Verbesserung der axonalen Regeneration im Vergleich zu der Kontrollgruppe.
2. Werden im Vorfeld entnommene autologe Schwann-Zellen transplantiert, können diese Effekte weiter verstärkt werden.

Während sich Axone des zentralen Nervensystems (ZNS) nach einer Verletzung von Neuronen nur unvollständig erholen, besitzen Axone des peripheren Nervensystems (PNS) grundsätzlich die Fähigkeit zur kompletten funktionellen Rekonstitution (David 1981; Horner 2000; Stoll 2002). Um eine erfolgreiche Reinnervation der Zielorgane (und eine damit einhergehende funktionelle Erholung) zu gewährleisten, ist die Wiederherstellung von axonaler Integrität und Myelinisierung essentiell. Nach Verletzungen des PNS und ZNS sind diese Mechanismen oft gestört, was in der Folge zu einer bleibenden Behinderung führen kann.

Interventionen, welche den Prozess axonaler Regeneration unterstützen, stellen somit einen wichtigen Ansatzpunkt der Forschung dar. Ziel soll langfristig sein, Therapieoptionen zu etablieren und die funktionelle Erholung von Patienten zu verbessern.

Modell der chronischen Denervierung

Um axonale Regeneration im PNS zu untersuchen, steht eine Reihe von Tiermodellen zur Verfügung.

Auf Modellebene lassen sich drei Punkte finden, an welchen Regeneration stattfinden muss, um eine zufriedenstellende Erholung zu erreichen:

1. der proximale Anteil des Axons muss wieder die Verbindung zum Zielorgan erhalten;
2. der denervierte distale Stumpf inklusive Nervenscheide mit denervierten Schwann-Zellen muss wieder Anschluss an frisch aussprossende Axone erlangen;
3. der atrophierte Muskel muss reinnerviert werden.

Ein Nachteil vieler Tiermodelle zur axonalen Regeneration besteht darin, dass positive Ergebnisse bislang nur unzureichend auf den Menschen übertragen werden können (Höke 2006). Bei den Modellen wie *Ischiadicus-Transsektion* oder *nerve crush* im Nagetier müssen die Nerven nur über eine kurze Strecke regenerieren. Auch wachsen periphere Axone von Nagetieren mit einer Geschwindigkeit von 1 bis 3 mm pro Tag deutlich schneller als die von Menschen (etwa 1 mm pro Tag) (Guttmann 1942; Sunderland 1947). Da im menschlichen Organismus distale Nervensegmente erheblich länger ohne axonalen Kontakt bleiben und das Axon über deutlich längere Zeit ohne Kontakt zu seiner Zielstruktur bleibt, spiegeln diese Modelle nur unzureichend die Situation beim Menschen wider.

Mit dem hier modifizierten Tiermodell der „prolongierten Denervierung“ wird diese beim Menschen andersartige Situation adäquater simuliert (Fu 1995). In diesem Modell der prolongierten Denervierung wird zunächst der *M. tibialis anterior* mittels Durchtrennung des *N. fibularis communis* über bestimmte Zeiträume denerviert. In einem zweiten Schritt wird der *N. tibialis* durchtrennt und unmittelbar im Anschluss durch eine Kreuznaht mit dem chronisch denervierten distalen Stumpf des *N. fibularis communis* verbunden. Das spezifische Einwachsen eines frisch regenerierenden proximalen Axons in einen über längere Zeit denervierten Nervenstumpf soll so möglichst realitätsnah dargestellt werden.

Nach prolongierter Denervierung des Nervenstumpfes kommt es zu einer unvollständigen Regeneration von Axonen, die in den distalen Stumpf einwachsen. Sulaiman und Mitarbeiter verglichen die durchschnittliche Anzahl regenerierender sensibler und motorischer Axone nach einer Denervierung von vier Wochen und einer prolongierten Denervierung von zwölf Wochen. Nach einem relativ kurzen Denervierungszeitraum von bis zu vier Wochen finden sich etwa 5200 sensible und motorische Axone im distalen Nervenstumpf und damit kein signifikanter Unterschied zu der Anzahl von Axonen eines intakten Nervs (die mit etwa 3800 angegeben wurde). Die im Vergleich zum gesunden Nerv sogar höhere Anzahl von Axonen lässt sich durch das Aussprossen mehrerer Axone aus einem regenerierenden Axon erklären. Nach einer Denervierung von zwölf Wochen finden sich nur noch etwa 2500 Axone im distalen Nervenstumpf, und damit signifikant weniger regenerierende Axone im distalen Nervenstumpf als in einem intakten Nerv (Sulaiman 2000). Ursächlich hierfür ist eine Atrophie der Schwann-Zellen (Fu 1995). Darüber hinaus kommt es auch zu einer Atrophie von Muskelfasern, die nicht komplett reversibel ist (Irintchev 1990). Nach dem Modell der prolongierten Denervierung erholen sich Nerv und Zielmuskel viel schlechter, als dies bei Modellen wie der prolongierten

Axotomie der Fall ist. So nimmt z. B. nach prolongierter Denervierung der Anteil regenerierender Axone drastisch ab, so dass nach einem Zeitraum von sechs Monaten weniger als 50% der Muskelfasern noch innerviert werden. Nach prolongierter Axotomie kommt es im Gegensatz dazu zwar auch zu einer verminderten Anzahl der regenerierenden Axone, dieser Verlust kann jedoch durch die Bildung größerer motorischer Einheiten kompensiert werden. Dadurch bleibt die Anzahl innervierter Muskelfasern nach einem Zeitraum von einem Tag, drei Monaten und sechs Monaten konstant (Fu 1995).

Dass die intraneurale Transplantation von Schwann-Zellen eine verbesserte axonale Regeneration ermöglicht, wurde bereits an anderen Modellen peripherer Nervenverletzungen untersucht. So ist z. B. das Einsetzen synthetisch hergestellter oder aus Biomaterial bestehender Nerven-*Conduits*, die mit Schwann-Zellen bepflanzt sind, eine etablierte Methode (Wang 2001; Xu 2003; Hood 2009). Diese *Conduits* sollen als eine Art Schienung den Defekt zwischen proximalem und distalem Nervenabschnitt überbrücken. Gleichzeitig dienen sie als Reservoir der Schwann-Zellen, die sich von dort aus auf die durchtrennten Nervenabschnitte verteilen und die Regeneration unterstützen sollen. Abhängig von der Dichte der Schwann-Zellen auf den *Conduits* konnten Guénard und Mitarbeiter drei Wochen nach der Transplantation bis zu doppelt so viele regenerierende Axone feststellen, als bei Nerven mit *Conduits*, die nicht mit Schwann-Zellen beimpft wurden (Guénard 1992). Nach einer Transsektion in einem weiter proximal gelegenen peripheren Nervenabschnitt (*N. ischiadicus*) führt die alleinige intraneurale Injektion von Schwann-Zellen zu keiner verbesserten axonalen Regeneration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Exprimieren die transplantierten Schwann-Zellen jedoch zusätzlich den Wachstumsfaktor NGF (engl. *nerve growth factor*), können bis zu zweifach so viele regenerierende Motoneurone detektiert werden (Guénard 1992; Fansa 2004; Fox 2005; Hood 2009; Shakhbazov und Verhaagen 2012).

Auch in dem hier untersuchten Modell der chronischen Denervierung wurde die Transplantation verschiedener Zelltypen versucht: Nach einer dreimonatigen Denervierung des *N. tibialis* injizierten Walsh und Mitarbeiter Schwann-Zellen, die aus Stammzellen der Haut gewonnen wurden (engl. *skin-derived precursor cells derived Schwann Cells*), in den distalen Nervenstumpf und vernähten diesen mit dem frisch durchtrennten *N. fibularis communis*. Zehn Wochen nach der Zelltransplantation konnte eine durchschnittliche Anzahl von 191 Axonen nachgewiesen werden, die in den distalen Stumpf eingewachsen waren, während sich in der Kontrollgruppe lediglich etwa 30 Motoneurone anfärben ließen (Walsh 2010). In einer anderen Studie wurden sechs Monate nach chronischer

Denervierung neuronale Stammzellen in immunsupprimierte Ratten transplantiert. Es zeigte sich, dass mehr Axone in den Nervenstumpf einsprossen, und mittels der Elektroneurographie konnten deutlich höhere Muskelsummenaktionspotentiale (MSAPs) nachgewiesen werden (Heine 2004). Tomita und Mitarbeiter applizierten aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen (engl. *differentiated adipose-derived Stem Cells*) acht Wochen nach chronischer Denervierung. Auch hier zeigte sich eine deutlich verbesserte Regeneration als in der Kontrollgruppe (Heine 2004; Tomita 2012). Um das Ausmaß der Regeneration festzustellen, wurden jeweils Parameter untersucht, die auch in der vorliegenden Arbeit zur Analyse herangezogen wurden. U.a. wurden Semidünnschnitte des distalen Nervenstumpfes angefertigt und die Reinnervation des Muskels durch Ableitung der MSAPs gemessen.

