

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. A. Wree

„Überleben, Differenzierung und funktionelle Auswirkungen
transplanterter CSM14.1 Progenitorzellen in neonatalen
6-OHDA-läsionierten Ratten.“

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Stephan Beckmann

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0019-1

Rostock, 2007
Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. O. Schmidt, Hochschuldozent, Institut für Anatomie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. A. Rolfs, Ltd. Oberarzt, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. K. Endlich, Direktor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald

Datum der Verteidigung: 02. April 2008

Meinen Eltern.

„Parkinson's disease doesn't kill you, it takes your life away.“

Zitat einer englischen IPS-Selbsthilfegruppe.

Aus: Reichmann H, Goßrau G, Sommer U (2003) Neue Ansätze zur Transplantation von Dopamin produzierenden Zellen und Stammzellen. Nervenarzt 74: 22–26.

Teile der Arbeit sind veröffentlicht worden in:

Haas SJ, Beckmann S, Petrov S, Andressen C, Wree A, Schmitt O (2007) Transplantation of immortalized mesencephalic progenitors (CSM14.1-cells) into the neonatal Parkinsonian rat caudate putamen. J Neurosci Res 85: 778-786.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 URSACHEN DES IPS	8
1.1.1 MODELL DES OXIDATIVEN STRESSES	8
1.1.2 DAS GENDEFEKT-MODELL.....	9
1.1.2.1 Das α -Synuklein-Gen.....	10
1.1.2.2 Das Parkin-Gen.....	10
1.2 THERAPIEMÖGLICHKEITEN.....	11
1.2.1 PHARMAKOTHERAPIE DES MORBUS PARKINSON	11
1.2.1.1 Levo-Dopa.....	11
1.2.1.2 Dopaminrezeptor-Agonisten	12
1.2.1.3 Katechol-O-Methyl-Transferase (COMT-) Hemmer	12
1.2.1.4 Apomorphin.....	12
1.2.2 OPERATIVE VERFAHREN	13
1.2.3 ZELLERSATZTHERAPIE	14
1.2.3.1 Katecholaminerge Zellen	15
1.2.3.2 Humane neuronale mesenzepale Zellen (humane NMZ).....	15
1.2.3.3 Humane neurale Stammzellen (hNSZ)	17
1.2.3.4 Immortalisierte neurale Progenitoren.....	18
1.2.3.5 Die CSM14.1 – Zellen	19
1.3 TIERMODELLE DES MORBUS PARKINSON.....	20
1.3.1 DAS 6-HYDROXYDOPAMIN LÄSIONSMODELL.....	21
1.3.2 ANDERE LÄSIONSMODELLE – EINE KURZVORSTELLUNG.....	22
1.3.2.1 Das Rotenon-Modell.....	22
1.3.2.2 Das MPTP-Modell.....	22
1.4 TRANSPLANTATIONSORTE UND –ARTEN.....	22
1.5 FRAGESTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	24
2 MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1 VERSUCHSTIERE UND ZEITLICHER ABLAUF.....	25
2.2 BILATERALE 6-OHDA LÄSION (DOPAMINERGE DEAFFERENZIERUNG)	25
2.3 DIE TRANSPLANTATIONSVORBEREITUNG.....	26
2.3.1 PKH-26-MARKIERUNG DER CSM14.1-ZELLEN	26
2.3.2 INTRASTRIATALE TRANSPLANTATION DER PKH-26-MARKIERTEN CSM14.1-ZELLEN ..	27
2.4 VERHALTENSTESTUNG IM ZYLINDERTEST.....	27
2.5 GEWINNUNG UND AUFARBEITUNG DER HIRNE.....	28
2.6 AUSWAHL DER SCHNITTE.....	29
2.7 VERWENDETE ANTIKÖRPER	30
2.7.1 PRIMÄRANTI-KÖRPER.....	31
2.7.1.1 Neuronale Marker	31
2.7.1.2 Gliamarker	32
2.7.2 SEKUNDÄRANTI-KÖRPER.....	33
2.7.2.1 Fluoreszenzkonjugierte Sekundärantikörper	33
2.7.2.2 Biotingekoppelte Sekundärantikörper.....	34
2.7.3 IMMUNHISTOCHEMIE DER NICHT-TRANSPLANTIERTEN GEHIRNE	34

2.7.4	IMMUNHISTOCHEMIE DER TRANSPLANTierten HIRNE.....	36
2.8	BETRACHTUNG DER IMMUNFLUORESZENZEN.....	37
2.9	VERHALTENSMESSUNG.....	38
2.10	DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN.....	38
2.10.1	DAS DENSITOMETRISCHE VERFAHREN.....	39
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	VERHALTENSTEST.....	41
3.2	IMMUNHISTOCHEMIE.....	42
3.2.1	TYROSIN-HYDROXYLASE (TH) – FÄRBUNG (ABB. 9A - G).....	42
3.2.2	NISSL - FÄRBUNG (ABB. 10A + B).....	42
3.2.3	MARKSCHEIDENFÄRBUNG (ABB. 10C + D).....	43
3.2.4	ACETYLCHOLIN-ESTERASE (ACHE) - FÄRBUNG (ABB. 10E + F).....	43
3.3	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	46
3.3.1	FLUORESZENZMIKROSKOPIE (ABB. 11).....	46
3.3.2	KONFOKALMIKROSKOPIE (ABB. 12).....	46
3.4	DENSITOMETRIE.....	48
4	DISKUSSION.....	50
4.1	AUSWERTUNG DES VERHALTENSTESTS.....	50
4.1.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE GRÜNDE FÜR DIE GEFUNDENEN VERHALTENSONTERSCHIEDE ZWISCHEN ADULT- UND NEONATAL-LÄSIONIERTEN TIEREN.....	52
4.2	IMMUNHISTOCHEMISCHE AUSWERTUNG.....	55
4.2.1	LICHTMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	55
4.3	DENSITOMETRISCHE AUSWERTUNG.....	55
4.3.1	FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG.....	57
4.3.2	BEURTEILUNG DER PRIMÄRANTIKÖRPER.....	58
4.4	DIE MORPHOLOGISCHE INTEGRATION UND TH-SYNTHESE EKTOP TRANSPLANTierter CSM14.1-ZELLEN.....	59
4.4.1	TRANSPLANTATION IN NEONATALE TIERE.....	61
4.4.2	VERÄNDERTE NEURONALE, ZELLULÄRE ADHÄSIONSMOLEKÜLE (NCAM).....	61
4.4.3	DIE ROLLE DER ASTROZYTEN.....	62
4.4.4	WACHSTUMSFAKTOREN.....	63
4.4.4.1	Platelet derived growth factor (PDGF).....	63
4.4.4.2	Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF).....	64
4.4.4.3	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF).....	65
4.4.4.4	Ciliary neurotrophic factor (CNTF).....	65
4.5	BEANTWORTUNG DER FRAGESTELLUNG.....	66
4.6	AUSBLICKE.....	67
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	69
6	ANHANG.....	81
7	TABELLEN.....	84
8	THESEN.....	87

9	ERKLÄRUNG	88
10	LEBENS LAUF	89
11	DANKSAGUNG	91

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptophan (Serotonin)
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ac	Commissura anterior
aca	Commissura anterior, anterior part
AChE	Acetylcholin-Esterase
AK	Antikörper
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Rinderalbumin (engl. bovine serum albumin)
cc	Corpus callosum
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CNTR- α	CNTR-Rezeptoreinheit alpha
COMT	Katechol-O-Methyl-Transferase
CPu	caudate Putamen (Striatum)
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin
DBS	deep brain stimulation
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
E 14	Gestationsalter von 14 Tagen
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	epidermal growth factor
EMP	embryonale, mesenzephal Progenitorzellen
ENK	Met-enkephalin
FGF	fibroblastic growth factor
FKS	fetales Kälberserum
GAD	glutamic acid decarboxylase
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GP	Glutathion-Peroxidase
GPI	Globus Pallidum (internal part)
GR	Glutathion-Reduktase
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
ISC	immortalisierte Stammzellen
kDa	kilo Dalton