Obwohl die Ergebnisse mit bereits ausdifferenzierten Schwann-Zellen in anderen Modellen einen Erfolg versprechenden Ansatz bieten, wurden sie bis jetzt nur wenig ausführlich in diesem Rahmen der chronischen Denervierung untersucht. Die invasive Gewinnung autologer Schwann-Zellen, die relativ lange Kultivierung und die limitierte Vermehrung werden als Gründe genannt, weshalb in den angeführten Arbeiten vorrangig nicht mit genuinen Schwann-Zellen gearbeitet wurde (Nishiura 2004; Walsh 2010; Tomita 2012), sondern bevorzugt Stammzellen verwendet wurden. Stammzellen können sich ständig selbst erneuern und in andere Zellen weiter differenzieren. Diese Fähigkeiten bergen jedoch einige Risiken, denn bei undifferenzierten oder nicht vollständig differenzierten Zellen besteht die Möglichkeit, dass sie sich in Tumoren oder einen nicht erwünschten Zelltyp umwandeln (Erdö 2003; De Filippis 2012; Bellenchi 2013). So untersuchte zum Beispiel eine Arbeitsgruppe das Auftreten eines Tumors nach der Transplantation von humanen fetalen Stammzellen: Einem Patienten mit *Ataxia teleangiectasia*, einer vererbten Systemerkrankung mit neurodegenerativer Komponente, wurden humane fetale Stammzellen intracerebellar und intrathekal injiziert. Vier Jahre nach der Stammzell-Transplantation wurden am Rückenmark multifokal wachsende Tumoren aus glialen und neuronalen Zellen festgestellt. Nach Vergleichen der Chromosomen, Gene und Proteine sowie der Bestimmung von HL-Antigenen (engl. *human leukocyte*) zwischen einer Probe des Tumors und peripheren Blutzellen des Patienten zeigte sich, dass der Tumor mit hoher Wahrscheinlichkeit von den transplantierten Zellen abstammt (Amariglio 2009). Des Weiteren gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, Stammzellen zu gewinnen bzw. herzustellen. Die Art der Herstellung bzw. Gewinnung scheint jedoch unterschiedliche Effekte auf das Immunsystem des

Wirtsgewebes zu haben: Embryonale Stammzellen, die aus Embryonen einer spezifischen Mäuselinie gewonnen werden und in adulte Mäuse derselben Linie implantiert werden, können sich ohne eine Reaktion des Immunsystems vermehren. Werden dagegen aus Mäusen einer Linie Zellen entnommen, diese zu induzierten Stammzellen weiterverarbeitet und im Anschluss reimplantiert, wird eine Immunreaktion ausgelöst, die ausgedehnte Gewebedefekte zur Folge haben kann (Zhao 2011).

Da die optimalen Voraussetzungen eines solchen Therapieansatzes im PNS bisher unbekannt sind, wurden in der vorliegenden Studie Schwann-Zellen benutzt, um das Verhalten, die Integration und die Überlebensdauer frisch applizierter Schwann-Zellen in einem chronisch denervierten Nerven bestmöglich zu verstehen (Hood 2009). Eine verfrühte klinische Anwendung von Zelltransplantaten im Bereich des Nervensystems kann zu enttäuschenden Ergebnissen führen. So wurden z.B. bei der Transplantation retinaler Pigmentzellen in das Gehirn von Parkinsonpatienten keinerlei nachweisbare Verbesserungen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden (Cenci 2011).

Elektrophysiologische Parameter und Semidünnschnitte als Maßstäbe für Regeneration

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der transplantierten Schwann-Zellen auf die Regeneration der peripheren Axone mittels Neurographie und morphologischen Untersuchungen an Semidünnschnitten objektiviert.

Die Neurographie ist eine etablierte Untersuchungsmethode, um die Funktion peripherer Nerven zu überprüfen. Sie wird sowohl am Patienten als auch bei tierexperimentellen Untersuchungen angewandt (Vleggeert-Lankamp 2004; Hughes 2005; Hui 2005). Die Amplitude der MSAP erlaubt einen Rückschluss auf die Anzahl regenerierender Axone und wird in einigen Studien als der präziseste Parameter angesehen (Werdin 2009). Die Erstellung von Semidünnschnitten ist der Goldstandard, um die Anzahl von Axonen, die in den distalen Nervenstumpf eingewachsen sind, und ihre Myelinisierung zu erfassen (Bélanger 2011). In den Semidünnschnitten ist jedoch nicht die Gesamtheit aller Axone abgebildet, da periphere Nerven markhaltige und marklose Nervenbündel enthalten. Nur die myelinisierten Axone sind in den Semidünnschnitten zuverlässig darstellbar, die quantitative Erfassung von nicht-myelinisierten Fasern erfolgt durch Elektronenmikroskopie. Da der von uns untersuchte distale Nervenstumpf dem sensorisch und motorisch gemischten *N. tibialis* entstammt, können also nur Aussagen über die myelinisierten Axone getroffen werden.

Mithilfe der Neurographie konnten signifikant höhere Amplituden der MSAPs in den Interventionsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. In den Interventionsgruppen erhöhte sich die Amplitude des *M. tibialis posterior* acht Wochen nach der Operation auf etwa 2 mV (allogene Schwann-Zellen) bzw. 4,75 mV (autologe Schwann-Zellen). Die Kontrollgruppen erreichten Werte von ca. 0,6 mV (allogene Schwann-Zellen) und ca. 1 mV (autologe Schwann-Zellen). Sowohl nach allogener als auch nach autologer Transplantation zeigten sich eine signifikant höhere Anzahl myelinisierter Axone und weniger Bindegewebe in den Semidünnschnitten als in den Kontrollgruppen.

Bei den Ergebnissen der Neurographie ähnlicher Studien weichen die Ableitungsorte bzw. zeitlichen Endpunkte für die Messungen teilweise von denen der vorliegenden Arbeit ab, was die Vergleichbarkeit einschränkt. Dennoch korreliert das distale MSAP motorischer Nerven von Kleintieren mit dem Ausmaß der Reinnervation in die Muskulatur in den entsprechenden Tiermodellen: Walsh und Mitarbeiter leiteten zehn Wochen nach der Transplantation von Schwann-Zellen, die aus Stammzellen der Haut gewonnen wurden, MSAPs des *M. gastrocnemius* ab. Sie erhielten ebenfalls signifikant höhere Amplituden in der Interventionsgruppe (ca. 8 mV) als in der Kontrollgruppe (ca. 3 mV). Es ließen sich ebenfalls signifikant mehr myelinisierte Axone in der morphometrischen Analytik nachweisen (Walsh 2010).

Analog erreichten Nerven, in die aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen injiziert wurden, nach zehn Wochen Amplituden mit einem durchschnittlichen Anteil von 63,4 % der MSAPs des gesunden kontralateralen *M. tibialis anterior*. Die Gruppe, welcher autologe Schwann-Zellen transplantiert wurden, erreichte 56,1 % der kontralateralen MSAPs, während in der Kontrollgruppe nur eine Amplitude von durchschnittlich 34,9 % ermittelt wurde. Auf morphometrischer Ebene ließ sich keine wesentliche Verbesserung der axonalen Regeneration belegen, da keine signifikant höhere Anzahl von Axonen zu verzeichnen war (Tomita 2012). Heine und Mitarbeiter konnten nach der Transplantation von neuronalen Stammzellen ebenso einen Anstieg der MSAPs verzeichnen. Allerdings gelang ihnen erst nach neun Wochen der Nachweis eines messbaren Aktionspotentials. Die Gruppe mit externen neuronalen Stammzellen, welche zusätzlich GDNF überexprimieren, erreichte dabei die höchsten Werte. Zehn Wochen nach der Transplantation lag das MSAP der plantaren Fußmuskeln bei ca. 1 mV, sechzehn Wochen *post operationem* bei ca. 2 mV.

Die Interventionsgruppen besaßen hier doppelt so viele myelinisierte Axone als die Kontrollgruppe (Heine 2004).

In der vorliegenden Arbeit korreliert die Neurographie in Form von MSAPs nicht absolut mit der Zahl myelinisierter Axone in der Morphometrie. Dies beruht darauf, dass eine enge Beziehung zwischen Faserdichte und Amplitude des MSAPs besteht (Bischoff 2011). Dennoch beweist die Anzahl von Axonen im distalen Nervenstumpf nicht notwendigerweise eine verbesserte axonale Regeneration: Aitken et al. demonstrierten, dass jedes proximale Axon bis zu zwanzig regenerative Axone in den distalen Nervenstumpf aussprossen lassen kann (Aitken 1947). Nachdem die aussprossenden Axone ihr Zielinnervationsgebiet erreicht haben, reduziert sich diese Anzahl wieder, allerdings kann dieser Prozess bis zu zwei Jahre in Anspruch nehmen (Mackinnon 1991). Dieses Phänomen des axonalen *Sproutings* ist durch sog. *Regenerationscluster* zu erkennen. Vor allem in den Semidünnschnitten der von uns untersuchten allogenen Schwann-Zell Gruppe sind diese vermehrt detektierbar. Die Axone der autologen Schwann-Zell Gruppe besitzen durchschnittlich einen größeren Durchmesser als die der Kontrollgruppen. Dies weist auf eine gewisse „Reife“ dieser Axone im Gegensatz zu der Kontrollgruppe hin (Walsh 2010).