KT	Katalase
LIF	Leukämie inhibirender Faktor
MAO	Monoaminoxidase
MAO-A	Monoaminoxidase - Typ A
MAO-B	Monoaminoxidase - Typ B
MAP	Mikrotubulin assoziiertes Protein
MDA	Malondialdehyd
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
Mn-SOD	mitochondriale Isoform der SOD
ms	Antikörper aus der Maus
MS	Markscheide(n)
NCAM	neuronale, zelluläre Adhäsionsmoleküle
NF	Neurofilament
NMP	neuronale, mesenzepale Progenitorzellen
NSE	Neuronen spezifische Enolase
OD	optische Dichte
PC	post conceptionem
PFA	Paraformaldehyd
PKH26	roter Fluoreszenzfarbstoff für Zellmembrane
PPE	Preproenkephalin
PPT	Preprotachykinin
rb	Antikörper aus dem Kaninchen (engl. Rabbit)
re Stri	rechtes Striatum
S.E.M.	Standardfehler
SN	Substantia nigra
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SNpr	Substantia nigra pars reticulata
SOD	Superoxid-Dismutase
STN	Nucleus subthalamicus
Sub P	Substanz P
SVZ	Subventrikulärzone
SZ	Stammzelle
TGF-alpha	transforming growth factor alpha
TH	Tyrosin Hydroxylase
UPDRS	unified Parkinson's disease rating scale
ventr. lat.	ventriculus lateralis
vs.	versus

1 Einleitung

Im Zuge des Alterungsprozesses der Bevölkerung - im Jahr 2050 werden 37% der Deutschen älter als 59 und 12% älter als 80 Jahre sein (Pöttsch und Sommer, 2003) - werden degenerative Erkrankungen des Nervensystems zunehmen. Hierzu gehört vor allem der Morbus Parkinson, der auch als Idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS) bezeichnet wird und der sich im Durchschnitt zwischen dem 58-62 Lebensjahr manifestiert (Cummings, 1997). Allein in Deutschland sind ca. 250.000 Menschen am IPS erkrankt (Gerlach et al., 2001) und jährlich kommen ca. 15.000 Patienten hinzu. In der Altersgruppe der über 65-jährigen leidet bereits 1% der Gesamtbevölkerung an dieser Erkrankung (Beal, 2001) und hierbei sind die Parkinsonsyndrome, welche klinisch manchmal nur schwer von einem echten IPS zu unterscheiden sind, noch nicht berücksichtigt.

1817 beschrieb James Parkinson (1755-1825) in seiner Schrift „An essay on the shaking palsy“ erstmals dieses Leiden, welches später nach ihm benannt wurde. Obwohl er nur sechs Patienten für die Dauer weniger Wochen beobachten konnte, erkannte er schon zwei der drei Kardinalsymptome. Der einseitig beginnende Tremor, sowie das veränderte Gangbild (kleinschrittig, propulsionsartig) mit daraus resultierender Fallneigung. Die Ergänzung des Rigors, als drittes Merkmal dieser neurodegenerativen Multisystematrophie (Bauer et al., 2002), blieb dem französischen Arzt Charcot vorbehalten (Gerlach et al., 2001). Die typische klinische Trias Rigor, Tremor, Akinese bildet sich erst aus, wenn bereits mehr als 80% der dopaminergen Neurone geschädigt und das Dopamin (DA) fast vollständig (> 85%) aufgebraucht ist (Marsden, 1982). Bei einem Drittel der Patienten entwickelt sich zusätzlich eine Demenz, die vermutlich auf den Verlust cholinergischer Interneurone in der Substantia innominata zurückzuführen ist (Marsden, 1982).

1.1 Ursachen des IPS

Obwohl in den letzten Jahren versucht wurde die Ätiologie des IPS mit neuen Methoden zu klären, konnte weder eine einzelne Ursache noch ein Ursachenkomplex eindeutig identifiziert werden. Die Befunde und Mechanismen, die beim IPS erforscht wurden, lassen sich in zwei – sich gegenseitig nicht ausschließende – Modelle einteilen, die im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.1.1 Modell des oxidativen Stresses

Diesem Modell liegt die gesteigerte Belastung des alternden Organismus durch hochreaktive Stoffwechselmetabolite (Radikale) zu Grunde. Für dopaminerge Neurone hat die