Ein weiterer Grund könnte sein, dass MSAPs nur Ableitungen motorischer Fasern darstellen. Sensible, myelinisierte Fasern wurden jedoch in den Semidünnschnitten ebenfalls mitgezählt, da sie sich nicht von den motorischen differenzieren lassen.

Die Quantität myelinisierter Axone spiegelt folglich nicht automatisch die Qualität der Regeneration wider (Gordon 2009). Die Analyse von Semidünnschnitten sollte dementsprechend nur in Verbindung mit anderen Messinstrumenten, z. B. der Elektroneurographie, angewendet werden. Ohne diese Ergänzung lässt sich nicht endgültig zwischen axonalem *Sprouting* und dem Einwachsen mehrerer Axone in den distalen Stumpf differenzieren. Nichtsdestotrotz stellt auch das axonale *Sprouting* einen Prozess im Zuge der Regeneration dar.

Der Anstieg der bei der Neurographie erhobenen Werte verlief nicht kontinuierlich linear, sondern zeigte vereinzelte Ausreißer im Verlauf der wöchentlichen Messungen. Diese hohe Streubreite ist charakteristisch für diese Art der Messmethode und findet sich bei systematischen Untersuchungen zur Elektroneurographie bei Ratten wieder (Korte 2011). Ursache dafür können kleine Hämatome sein, die sich nach der Nadelsetzung ausbilden. Durch konsekutive Schwellungen entfernen sich die Nerven weiter von der Elektrode, was zu einer nicht maximalen Reizung führen kann und so falsch niedrige Werte vortäuscht

(Bischoff 2011). Obwohl die Messbedingungen wie Temperatur, Ableitungsort, Tageszeit und Untersucher konstant gehalten wurden, kann hier eine unerkannte Beeinflussung nicht ausgeschlossen werden (Vogel 2006). Nicht zuletzt unterliegen auch die Versuchstiere intraindividuellen Schwankungen während des Heilungsprozesses.

In der Kontrollgruppe der zweiten Versuchsrunde liegt die finale Amplitudenhöhe um ca. 0.3 mV höher als in der ersten Kontrollgruppe. Diese geringfügige Steigerung ist am ehesten mit der größeren Routine zu erklären, mit der die komplexe Operation im zweiten Durchgang durchgeführt wurde. Dieser Faktor wird auch bei dem besseren Abschneiden der autologen Schwann-Zellen in der zweiten Versuchsrunde eine Rolle gespielt haben. Hier liegt allerdings die Differenz der finalen Amplitudenhöhen von autologem und allogenen Kollektiv bei ca. 2.8 mV. Der Unterschied zwischen beiden Interventionsgruppen ist folglich so prägnant, dass er nicht als eine lediglich der operativen Praxis geschuldeten Ursache abgetan werden darf.

Schwann-Zellen

Problematisch bei der axonalen Regeneration im peripheren Nervensystem des Menschen ist der Umstand, dass axonale Regeneration insbesondere bei proximalen Läsionen über einen sehr langen Zeitraum und eine sehr lange Distanz vonstatten geht. Mögliche Ansätze, um die Regeneration zu verbessern, beinhalten die

- I) Beschleunigung des axonalen Wachstums oder
- II) die Schaffung eines proregenerativen Milieus innerhalb chronisch denervierter Nervensegmente.

Das axonale Wachstum lässt sich z. B. durch die Gabe von FK506, einem Immunophilin-Liganden, beschleunigen (Lyons 1994; Costantini 2000).

Im Rahmen einer prolongierten axonalen Schädigung atrophieren Schwann-Zellen, wenn sie über längere Zeit den Kontakt zu Axonen verloren haben. Diese Mechanismen treffen sowohl für menschliche als auch tierexperimentelle Regeneration zu (Terenghi 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass intraneural transplantierte Schwann-Zellen einen positiven Effekt auf die Regeneration ausüben. Vor allem in der frühen postoperativen Phase scheinen sie einen entsprechenden Einfluss zu besitzen. Die günstige Wirkung hält über die Verweildauer der Schwann-Zellen hinaus an.

Verweildauer der Zellen

In vitro kultivierte Schwann-Zellen bzw. aus Stammzellen gewonnen Schwann-Zellen sind in der Lage, nach einer Transplantation in einen peripheren Nerven über einen längeren Zeitraum zu überleben und teilweise regenerierende Axone zu myelinisieren (Walsh 2012). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass transplantierte postnatale P(0)-Schwann-Zellen nach 14 Tagen nur noch vereinzelt in distalen Nervensegmenten nachweisbar waren, während nach acht Wochen keine von den initial etwa 800.000 transplantierten Schwann-Zellen mehr detektierbar waren. Daraus kann geschlossen werden, dass in dem hier benutzten Modell transplantierte Schwann-Zellen nur für einen kurzen Zeitraum überleben. Sie differenzieren nicht etwa in myelinisierende Schwann-Zellen, um so über einen längeren Zeitraum Regeneration zu fördern. Kompatibel mit den eigenen Befunden konnten Guérout und Mitarbeiter zeigen, dass bereits zwei Wochen nach der Transplantation von GFP-markierten glialen Zellen, die vom *N. olfaktorius* gewonnen werden (engl. *olfactory ensheathing cells*), im Rahmen einer *Tibialis*resektion keine Zellen mehr detektiert werden können (Guérout 2011). Auch Heine und Mitarbeiter berichten, dass vier Monate, nachdem dermale Stammzellen in den distalen Stumpf des *N. tibialis* injiziert worden waren, lediglich 0,5 – 1 % der Zellen noch aufgefunden wurden (Heine 2004). Nach einer chronischen Denervierung überleben sogar deutlich weniger Zellen als nach einer Transsektion: Zwei Wochen nach chronischer Denervierung fanden sich 5,8 % aller transplantierten dermalen Vorläuferzellen wieder. Wurde eine Transsektion durchgeführt, konnten 10,5 % der Zellen aufgefunden werden (Walsh 2011). Im Gegensatz zu diesen Befunden berichten Tomita und Mitarbeiter, dass sowohl aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen als auch adulte allogene Schwann-Zellen noch zehn Wochen nach der Transplantation nachweisbar sind und teilweise regenerierende Axone myelinisieren (Tomita 2011; Tomita 2012).

Boost durch Schwann-Zellen

Trotz dieser offenbar kurzen Überlebenszeit der transplantierten Schwann-Zellen, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung mit ähnlichen Arbeiten eine deutliche Verbesserung motorischer Funktionen nach Schwann-Zell-Transplantation. Daraus kann geschlossen werden, dass die verbesserte Regeneration nicht primär davon abhängig ist, wie lange die transplantierten Zellen im distalen Nervensegment verbleiben. Hierfür sprechen auch der Ort der Zelltransplantation und sein Zusammenhang mit dem Ausmaß der axonalen Regeneration: Postnatale P(0)-Schwann-Zellen wurden im ersten Versuchsdurchlauf an verschiedenen Stellen im denervierten distalen Nervensegment

appliziert: unmittelbar proximal der Konnektion und weiter distal davon. Nerven, die einer proximalen Transplantation unterzogen wurden, zeigten bessere elektrophysiologische Ergebnisse und mehr myelinisierte Axone als die mit distaler Transplantation. Diese Ergebnisse unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Die beste funktionelle Erholung wird erlangt, wenn die axonalen Nervensprosse den distalen Nervenstumpf zu dem Zeitpunkt erreichen, in dem dort die optimalen Voraussetzungen zum Wachstum vorhanden sind (Fu 1997). Setzt man nun die begründete Annahme voraus, dass der größte Effekt der transplantierten Zellen in den ersten Tagen erzielt wird, scheint die Beobachtung plausibel: Proximal transplantierte Zellen haben deutlich früher den Kontakt zum einsprossenden Axon.

Die transplantierten Schwann-Zellen scheinen im Sinne eines *Triggers* Wachstumsprozesse in den ersten Tagen zu unterstützen und ein besonders regenerationsfreundliches Milieu zu generieren. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde in Folgeexperimenten die Expression von Neurotrophinen untersucht. Nach einer Nervenverletzung schütten das axotomierte Neuron und die denervierten Schwann-Zellen zunächst zahlreiche Neurotrophine aus. Die Neurotrophine des distalen Stumpfes diffundieren in das Zentrum der Verletzung, um dort ein wachstumsförderndes Milieu für das von proximal einsprossende Axon zu generieren (Reynolds 1993). Erlangt das Axon Kontakt zu den Schwann-Zellen, kommt es zu einer zweiten Phase der Schwann-Zell-Proliferation mit erneuter Sekretion von Wachstumsfaktoren.