Veränderung eine besondere Bedeutung, da beim DA-Metabolismus viele Radikale gebildet werden, welche in nachgeschalteten Reaktionen wieder abgebaut werden müssen (Sudha et al., 2003). Dieser Pathomechanismus wird durch Gewebsuntersuchungen älterer Patienten hinsichtlich oxidativer Schäden untermauert. Solche Schäden wurden in allen Geweben (auch Hirngewebe) gefunden und waren an der inneren Mitochondrienmembran besonders stark ausgeprägt (Olanow et al., 2002). Die Radikale (besonders das Hydroxidradikal, $\text{OH}\cdot$) reagieren mit Membranlipiden und oxidieren diese, was in postmortalen Untersuchungen von IPS-Patienten gezeigt wurde (Sudha et al., 2003). Bei diesen Untersuchungen wurden nicht nur erhöhte Malondialdehyd (MDA)-Spiegel - ein Zwischenprodukt bei der Lipidperoxidation - nachgewiesen, sondern auch 10-fach erhöhte Lipidhydroperoxide (Dexter et al., 1994). Darüber hinaus wurde in noch lebenden DA-Neuronen das 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) identifiziert. HNE ist ein hochpotentes Zellgift, welches ebenfalls bei der Lipidperoxidation entsteht. Es greift an vielen Stellen in den Zellstoffwechsel ein. So hemmt es nicht nur die Komplexe I und II der Atmungskette, sondern vermindert auch den Glutathion-Spiegel der Zelle. Letztlich führt es zur Apoptose (Yoritaka et al., 1996). Ferner ist erwiesen, dass die Zunahme oxidativer Schäden auf ein Überangebot von Radikalen zurückzuführen ist und nicht auf einer Fehlfunktion des Antioxidationsystems beruht, da die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GR), Glutathion-Peroxidase (GP), Superoxid-Dismutase (SOD) und der Katalase (KT) altersentsprechend ist (Olanow et al., 2002; Sudha et al., 2003). Die Mn-SOD, ein in der Mitochondrienmembran vorkommendes Isoenzym der Superoxid-Dismutase, weist sogar eine erhöhte Aktivität auf (Saggu et al., 1989). Erreichen die Oxidationsschäden in den nigralen DA-Neuronen ein bestimmtes Ausmaß, so werden (u.a.) die Membranen der Dopamin-Vesikel instabil, was zum Übertritt dieses Transmitters ins Zytosol führt. Dort wird das DA durch die intraneuronale Monoaminoxidase A (MAO-A), die astrozytäre MAO-B sowie den dort herrschenden pH-Wert mittels oxidativer Desaminierung zu Dopamin-Quinonen, Superoxid-Radikalen ($2\text{O}_2\cdot^-$) und Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2) abgebaut (Lotharius und Brundin, 2002). Da auf diesem Weg relativ große Mengen freier Radikale anfallen, kommt es zur irreversiblen Schädigung der dopaminergen Neurone. Ob der daraufhin erfolgende Zelltod apoptotisch oder nekrotisch verläuft, ist derzeit noch nicht eindeutig geklärt.

1.1.2 Das Gendefekt-Modell

In diesem Modell spielen Mutationen im Parkin- und α -Synuklein-Gen eine zentrale Rolle. Neben diesen beiden Gen-Defekten, gibt es noch einige andere Defekte, auf die hier nicht

eingegangen wird. Insgesamt werden Gendefekte bei IPS-Patienten allerdings selten als Ursache diagnostiziert und die überwiegende Anzahl der Patienten weist keine dieser Veränderungen auf (Olanow et al., 2002).

1.1.2.1 Das α -Synuklein-Gen

Ein Fehler auf Chromosom 4 (q21-23) liegt diesem Defekt zu Grunde, der zum Austausch von Guanin gegen Adenosin in Position 209 (G209A) führt, was zur Folge hat, dass in der Aminosäurekette des α -Synuklein an Position 53 Alanin gegen Threonin (Ala53Thr) getauscht wird (Olanow et al., 2002). Durch diese Veränderung neigt das Protein zur β -Faltblatt-Bildung (Protofibrillen) und schädigt den Golgi-Apparat. Die Protofibrillen werden mittels Mikrotubulitransport in Kernnähe abgelagert, wo sie mikroskopisch als Lewy-Körperchen imponieren (Lotharius und Brundin, 2002). Sie stellen eine der neuropathologischen Ursachen dar, welche den Verlust melaninhaltiger Zellen in der SN mitbedingen. Durch die irreversible Ablagerung von Lewy-Körperchen geht die Zelle zu Grunde (Lotharius und Brundin, 2002). Die Patienten entwickeln das typische Krankheitsbild eines Levodopa-responsiven IPS mit Lewy-Körperchen-Bildung, nur dass die Krankheit wesentlich früher beginnt - im Durchschnitt mit 46 Jahren (Olanow et al., 2002). α -Synuklein spielt wahrscheinlich eine Rolle im Transmitter Vesikel-Umsatz und kommt dann zum Tragen, wenn die Synapse höherfrequent stimuliert wird, so dass Vesikel aus dem Reserve-Pool zusätzlich mit einbezogen werden müssen (Lotharius und Brundin, 2002). Gelegentlich lassen sich solche Einschlüsse auch in Gehirnen von Personen finden, bei denen zu Lebzeiten kein IPS bekannt war, was als asymptomatisches IPS-Stadium verstanden wird.

Bei der Mehrzahl der IPS-Patienten wurden solche Mutationen aber nur bei positiver Familienanamnese und nicht bei Patienten mit sporadischem IPS gefunden (Olanow et al., 2002).

1.1.2.2 Das Parkin-Gen

Bei vielen Patienten (ca. 50%) mit juvenilem, familiärem Parkinson (Beginn mit ca. 20 Jahren) konnte eine Reihe von Punktmutationen und Deletionen im Parkin-Gen (Chromosom 6; q25.2-q27) festgestellt werden (Pankratz et al., 2004). Morphologisch lässt sich ein Zelluntergang in der SNpc sowie dem Locus coeruleus erkennen, jedoch keine Einschlusskörperchenbildung (Olanow et al., 2002). Parkin ist eine Ubiquitin-Ligase (Shimura et al., 2000), die abzubauen Proteine durch Ubiquitinierung „markiert“, bevor sie von Proteasomen abgebaut werden. Dieser Vorgang ist durch die Punktmutationen gestört, weshalb viele Proteine im Zytosol akkumulieren und zum Zelluntergang führen.

1.2 Therapiemöglichkeiten

Da das Idiopathische Parkinsonsyndrom ohne Therapie nach ca. 8-10 Jahren zum Tode führt und die Patienten unter einer suffizienten Therapie eine nahezu normale Lebenserwartung haben (Cummings, 1997), sollte sich die IPS-Therapie der Diagnose unverzüglich anschließen. Für betroffene Patienten stehen heute verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. Goldstandard ist noch immer die Substitution von Dopamin durch Gabe der DA-Vorstufe L-Dopa (Hirsch und Herrero, 1997). Dieser Therapieansatz lindert die Auswirkungen des DA-Mangels zwar effektiv, aber nicht kausal.

1.2.1 Pharmakotherapie des Morbus Parkinson

1.2.1.1 Levo-Dopa

Da der Mangel an Dopamin eines der Hauptcharakteristika des IPS ist (Cotzias et al., 1969), liegt es nahe, diesen fehlenden Transmitter zu substituieren. Da dieser Transmitter die Bluthirnschranke nicht passieren kann, wird seine Vorstufe (Levo-Dopa) gegeben, welche in die DA-Neurone aufgenommen und durch die Dopa-Decarboxylase in Dopamin umgewandelt wird (Melamed et al., 2000). Da diese Umwandlung auch in der Peripherie erfolgt und zu erheblichen Nebenwirkungen wie Übelkeit und orthostatischer Hypotension führt (Tintner und Jankovic, 2002), wird L-Dopa mit einem Decarboxylasehemmer (z.B. Benserazid oder Carbidopa) kombiniert, welcher die Bluthirnschranke nicht überwinden kann und somit die unerwünschte Metabolisierung des L-Dopa in der Peripherie verhindert. Kombinationspräparate wie Madopar™ (L-Dopa und Benserazid) konnten die unerwünschten Wirkungen deutlich vermindern und ermöglichten zugleich eine Dosisreduktion (Tintner und Jankovic, 2002). Als vorteilhaft erwies sich weiterhin die zusätzliche Gabe eines Dopaminrezeptoragonisten (z.B. Bromocriptin), welcher die reaktiv erhöhte DA-Rezeptorendichte, die als Folge des DA-Mangels im Striatum auftritt (Marsden, 1982), therapeutisch nutzt. Nach medikamentöser Einstellung des Patienten auf diese Pharmaka ist eine deutliche Besserung der Beschwerden für ca. 4-5 Jahre zu erreichen („Honeymoon-Phase“; Reichmann et al., 2003), bevor die Probleme des „wearing-off“ (immer kürzere Wirkungsdauer des L-Dopa) oder der „End-of-dose“ Akinesen (Phase des „Paradise Lost“) zu immer höheren Dosen bzw. Applikationsfrequenzen führen und schließlich einen Therapiewechsel erzwingen können. Werden diese Nebenwirkungen zu stark, kommt z.B. die Applikation von Apomorphin (Kap. 1.2.1.4) oder die tiefe Hirnstimulation (engl. deep brain stimulation, DBS), beides ebenfalls etablierte therapeutische Verfahren im fortgeschrittenen Stadium (Herzog et al., 2003), zur Anwendung.