Ist der distale Stumpf jedoch über einen längeren Zeitraum denerviert, atrophieren die Schwann-Zellen, und verbleibende Schwann-Zellen desensibilisieren gegenüber Wachstumsfaktoren (Terenghi 1998). Es besteht folglich ein zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Absinken der Sekretion von Wachstumsfaktoren und der Fähigkeit von Schwann-Zellen, regenerierende Axone zu unterstützen.

Im Folgenden wurden die Wachstumsfaktoren BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*), GDNF (engl. *glial cell-derived neurotrophic factor*) und NGF (engl. *nerve growth factor*) untersucht, da diese die in der Literatur etabliertesten Neurotrophine für neuronale Regeneration darstellen (Höke 2002; Heine 2004; Gordon 2009).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch die Transplantation postnataler Schwann-Zellen vermehrt Neurotrophine exprimiert werden würden. Es zeigte sich jedoch, dass zwei Wochen nach der Transplantation kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden konnte. Dieses könnte durch folgende Umstände begründet sein:

1. Die Gruppengrößen waren zu gering, um eine statistische Signifikanz zu erreichen.

Andere Autoren beschreiben für Auswertungen auf genexpressiver Ebene mindestens fünf Individuen pro Kollektiv (Boyd 2003; Walsh 2010; Shakhbazau und Verhaagen 2012). Diese Anzahl konnte nicht in allen Teilgruppen erreichen werden, denn nach Asservierung der Proben entsprachen einige Exemplare nicht den festgelegten Qualitätsmerkmalen. Um ein zuverlässiges Ergebnis gewährleisten zu können, wurden diese von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Daher sollten bei zukünftigen Experimenten die Aufreinigungsschritte weiter optimiert werden.

2. Schwann-Zellen folgen nach einer Verletzung einer zeitlichen Abfolge, in welcher sie Neurotrophine exprimieren.

Nach einem *sciatic nerve crush* können zwei Wochen nach der Denervierung eindeutige Steigerungen in der NGF-Expression belegt werden (Meyer 1992; Frostick 1998). A. Shakhbazau und Mitarbeiter beschreiben den Einfluss von verschiedenen Operationstechniken auf die NGF-Expression. So scheinen sogar Interventionen am kontralateralen Nerven die NGF-Expression im analysierten, sonst in keiner Weise vorbehandelten Nerven zu verändern (Shakhbazau 2012). Langfristige Veränderungen in der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren während einer chronischen Denervierung wurden bisher nur sporadisch untersucht. Einige Studien implizieren, dass der distal denervierte Nervenstumpf noch bis zu sechs Monate nach der Nervenläsion Wachstumsfaktoren produziert. Andere Studien können diese Ergebnisse nicht bestätigen (Michalski 2008; Gordon 2009).

Neurotrophine besitzen ein spezifisches Zeitfenster, in welchem sie nach einer Nervenverletzung vermehrt exprimiert werden (Gillen 1997). Vor allem BDNF und sein Rezeptor *trkB* und GDNF mit seinen Rezeptoren *ret* und *FGR-α* werden neben NGF nach einer Nervenverletzung vermehrt exprimiert. Dies geschieht in einem streng limitierten Zeitraum: Das BDNF-Level beginnt etwa am fünften Tag nach der Nervendurchtrennung zu steigen, um den 12. Tag übersteigt es die Basisexpression. Sein Maximum erreicht es nach dreißig Tagen, bis zum sechzigsten Tag fällt die Produktion wieder unter die Basisexpression (Gordon 2009). Die Expression der Rezeptoren steigt sehr früh an und zeigt ein langsames Absinken.

GDNF gilt als potenter Wachstumsfaktor für Motoneurone (Kriegelstein 1998). GDNF steigt ab dem dritten Tag nach einer Verletzung steil an, erreicht um den fünften Tag sein Maximum und nimmt dann zügig ab, bis es um den 15. Tag wieder unter die Basisexpression fällt. Die Rezeptoren werden ebenfalls früh hochreguliert, sinken aber

deutlich langsamer (Gordon 2009). Somit kann man davon ausgehen, dass acht Wochen nach Denervierung des distalen Nervenstumpfes kaum noch eine endogene Produktion von Wachstumsfaktoren stattfindet. Auch wenn die denervierten Schwann-Zellen Anschluss zu einem frisch durchtrennten Axon bekommen, regulieren sie ihre GDNF-Produktion nicht mehr hoch (Höke 2002). Dies deckt sich mit Beobachtungen dieser Arbeit, dass GDNF zwei Wochen nach der Transplantation postnataler Schwann-Zellen stärker transkribiert wird als in der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied zeigte jedoch keine Signifikanz. Guérout und Mitarbeiter, die sich auf die Transplantation von glialen Zellen des *N. olfaktorius* konzentrierten, kamen zu einem ähnlichen Ergebnis: Zwei Wochen nach Transplantation stieg die GDNF-Konzentration in der Interventionsgruppe, jedoch ebenfalls nicht signifikant (Guérout 2011). In den vorliegenden Experimenten gibt es acht Wochen nach der Transplantation kaum einen Unterschied in der GDNF-Expression zwischen Interventions- und Kontrollgruppe. Ein ähnliches Muster zeigte die BDNF-Expression, auch hier ohne statistische Signifikanz. Acht Wochen nach der Transplantation autologer Schwann-Zellen zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede mehr. Dies stimmt mit PCR-Ergebnissen von Guérout und Mitarbeitern überein: Auch sie konnten neunzig Tage nach Operation keine positiven Ergebnisse für NGF, BDNF oder GDNF detektieren. Vorausgesetzt, die frisch transplantierten Schwann-Zellen folgen dem Sekretionsmuster ortsständiger, denervierter Schwann-Zellen, sollte die Bestimmung von Wachstumsfaktoren also zu anderen Zeitpunkten erfolgen: für GDNF etwa um den fünften Tag, die höchste BDNF-Sekretion ist um den dreißigsten Tag zu erwarten (Gordon 2009).

3. Neben den drei genannten spielten für die funktionelle Regeneration andere Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle.

Der Transkriptionsfaktor c-Jun wird vor allem am denervierten Nervenstumpf nach einer Verletzung stark hochreguliert. Dies scheint notwendig für die weitere Expression von Wachstumsfaktoren zu sein. Es steht in enger Wechselwirkung mit NGF und kann durch TNF- α aktiviert werden (Stewart 1995; Cámara-Lemarroy 2010). Schwann-Zellen, die Motoaxone umhüllen, regulieren neben GDNF p75 stark herauf. Sensible Schwann-Zellen zeigen ein noch komplexeres Expressionsmuster, u.a. VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*), HGF (engl. *hepatocyte growth factor*) und IGF-1 (engl. *Insulin-like growth factor-1*) (Höke 2006). Da der im vorliegenden Experiment denervierte N. tibialis einen gemischt sensibel/motorischen Nerv darstellt, kann nicht endgültig geklärt werden, welche Heraufregulierung von Faktoren bzw. welche Kombinationen derselben ausschlaggebend ist.

4. Die PCR ist eine semiquantitative Analyse auf mRNA-Ebene. Die Menge tatsächlich exprimierter Proteine kann hierdurch nicht erfasst werden. Diese kann jedoch auf verschiedenen Ebenen nachhaltig beeinflusst werden:

Proneurotrophine, die unreifen Vorstufen der Neurotrophine, zeigen nach neuen Erkenntnissen ebenfalls biologische Aktivität. Diese steht z.T. im Gegensatz zu den Wirkungen ihrer biologisch potenteren Nachfolger. So zeigt Pro-NGF, wenn es an p75NTR (engl. *p75 neurotrophin receptor*) bindet, proapoptotische Effekte auf Neurone *in vitro* (Lee R. 2001). Andererseits besitzen aktivierte p75NTRs einen günstigen Einfluss auf regenerative Prozesse nach einer Läsion des Rückenmarks. Interessanterweise zeigt sich hier besonders im Bereich der funktionellen Regeneration ein signifikant verbessertes outcome, wenn p75NTR vorhanden ist (Chu 2007). Der Einfluss auf Verletzungen des peripheren Nervensystems ist noch nicht geklärt. Da Proneurotrophine von Proteasen zu Neurotrophinen verkürzt werden, besitzt die Proteasenaktivität jedoch in jedem Fall einen maßgeblichen Einfluss auf die Relation von Proneurotrophin zu Neurotrophin.