1.2.1.2 Dopaminrezeptor-Agonisten

Die Hochregulation der Rezeptoren ist eine physiologische Antwort der Neurone auf den Transmittermangel (Chaturvedi et al., 2003). Diese Tatsache ist von Bedeutung, da es in den letzten Jahren gelungen ist Substanzen zu entwickeln, die an diese Rezeptoren binden und als DA-Agonisten wirken können. Zu diesen Stoffen zählen z.B. Bromocriptin oder Lisurid.

In der Therapie des IPS werden solche Medikamente zu Beginn eingesetzt, um die L-Dopa Dosis - und dadurch die Nebenwirkungen - gering zu halten (Reichmann et al., 2003). Eine Monotherapie mit DA-Rezeptoragonisten führt allerdings nur in Einzelfällen zu befriedigenden Ergebnissen.

1.2.1.3 Katechol-O-Methyl-Transferase (COMT-) Hemmer

Da die Katechol-O-Methyl-Transferase neben der MAO-B das zweite wichtige Enzym im Dopamin-Abbau ist (Gerlach et al., 2001), stellt die Hemmung dieses Enzyms einen weiteren Mechanismus zur Erhöhung des DA-Angebots dar. Ein COMT-Hemmer ist Entacapon®, nach dessen Einnahme in therapeutischer Dosis (200 mg/Tag) die COMT-Aktivität in den Erythrozyten um 60% sinkt, was dazu führt, dass die Plasmahalbwertszeit von L-Dopa um ca. 75% steigt (Gerlach et al., 2001). Durch die gleichzeitige Gabe von COMT-Hemmern mit L-Dopa, kann die L-Dopa Dosis reduziert und somit Peak-Dose-Dyskinesien vermindert werden.

1.2.1.4 Apomorphin

Dieses Morphinanalogon (Struktur siehe Abb. 1) - ohne schmerzlindernde oder euphorisierende Wirkung - ist ein sehr potenter Dopaminrezeptoragonist, der nach evtl. anfänglich auftretender Übelkeit, meist gut vertragen wird. Da seine Halbwertszeit nur bei wenigen Minuten liegt, wird es über eine Minipumpe subkutan injiziert. Dieses System wird dann angewandt, wenn mit der L-Dopa Substitution keine zufriedenstellenden Ergebnisse mehr erzielt werden können (Gerlach et al., 2001).

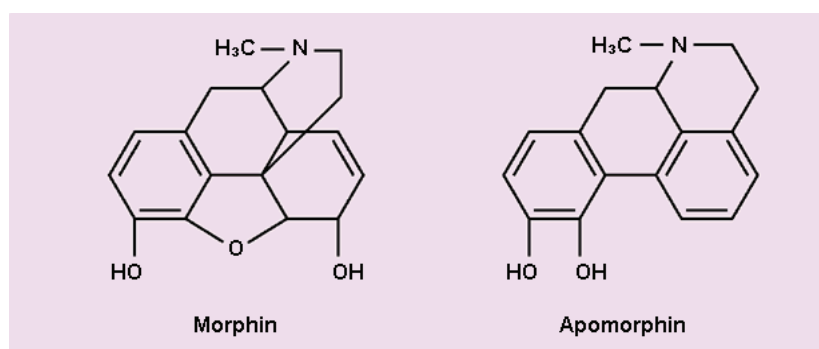


Abb. 1: Struktureller Vergleich: Morphin und Apomorphin.

1.2.2 Operative Verfahren

Während die Symptomatik bei der Mehrzahl der Patienten in der „Honeymoonphase“ sehr gut durch Arzneimittel beherrscht wird, nehmen die Nebenwirkungen in den Folgejahren kontinuierlich zu, so dass es in vielen Fällen nötig ist alternative Therapien anzuwenden.

Insbesondere die L-Dopa Nebenwirkungen wie „Wearing off“-Phänomene, Dyskinesien und On-Off-Fluktuationen, zwingen zu einem solchen Schritt (Herzog et al., 2003). Das On-Off-Phänomen tritt bei 50% der Patienten nach 5 Jahren auf und ist bei Patienten, die dieses Medikament seit 10 Jahren oder länger einnehmen, in bis zu 80% der Fälle zu verzeichnen (Follett, 2004).