Auf der Ebene der Neurotrophin/Rezeptor-Komplexe gibt es ebenfalls verschiedene Möglichkeiten, das Ausmaß der Signalkaskade zu verändern: Alle Neurotrophine sind in der Lage an p75NTR zu binden, des Weiteren bindet jedes einzelne an seinen spezifischen Trk-Rezeptor (engl. *tropomyosin-related kinase*) (Reichardt 2006). Die Rezeptoren stehen in gegenseitiger Wechselbeziehung: Ist p75NTR vorhanden, potenziert es die Wirkung von NGF auf den TrkA-Rezeptor, selbst dann, wenn NGF nur in geringen Mengen vorhanden ist (Davies 1993; Mahadeo 1994).

Darüber hinaus sind Neurotrophine in der Lage, an verschiedene andere Rezeptoren zu binden, sie fungieren also nicht ausschließlich als spezifischer Ligand eines Rezeptors. Trk-Rezeptoren werden durch Spleißen ihrer mRNA in Isoformen unterteilt. Diese unterscheiden sich in der Affinität zu ihrem Liganden und akzeptieren weitere Neurotrophine als zusätzliche Liganden. Die prozentuale Verteilung der Isoformen in einem Gewebe kann die Wirkung der ausgeschütteten Neurotrophine beeinflussen: So bindet eine Isoform des TrkA-Rezeptors neben seinem Hauptliganden NGF zusätzlich NT-3 (Neurotrophin 3). Diese Isoform bindet nicht nur deutlich affiner NT-3, sondern wird durch konsekutive vermehrte Autophosphorylierung erheblich stärker aktiviert (Clary 1994). Für den TrkB-Rezeptor, dem BDNF als Hauptligand zugeordnet wird, existieren ähnliche Erkenntnisse (Strohmaier 1996). Andere, sog. *non-kinase* Isoformen von TrkB bzw. TrkC können einen gegenteiligen Effekt erzielen: Sie verhindern eine effektive Dimerisierung kinasehaltiger Trk-Rezeptoren und schmälern auf diese Weise die

Antwort auf das von Neurotrophinen gegebene Signal (Eide 1996). Es gibt Hinweise, dass bestimmte Isoformen nach einer Nervenverletzung vermehrt gebildet werden als andere. Folglich kann die gleiche Menge eines Neurotrophins unterschiedliche Effekte auf die Zelle ausüben. Dies ist vom Anteil der entsprechenden Isoformen in der Zelle abhängig und davon, inwiefern die Signalweiterleitung zusätzlich *getriggert* oder gehemmt wird.

Autologe und allogene Zellreihen im Vergleich

In zwei Versuchsreihen wurden zwei Arten von Schwann-Zellen verwendet. Im ersten Versuch wurden postnatale Schwann-Zellen transplantiert. In einer zweiten Versuchsreihe wurden im Vorfeld Schwann-Zellen aus den jeweiligen Tieren entnommen und acht Wochen später reimplantiert. In beiden Fällen wiesen elektrophysiologische Untersuchungen auf eine verbesserte axonale Regeneration hin. Übereinstimmend konnte mittels histologischer Untersuchungen eine erhöhte Anzahl myelinisierte Axone nachgewiesen werden. Die autologe Gruppe war im direkten Vergleich der allogenen Gruppe überlegen, dies jedoch nicht signifikant. Folglich sind beide Arten von Schwann-Zellen in der Lage, regenerative Prozesse zu unterstützen. Ähnliches konnte auch bei der Transplantation mesenchymaler Stammzellen gezeigt werden: Sowohl im Vorfeld *in vitro* in Schwann-Zell differenzierte als auch undifferenzierte Zellen zeigten eine ähnlich gute funktionelle Verbesserung (Hu 2007; Wakao 2010). Zwar geschah dies in Verbindung mit Nerven-Conduits, aber auch hier stellten sich Autoren die Frage, inwiefern parakrine Effekte eine weitaus größere Rolle spielen als der reine Ersatz atrophierter Schwann-Zellen (Rodrigues 2012).

Die oben aufgestellte Hypothese des *Triggers* durch die Schwann-Zellen beim Zusammentreffen des frisch aussprossenden Axon mit dem denervierten Nervenstumpf kann hierbei weiter als Erklärung dienen: Man weiß nicht, wie lange diese Spanne der Unterstützung ausschlaggebend ist. So kann es sein, dass bereits vor Beendigung dieser sensiblen Phase ein Teil der allogenen Schwann-Zellen abgeräumt worden ist. Ist dies der Fall, ist die durch die transplantierten Schwann-Zellen gegebene Beihilfe suboptimal. Oben beschriebene Möglichkeiten, die Verweildauer von allogenen Schwann-Zellen zu verlängern, gibt es bereits (Midha 1994; Walsh 2011) und wären eine interessante Ergänzung. Auf der anderen Seite kann jede zusätzliche Intervention das regenerative Milieu verändern und so Ergebnisse verfälschen oder gar verschlechtern. Ebenso ist die Rolle der Neuroinflammation immer noch widersprüchlich. Langfristig sollte das Ziel sein, mit möglichst wenigen Reagenzien eine optimierte Regeneration zu erreichen.

Autologe Schwann-Zellen können dem Patienten direkt entnommen werden und zeigen als körpereigenes Gewebe weniger Abstoßungsreaktionen (Gratwohl 2008). Es gibt kürzlich publizierte Erstversuche am Patienten mit autologen Schwann-Zellen nach Rückenmarksverletzungen mit mittelmäßigen Erfolgen (Saber 2008; Zhou 2012). Die Entnahme stellt aber als invasive Maßnahme immer auch ein Risiko dar, weshalb ein solcher Eingriff nur nach gründlicher Prüfung zur Anwendung kommen sollte. Studien zeigten, dass autologe Schwann-Zellen auf Nerven-*Conduits* vor allem Defekte sensorischer Nerven verbessern konnten (Aszmann 2008). Möglich wäre, dass die transplantierten autologen Schwann-Zellen weiter als die allogenen migrieren können und ein spezifischeres Expressionsmuster von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren besitzen. Einiges weist darauf hin, dass sie länger als allogene Zellen im Gewebe überleben: aus Fettgewebe gewonnene, autologe Schwann-Zellen, die in einem allogenen Nerven-*Conduit* verabreicht worden waren, konnten bis zu acht Wochen nach einer Transplantation nachgewiesen werden (Sun 2011). In anschließenden Experimenten wären also die Überlebensdauer und ihr Migrationsverhalten via GFP-Markierung weiter zu untersuchen sowie eine weitergefasste Genexpressionsanalyse durchzuführen.

Um die Überlebensdauer der Zellen zu verlängern, käme die Gabe von Immunsuppressiva (Midha 1994) in Frage, um eine Abräumung durch Makrophagen zu reduzieren. Walsh und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Applikation von heregulin-1 β die Apoptose dermalen Vorläuferzellen deutlich verringert (Walsh 2011). Auch genetisch veränderte Schwann-Zellen, die PSA (engl. *Polysialic acid*) überexprimieren, überleben länger als nur GFP-markierte Schwann-Zellen (Luo 2011).

Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass chronisch denervierte, axonale Nervensegmente nach einer Verletzung signifikant besser regenerieren, wenn ihnen Schwann-Zellen transplantiert werden.

Die herangezogen Messparameter stellen den derzeit herrschenden Goldstandard der Untersuchungsmethoden dar, um das Ausmaß von axonaler Regeneration zu analysieren. Dennoch finden sich Faktoren, die die Aussagekraft einschränken können. Aus diesem Grund könnten in weiterführenden Studien zusätzliche Untersuchungsmethoden eingesetzt werden. Denkbar wäre beispielsweise die Anfertigung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Axone.

Stammzellen besitzen gegenüber genuinen, autologen Schwann-Zellen verschiedene Vorteile, u. a. die weniger invasive Gewinnung. Dennoch bergen sie einige schwerwiegende Risiken, wie z. B. eine mögliche maligne Entartung. Aus diesem Grund ist es weiterhin sinnvoll, die Verwendung von Schwann-Zellen für therapeutische Zwecke detailliert im Tiermodell zu erforschen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Schwann-Zellen nur über einen limitierten Zeitraum nachweisbar sind. Trotzdem besitzen sie eine positive Wirkung auf den Heilungsprozess. Vor diesem Hintergrund wird die Vermutung angestellt, dass ihre Anwesenheit in den ersten Tagen, in welchen das Axon in den denervierten, distalen Nervenstumpf einwächst, Regenerationsprozesse *triggert*. Der genaue Wirkmechanismus konnte jedoch bis jetzt nicht identifiziert werden. Die Hypothese, dass durch die transplantierten Schwann-Zellen vermehrt Neurotrophine exprimiert werden, ließ sich nicht bestätigen. Diesem könnten einerseits strukturelle Ursachen, z.B. eine zu geringe Gruppengröße, zugrunde liegen. Auf der anderen Seite ist es denkbar, dass weitere, bisher nicht untersuchte Wachstumsfaktoren einen Einfluss besitzen. In weiterführenden Studien wäre es folglich interessant, die regenerativen Einflüsse der Schwann-Zellen auf genexpressiver Ebene noch genauer zu analysieren. Darüber hinaus sollte die genaue Aufenthaltsdauer der Zellen weiter präzisiert werden. Wenn es gelingt, die Aufenthaltsdauer der Zellen zu verlängern, könnten möglicherweise weitere, bisher unbekannte Mechanismen ersichtlich werden.