Nach anfänglichen Erfolgen mit der Pallido- und Thalamotomie bevorzugt man heute nicht-destruierende Verfahren, wie z.B. die tiefe Hirnstimulation (Marsden et al., 1997). Dank der Einführung stereotaktischer Techniken durch Spiegel und Wycis 1947 und deren kontinuierliche Weiterentwicklung, sind solche chirurgischen Therapien sicher und praktikabel geworden. Durch implantierte Elektroden, die an einen subkutan gelegenen Impulsgeber angeschlossen sind (Pollak et al., 1997), erfolgt eine Hochfrequenzstimulation bestimmter Hirnareale, wodurch diese gehemmt werden (McIntyre et al., 2004). Die Entscheidung welches Areal stimuliert wird, richtet sich nach der Symptomatik des Patienten. So bessert eine Erregung des Globus pallidus internus (GPi) v.a. die Dyskinesie, auch ohne postoperative L-Dopa-Reduktion (Follett, 2004), wohingegen eine Stimulation des Nucleus subthalamicus (engl. subthalamic nucleus, STN) eher auf die Linderung des Tremors abzielt. Hierbei wird der kontralateral zur tremordominanten Körperhälfte liegende STN über eine elektrische Hochfrequenzstimulation inhibiert, was zu einer deutlichen Linderung des Tremors auf der betreffenden Körperhälfte führt (McIntyre et al., 2004). Eine Besserung der Dyskinesien kann dann nur sekundär durch eine L-Dopa-Reduktion erreicht werden (Follett, 2004). Nach Aussage von Toda et al. (2004), kann im günstigsten Fall die L-Dopa Dosis um bis zu 60% gesenkt werden. Diese Daten wurden 6 Monate nach der Operation erhoben. Patienten, bei denen der GPi stimuliert wird, können die L-Dopa-Dosen sogar um 60-75% vermindern (Toda et al., 2004).

Der genaue Wirkmechanismus des DBS ist bis heute nicht vollständig geklärt (Follett, 2004). Wahrscheinlich werden durch die elektrische Spannung der Elektrodenköpfe die darunterliegenden Axone depolarisiert, was zu einer retrograden Hemmung von Neuronen führt und somit den Signal-output des Kerngebietes modifiziert (Follett, 2004). Der Nachteil dieses Verfahrens ist v.a. in seinen relativ hohen Kosten und eventuellen OP-Risiken zu sehen (Pollak et al., 1997).

1.2.3 Zellersatztherapie

Unabhängig vom IPS wurde bereits 1890 von Thompson der erste Versuch unternommen Zellen in das zentrale Nervensystem zu transplantieren. Nachdem Tretiakoff im Jahre 1919 erkannte, dass eine der Hauptursachen des IPS im Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra (pars compacta) besteht, reiften die ersten Theorien diese Krankheit mittels Zelltransplantation zu therapieren. Nur 21 Jahre danach beobachtete Le Gros Clark, dass neurale Transplantate in neonatalen Tieren eine bessere Überlebensrate haben als in adulten (Le Gros Clark, 1940). Nach der Einführung des 6-OHDA Läsionsmodells durch Ungerstedt und Mitarbeiter 1970 wurden von Perlow (1979) und Björklund (1980) erste systematische Transplantationsexperimente durchgeführt (Perlow et al., 1979; Björklund et al., 1980).

Die Grundidee dieses Verfahrens besteht darin, degenerierte dopaminerge, nigrale Neurone zu ersetzen um die Funktionalität der SN wiederherzustellen (Lindvall und Hagell, 2002a). Auf Grund der Progredienz des Morbus Parkinson ist es sinnvoll dem fortschreitenden Neuronenverlust mittels Zelltransplantationen zu begegnen (Bauer et al., 2002; Reichmann et al., 2003). Olanow und Mitarbeiter haben 1997 die Gründe, welche für eine Zellersatztherapie sprechen, zusammengefasst:

- a) Beim IPS findet ein relativ selektiver Untergang dopaminerger Neurone in der SN, dem Locus coeruleus und einigen anderen Hirnarealen statt (Olanow et al., 2002).
- b) Die L-Dopa Therapie hat gezeigt, dass sich die Symptomatik bei IPS-Patienten unter der Substitution der Transmittervorstufe deutlich verbessert.
- c) Der Transplantationsort ist klar definiert.
- d) Die dopaminergen Neurone stimulieren ihre Rezeptoren physiologisch relativ gleichmäßig und ohne spezielle Verschaltungsmuster.