Nach der Transplantation von autologen Schwann-Zellen wurden bessere Ergebnisse festgestellt, als bei allogenen Schwann-Zellen. Darauf aufbauend wurde die Hypothese formuliert, dass das bessere *outcome* durch eine mögliche längere Verweildauer oder weitere Migration der Zellen hin zum Ort der Läsion begründet ist. Auch eine geringere neuroinflammatorische Reaktion auf die transplantierten Zellen könnte eine Rolle spielen. Daher könnte es in anschließenden Experimenten sinnvoll sein, das Migrationsverhalten der autologen Zellen genauer zu untersuchen, z. B. indem man sie im Vorfeld durch GFP markiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließen sich vielversprechende Zusammenhänge zwischen der Transplantation von Schwann-Zellen und der axonalen Regeneration nachweisen. Die Prinzipien, die hinter dem supportiven Effekt der Schwann-Zellen stecken, ließen sich jedoch nicht abschließend erklären. Die durchgeführten Experimente stellen somit einen Anknüpfungspunkt für folgende, weiterführende Studien dar.

Literaturverzeichnis

Aitken J.T., S. M., Young J.Z. (1947). "Maturation of regenerating nerve fibres with various peripheral connexions." J Anat **81**: 1-22.

Amariglio N., H. A., Scheithauer B.W., Cohen Y., Loewenthal R., Trakhtenbrot L., Paz N., Koren-Michowitz M., Waldman D., Leider-Trejo L., Constantini S., Rechavi G. (2009). "Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient." PLoS Med. **6**.

Anton E.S., W. G., Reichardt L.F., Matthew W.D. (1994). "Nerve growth factor and its low-affinity receptor promote Schwann cell migration." Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 2795-2799.

Aszmann O.C., K. K. J., Luegmair M., Frey M. (2008). "Bridging critical nerve defects through an acellular homograft seeded with autologous schwann cells obtained from a regeneration neuroma of the proximal stump." J Reconstr Microsurg **24**(3): 151-158.

Avellino A.M., H. D., Dailey A.T., MacKinnon M., Ellegala D., Kliot M. (1995). "Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during wallerian degeneration of axons." Exp Neurol **136**: 183-198.

Bélanger E., H. F. P., Vallée R., Randolph M.A., Kochevar I.E., Winograd J.M., Lin C.P., Côte D. (2011). "In vivo evaluation of demyelination and remyelination in a nerve crush injury model." Biomed Opt Express **2**: 2698-2708.

Bellenchi G.C., V. F., Piscopo V., Perrone-Capano C., Porzio di U. (2013). "Adult neural stem cells: an endogenous tool to repair brain injury?" J Neurochem **124**: 159-167.

Biosystems, A. (2012). Real-Time PCR Handbook, life technologies®.

Bischoff C., S.-M. W. J. (2011). Das EMG-Buch. Suttgart.

Boyd J. B., G. T. (2003). "Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo." Exp Neurol **183**: 610-619.

Boyd J.B., G. T. (2003). "Neurotrophic factors and their receptors in axonal regeneration and functional recovery after peripheral nerve injury." Mol Neurobiol **27**: 277-324.

Brockes J. P., F. K. L., Raff M.C. (1979). "Studies on cultured rat Schwann cells. I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve." Brain Res **165**(1): 105-118.

- Brushart, T. M. (1998). Green's operative hand surgery. New York, Churchill Livingstone.
- Bunge R.P., B. M. B., Eldridge C.F. (1986). "Linkage between axonal ensheathment and basal lamina production by Schwann cells." Annu Rev Neurosci **9**: 305-328.
- Bunge, R. P. (1994). "The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration." J Neurol **242**: 19-21.
- Cajal, S. R. y. (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system. New York, USA, Haffner Publishing Co. New York.
- Cámara-Lemarroy C.R., G.-d. I. G. F. J., Fernández-Garza N.E. (2010). "Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration." Neuroimmunomodulation **17**(314-324).
- Campbell, W. W. (2008). "Evaluation and management of peripheral nerve injury." Clinical Neurophysiology **119**: 1951-1965.
- Carroll S.L., M. M. L., Frohnert P.W., Kim S.S., Corbett J.A. (1997). "Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 und ErbB3, is induced during Wallerian degeneration." J Neurosci **17**: 1642-1659.
- Cenci M. A., W. H. (2011). "Poor results for retinal cell transplants in Parkinson disease." Nat. Rev. Neurology **7**: 424-425.
- Chaudhry V., C. D. R. (1992). "Wallerian degeneration in human nerves: serial electrophysiological studies." Muscle Nerve **15**: 687-693.
- Chen S., R. C., Ji R-R., Dikkes P., Coggeshall R., Woolf C., Corfas G. (2003). "Disruption of ErbB receptor signaling in adult non-myelinating Schwann cells causes progressive sensory loss." Nat Neuroscience **6**: 1186-1193.
- Cheng C., W. C. A., Wang J., Xu Y., Martinez J.A., Liu W.Q., McDonald D., Guo G.F., Nguyen M.D., Zochodne D.W. (2008). "Activated RHOA and peripheral axon regeneration." Exp Neurol **212**(358-369).
- Chu G. K. T., Y. W., Fehlings M.G. (2007). "The p75 neurotrophin receptor is essential for neuronal cell survival and improvement of functional recovery after spinal cord injury." Neuroscience **148**: 668-682.
- Clary D.O., R. L. F. (1994). "An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3." Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 11133-11137.
- Costantini L.C., I. O. (2000). "Immunophilin ligands and GDNF enhance neurite branching or elongation from developing dopamine neurons in culture." Exp Neurol **164**: 60-70.

David S., A. A. J. (1981). "Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats." Science **214**(931-3).

Davies A. M., L., K. F., Jaenisch, R. (1993). "p75-deficient trigeminal sensory neurons have an altered response to NGF but not to other neurotrophins." Neuron **11**: 565-574.

De Filippis L., B. E. (2012). "Concise review: self-renewal in the central nervous system: neural stem cells from embryo to adult." Stem Cells Transl Med. **1**.

Dedkov E.I., K. T. Y., Borisov A.B., Carlson B.M. (2002). "Survival of Schwann cells in chronically denervated skeletal muscles." Acta Neuropathol **103**: 565-574.

Dong Z., B. A., Liu N., Yarden Y., Lefkowitz G., Mirsky R., Jessen K.R. (1995). "Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors." Neuron **15**: 585-596.

Eide F.F., V. E. R., Eide B.L., Zang K., Wang X.Y., Reichardt L.F. (1996). "Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling." J Neurosci **16**: 3123-3129.

Erdö F., B. C., Blunk J., Hoehn M., Xia Y., Fleischmann B., Föcking M., Küstermann E., Kolossov E., Hescheler J., Hossmann K.A., Trapp T. (2003). "Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke." J Cereb Blood Flow Metab. **23**: 780-785.

Fannon A.M., S. D. L., Ilyina-Gragerova G., Brophy P.J., Friedrich Jr. V.L., Colman D.R. (1995). "Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions." J Cell Biol **129**: 189-202.

Fansa H., K. G. (2004). "Comparison of different biogenic matrices seeded with cultured Schwann cells for bridging peripheral nerve defects." Neurol Res **26**: 167-173.

Fenrich K., G. T. (2004). "Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems – current issues and advances." Can J Neurol Sci **31**(142-156).

Fox I. K., S. K. E., Keune J.D., Brenner M.J., Yu J.W., Hunter D.A., Wood P.M., Mackinnon S.E. (2005). "Schwann-cell injection of cold-preserved nerve allografts." Microsurgery **25**: 502-507.

Fricker F.R., L. N., Balarajah S., Tsantoulas C., Tanna S., Zhu N., Fageiry S.K., Jenkins M., Garrat A.N., Birchmeier C., Bennet D.L. (2011). "Axonally derived neuregulin-1 is required for remyelination and regeneration after nerve injury in adulthood." J Neurosci **31**: 3225-3233.

Frostick S. P., Y. Q., Kemp G.J. (1998). "Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration." Microsurgery **18**: 397-405.

- Fu S.Y., G. T. (1995). "Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged axotomy." J Neurosci **15**(5): 3876-3885.
- Fu S.Y., G. T. (1995). "Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation." J Neurosci. **15**(5): 3886-3895.
- Fu S.Y., G. T. (1997). "The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration." Mol Neurobiol **14**: 67-116.
- Funakoshi H., F. J., Barbany G., Timmusk T., Zacharissou O., Verge V.M., Persson H. (1993). "Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve." J Cell Biol **123**: 455-465.
- Gaudet A.D., P. P. G., Ramer M.S. (2011). "Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury." J Neuroinflammation **8**.
- George E.B., G. J. D., Griffin J.W. (1995). "Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels." J Neurosci **15**: 6445-6452.
- Gillen C., K. C., Muller H.W. (1997). "Gene expression in nerve regeneration." Neuroscientist **3**: 112-122.
- Gilley J., C. M. P. (2010). "Endogenous Nmnat2 is an essential survival factor for maintenance of healthy axons." PLoS Biol. **8**.
- Ginzinger, D. G. (2002). "Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream." Exp Hematol. **30**: 503-512.
- Gordon, T. (2009). "The role of neurotrophic factors in nerve regeneration." Neurosurg Focus **26**(2): E3.
- Gratwohl, A. (2008). "Neue Paradigmen in der humanen Stammzelltransplantation." Schweiz Med Forum **8**: 92-97.
- Guénard V., K. N., Morrissey T.K., Bunge R.P., Aebischer P. (1992). "Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration." J Neurosci **12**: 3310-3320.
- Guérout N., D. C., Drouot L., et al (2011). "Transplantation of olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration and functional recovery of peripheral nerve lesion in rats." Muscle Nerve **43**(4): 543-551.
- Guttmann E., G. L., Medowar P.B., Young J.Z. (1942). "The rate of regeneration of nerve." J Exp Biol **19**: 14-44.
- Haastert K., M. C., Chaturvedi S., Grothe C. (2007). "Human and rat adult Schwann cell cultures: fast and efficient enrichment and highly effective non-viral transfection protocol." Nat Protoc. **2**(1): 99-104.

- Hanani, M. (2005). "Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function." Brain Res Brain Res Rev. **48**: 457-476.
- Heine W., C. K., Griffin J.W., Höke A. (2004). "Transplanted neural stem cells promote axonal regeneration through chronically denervated peripheral nerves." Exp Neurol **189**(2): 231-240.
- Hodgkin A.L., H. A. F. (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." J Physiol **117**: 500-544.
- Höke, A. (2006). "Mechanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in humans?" Nature Clinical Practice Neurology **2**: 448-454.
- Höke A., G. T., Zochodne D.W., Sulaiman O.A. (2002). "A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation." Exp Neurol **173**(77-85).
- Höke A., R. R., Hameed H., Jari R., Zhou C., Li Z.B., Griffin J.W., Brushart T.M. (2006). "Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration." J Neurosci **26**: 9646-9655.
- Hood B., L. H. B., Levi A. D. (2009). "Transplantation of autologous Schwann cells for the repair of segmental peripheral nerve defects." Neurosurg Focus **26**: E4.
- Horner P.J., G. F. H. (2000). "Regenerating the damaged central nervous system." Nature **407**: 963-970.
- Hu J., Z. Q. T., Liu X.L., Xu Y.B., Zhu J.K. (2007). "Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells." Exp Neurol **204**: 658-666.
- Hughes R.A.C., C. D. R. (2005). "Guillain-Barré syndrome." Lancet **366**(9497): 1653-1666.
- Hui A.C., C. K. M., Tang A.S., Fu M., Kay R., Wong K.S. (2005). "Electrophysiological, clinical and epidemiological study of Guillain-Barre Syndrome in Hong Kong Chinese." J Clin Neurosci **12**: 134-136.
- Irintchev A., D. A., Wernig A. (1990). "Reinnervation and recovery of mouse soleus muscle after long-term denervation." Neuroscience **39**(1): 231-243.
- Kerschensteiner M., S. M. E., Lichtman J.W., Misgeld T. (2005). "In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord." Nat Med. **11**: 572-577.
- Korte N., S. H. C., Grothe C., Tipold A., Haastert-Talini K. (2011). "Evaluation of periodic electrodiagnostic measurements to monitor motor recovery after different peripheral nerve lesions in the rat." Muscle Nerve **44**(1): 63-73.

- Kriegstein K., H. P., Farkas L., Jaszai J., Galter D., Krohn K., Unsicker K. (1998). "Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor-beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons." J Neurosci **18**: 9822-9834.
- Lee R., K. P., Teng K. K., Hempstead B.L. (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." Science **294**: 1945-1948.
- Liefner M., S. H., Sachse T., Michel U., Kollias G., Brück W. (2000). "The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration." J Neuroimmunol **108**: 147-152.
- Lubínska, L. (1977). "Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibres of the rat phrenic nerve." Brain Res **130**: 47-63.
- Luo J., B. X., Wu D., Yeh J., Richardson P.M., Zhang Y. (2011). "Promoting survival, migration, and integration of transplanted Schwann cells by over-expressing polysialic acid." Glia **59**: 424-434.
- Lyons W.E., G. E. B., Dawson T.M., Steiner J.P., Snyder S.H. (1994). "Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory ganglia." Proc Natl Acad Sci U S A **91**: 3191-3195.
- Mackinnon S. E., D. A. L., O'Brien J.P. (1991). "Changes in nerve fiber numbers distal to a nerve repair in the rat sciatic nerve model." Muscle Nerve **14**: 1116-1122.
- Mahadeo D., K. L., Chao M. V., Hempstead B.L. (1994). "High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multi-subunit polypeptide receptors." J Biol Chem **269**: 6884-6891.
- Maripuu A., B. A., Björkman-Burtscher I.M., Mannfolk P., Andersson G., Dahlin L.B. (2012). "Reconstruction of sciatic nerve after traumatic injury in humans - factors influencing outcome as related to neurobiological knowledge from animal research." JBP&PNI **7**: 3-13.
- Martini R., F. S., López-Vales R., David S. (2008). "Interactions between Schwann cells and macrophages in injury and inherited demyelinating disease." Glia **56**: 1566-1577.
- Meyer M., M. I., Wetmore C., Olson L., Thoenen H. (1992). "Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA." J Cell Biol **119**: 45-54.
- Michalski B., B. J. R., Fahnstock M. (2008). "Long-term changes in neurotrophic factor expression in distal nerve stump following denervation and reinnervation with motor or sensory nerve." J Neurochem **105**: 1244-1252.
- Midha R., M. S. E., Becker L.E. (1994). "The fate of Schwann cells in peripheral nerve allografts." J Neuropathol Exp Neurol **53**(3): 316-322.

- Nave K.A., T. B. D. (2008). "Axon-glial signaling and the glial support of axon function." Annu Rev Neurosci **31**: 535-561.
- Naveilhan P., E. W. M., Ernfors P. (1997). "Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR alpha after sciatic nerve lesion in the mouse." Eur J Neurosci **9**: 1450-1460.
- Nishiura Y., B. J., Nilsson A., Kanje M., Dahlin L.B. (2004). "Addition of cultured Schwann cells to tendon autografts and freeze-thawed muscle grafts improves peripheral nerve regeneration." Tissue Eng **10**: 157-164.
- Noble J., M. C. A., Prasad V.S., Midha R. (1998). "Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries." J Trauma **45**: 116-122.
- Pedraza L., H. J. K., Colman D.R. (2001). "Organizing Principles of the Axoglial Apparatus." Neuron **30**: 335-344.
- Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." Philos Trans R Soc B Biol Sci **361**: 1545-1564.
- Reynolds M.L., W. C. J. (1993). "Reciprocal Schwann cell-axon interactions." Curr Opin Neurobiol **3**(5): 683-693.
- Robinson, L. R. (2000). "Traumatic injury to peripheral nerves." Muscle Nerve **23**: 863-873.
- Rodrigues M.C., R. A. A., Glover L.E., Voltarelli J., Borlongan C.V. (2012). "Peripheral nerve repair with cultured Schwann cells: getting closer to the clinics." Scientific World Journal **2012**.
- Saberi H., M. P., Aghayan H.R., Arjmand B., Hosseini S.K., Emami-Razavi S.H., Rahimi-Movaghar V., Raza M., Firouzi M. (2008). "Treatment of chronic thoracic spinal cord injury patients with autologous Schwann cell transplantation: an interim report on safety considerations and possible outcomes." Neurosci Lett **443**(1): 46-50.
- Seddon, S. H. (1975). Surgical Disorders of the Peripheral Nerves, Churchill Livingstone.
- Shakhbazov A., K. J., Hoyng S.A., Kumar R., van Minnen J., and M. R. Verhaagen J. (2012). "Early regenerative effects of NGF-transduced Schwann cells in peripheral nerve repair." Mol Cell Neurosci **50**: 103-112.
- Shakhbazov A., M. J. A., Xu Q., Kawasoe J., van Minnen J., Midha R. (2012). "Evidence for a systemic regulation of neurotrophin synthesis in response to peripheral nerve injury." J Neurochem **122**: 501-511.
- Shamash S., R. F., Rotshenker S. (2002). "The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta." J Neurosci **22**: 3052-3060.

Shen Y.J., D. M. E., Salzer J.L., Roder J., Filbin M.T. (1998). "Myelin-associated glycoprotein in myelin and expressed by Schwann cells inhibits axonal regeneration and branching." Mol Cell Neurosci **12**: 79-91.

Skaper, S. D. (2008). "The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors." CNS & Neurological Disorders - Drug Targets **7**: 46-62.

Stewart (1995). "Expression of c-Jun, Jun B, Jun D and cAMP response element binding protein by Schwann cells and their precursors in vivo and in vitro." Eur J Neurosci **7**: 1366-1375.

Stewart, J. D. (2003). "Peripheral nerve fascicles: anatomy and clinical relevance." Muscle Nerve **28**: 525-541.

Stoll G., G. J. W., Li C.Y., Trapp B.D. (1989). "Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation." J Neurocytol **18**: 671-683.

Stoll G., J. S., Myers R. (2002). "Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller's observations to neuroinflammation." J Peripher Nerv Syst **7**(1): 13-27.

Strittmatter S.M., I. M., Fishman M.C. (1994). "GAP-43 amino terminal peptides modulate growth cone morphology and neurite outgrowth." J Neurosci **14**: 5503-5513.

Strohmaier C., C. B. D., Urfer R., Barde Y. A., Dechant G. (1996). "A splice variant of the neurotrophin receptor trkB with increased specificity for brain-derived neurotrophic factor." EMBO J **15**: 3332-3337.

Sugiura Y., L. W. (2011). "Neuron-glia interactions: the roles of Schwann cells in neuromuscular synapse formation and function." Biosci Rep **31**: 295-302.

Sulaiman O.A., G. T. (2000). "Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size." Glia **32**: 234-246.

Sumner, A. J. (1990). "Aberrant reinnervation." Muscle Nerve **13**: 801-803.

Sun F., Z. K., Mi W.-J., Qiu J.-H. (2011). "Combined use of decellularized allogeneic artery conduits with autologous transdifferentiated adipose-derived stem cells for facial nerve regeneration in rats." Biomaterials **32**: 8118-8128.

Sunderland, S. (1947). "Rate of regeneration in human peripheral nerves; Analyses of the Interval between injury and onset of recovery." Arch Neur Psych **58**: 251-295.

Sunderland, S. (1978). Nerves and nerve injuries. New York, Churchill Livingstone.

Terenghi, G. (1999). "Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors." J. Anat. **194**: 1-14.

Terenghi G., C. J. S., Birch R., Hall S.M. (1998). "A morphological study of Schwann cells and axonal regeneration in chronically transected human peripheral nerves." J Hand Surg [Br] **23**: 583-587.

Tomita K., M. T., Mantovani C., Terenghi G. (2012). "Differentiated adipose-derived stem cells promote myelination and enhance functional recovery in a rat model of chronic denervation." J Neurosci Res **90**: 1392-1402.

Tomita K., T. G., Madura T. (2011). "Minimally invasive transplantation of Schwann cells into the peripheral nerve – preliminary results in rats." J Plast Reconstr Aesthet Surg.

Vleggeert-Lankamp C. L., v. d. B. R. J., Feirabend H.K., Lakke E.A., Malessy M.J., Thomeer R.T (2004). "Electrophysiology and morphometry of the Aalpha- and Abeta-fiber populations in the normal and regenerating rat sciatic nerve." Exp Neurol **187**(2): 337-349.

Vogel (2006). Kursbuch Klinische Neurophysiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG.

Wakao S., H. T., Kitada M. et al. (2010). "Long-term observation of auto-cell transplantation in non-human primate reveals safety and efficiency of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in peripheral nerve regeneration." Exp Neurol **223**: 537-547.

Waller, A. (1850). "Experiment on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog, and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers." Phil Transact Royal Soc London **140**: 423-429.

Walsh S.K., G. T., Addas B.J.M., Kemp S.W.P., Midha R. (2010). "Skin-derived precursor cells enhance peripheral nerve regeneration following chronic denervation." Exp Neurol **223**: 221-228.

Walsh S.K., K. R., Grochmal J.K. et al. (2012). "Fate of stem cell transplants in peripheral nerves." Stem Cell Research **8**: 226-238.

Wang J.T., M. Z. A., Barres B.A. (2012). "Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway." J. Cell Biol. **196**: 7-18.

Wang S, W. A. C., Xu X., Gao S., Mao H.Q., Leong K.W., Yu H. (2001). "A new nerve guide conduit material composed of biodegradable poly(phosphoester)." Biomaterials **22**(1157-1169).

Werdin F., G. H., Jaminet P., Kraus A., Manoli T., Danker T., Guenther E., Haerlec M., Schaller H.E., Sinis N. (2009). "An improved electrophysiological method to study peripheral nerve regeneration in rats." J Neurosci Methods **182**(1): 71-77.

Witzel C., R. C., Brushart T.M. (2005). "Pathway sampling by regenerating peripheral axons." J Comp Neurol **485**: 183-190.

Woodhoo A., S. L. (2008). "Development of the Schwann cell lineage: from the neural crest to the myelinated nerve." Glia **56**: 1481-1490.

Xu X., Y. W. C., Hwang P.Y., Yu H., Wan A. C., Gao S. et al. (2003). "Peripheral nerve regeneration with a sustained release of poly(phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits." Biomaterials **24**: 2405-2414.

Yan Q., M. C., Lopez O.T. (1995). "In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons." Nature **373**: 341-344.

Zhai Q., W. J., Kim A., Liu Q., Watts R., Hoopfer E., Mitchison T., Luo L., He Z. (2003). "Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of wallerian degeneration." Neuron **39**(217-25).

Zhao T., Z. Z. N., Xu Y. (2011). "Immunogenicity of induced pluripotent stem cells." Nature 2011 **13**: 212-215.

Zhou X.H., N. G. Z., Feng S.Q., Kong X.H., Chen J.T., Zheng Y.F., Ban D.X., Liu T., Li H., Wang P. (2012). "Transplantation of autologous activated Schwann cells in the treatment of spinal cord injury: six cases, more than five years of follow-up." Cell Transplant **21**: 39-47.

Zochodne D. W., C. C., Miampamba M., Hargreaves K., Sharkey K.A. (2001). "Peptide accumulations in proximal endbulbs of transected axons." Brain Res **902**: 40-50.

Zochodne, D. W. (2012). "The challenges and beauty of peripheral nerve regrowth." J Peripher Nerv Syst **17**: 1-18.

Zoupi L., S. M., Karagogeos D. (2011). "Axons and myelinating glia: an intimate contact." IUBMB Life **63**: 730-735.

Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

An vorderster Stelle und ganz besonders möchte ich mich bei Hr. PD Dr. med. Helmar Lehmann bedanken, der dieses Projekt initiiert hat. Ohne seine exzellente Betreuung wäre die vorliegende Arbeit nie in dieser Form möglich gewesen. Seine hohe fachliche und wissenschaftliche Kompetenz bedeuteten gleichermaßen Sicherheit und immer neuen Ansporn für mich. Er führte mich an das „Handwerk“ des selbstständigen wissenschaftlichen Denkens heran und zeigte mir, wie spannend medizinische Forschung sein kann. Vielen Dank für stetige konstruktive Kritik, Lob, Beratung und eine Förderung, die weit über diese Arbeit hinausgeht.

Herrn Dr. rer. nat. Andre Heinen möchte ich meinen herzlichsten Dank ausdrücken. Seine unersetzbare Expertise in Schwann-Zellen und die fachliche Beratung in allen Phasen der Experimente hatten einen maßgeblichen Anteil an dem erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit. Durch seinen klugen Optimismus und seine ehrliche Meinung ist er zu einem geschätzten Ansprechpartner geworden.

Bedanken möchte ich mich bei Hr. Dr. rer. nat. Frank Bosse und Fr. Dr. rer. nat. Veronica Estrada für die große Hilfsbereitschaft während der Operationen in der Tierversuchsanstalt. Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Neurochemischen Labors für die freundliche Bereitstellung von Arbeitsplätzen und Materialien. Fr. Zippora Kohne danke ich für eine kompetente Unterstützung und Anleitung während der histologischen Auswertungen.

Besonderer Dank geht an meine Familie, die durch ihr Vertrauen in mich und ihre liebevolle Unterstützung einen wesentlichen Anteil an dieser Arbeit leistete. Mir wurde die Freiheit gegeben, einen eigenständigen Weg zu gehen, bei dem ich jedoch jederzeit auf uneingeschränkte Hilfsbereitschaft zählen konnte. Dafür möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei Fr. cand. med. Henrieke Beenen bedanken, die trotz gelegentlicher Mitbringsel für den gemeinsamen Kühlschrank und meiner ergebnisabhängigen Launenhaftigkeit nie die Geduld verloren hat.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 22.04.2015

Laura Holtmann