Die Tatsache, dass Björklund und Lindvall bereits 1990 erfolgreich dopaminhaltiges Gewebe in IPS-Patienten transplantiert haben (Lindvall et al., 1990), zeigt, dass eine Weiterentwicklung und Konsolidierung dieses therapeutischen Ansatzes vielversprechend ist. Klinische Studien und tierexperimentelle Untersuchungen haben ergeben, dass die implantierten Zellen bestimmte Voraussetzungen erfüllen müssen, um eine signifikante Verbesserung für den Patienten herbeizuführen (Lindvall und Hagell 2002b):

- a) Die Zellen müssen DA synthetisieren und freisetzen können.
- b) Langfristig sollten mindestens 100.000 Zellen je Putamen überleben.
- c) Die Zellen dürfen sich nicht unkontrolliert teilen (Tumorgefahr).

Im Idealfall sollten die Zellen sowohl die nigro-striatale Projektion wiederherstellen, als auch in die basalganglionäre-thalamo-kortikale Schleife eingebunden werden, um die strukturelle Integrität des Gehirnes wieder herzustellen. Wie schwierig eine solche „Restitutio ad

integrum“ zu erlangen ist, zeigt z.B. die Arbeit von Mendez und Mitarbeitern (1996), in der geschildert wird, dass ein langstreckiges Faserwachstum bislang nur mittels „Brückentechnik“ oder bilokulärer Transplantation (in die SN und das CPu) gelingt. Prinzipiell kommen mehrere Zellarten, die zur Transplantation verwendet werden können, in Frage. Die Wichtigsten, sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden:

- a) katecholaminerge Zellen,
- b) humane neuronale mesenzepale Progenitorzellen,
- c) humane Stammzellen (embryonale und adulte),
- d) immortalisierte neurale Progenitoren.

1.2.3.1 Katecholaminerge Zellen

Katecholaminerge Zellen kommen u.a. im Glomus caroticum, sympathischen Ganglien und dem Nebennierenmark (NNM) vor (Olanow et al., 1997). In bisherigen Untersuchungen zeigte sich, dass die chromaffinen Zellen des NNM – die unter physiologischen Bedingungen nur geringe DA-Mengen bilden – ihre DA-Syntheserate deutlich erhöhen können, wenn sie der gabaergen Hemmung entzogen werden (Olanow et al., 1997). Transplantationen dieser Zellen in das CPu dopaminerg deafferenzierter Tiere zeigten dann aber nur begrenzte motorische Verbesserung (Freed et al., 1981). Da auch die Verwendung anderer, nicht-neuronaler katecholaminerger Zellen unbefriedigende Ergebnisse erbrachte (Costantini und Isacson, 1999), wurde dieses Therapiekonzept weitestgehend verlassen.

1.2.3.2 Humane neuronale mesenzepale Zellen (humane NMZ)

Da der Verlust dopaminerger Zellen in der SN – wie oben beschrieben – ein Kardinalsymptom des IPS ist, liegt es nahe, diese degenerierten Zellen durch andere zu ersetzen, die ebenfalls in der Lage sind DA zu bilden (Lindvall und Hagell, 2002a). Solche Zellen kommen in verschiedenen Geweben vor, wie z.B. dem fetalen, ventralen Mesenzepalon (Olanow et al., 1997). Obwohl erste klinische Studien mit humanen, embryonalen mesenzepalen Zellen schon 1987 durchgeführt wurden, ist das Ergebnis bislang ernüchternd (Lindvall und Hagell 2002b). In einer klinischen Studie von Freed und Mitarbeitern (2001) konnte zwar gezeigt werden, dass dopaminerge Zellen - die in humanem, embryonalem, mesenzepalem Gewebe enthalten waren - in 17 von 20 Fällen überlebten und bei einigen Patienten nach drei Jahren eine nahezu vollständige Reinnervation des Putamens bewirkten, sich der Wert auf der Parkinson-Evaluationsskala (UPDRS-Wert) im Durchschnitt jedoch nur um 28% besserte. Besonders über 60-jährige Patienten profitierten kaum von der Transplantation, oder ihre Symptomatik (v.a. Gehen und Gleichgewicht) verschlechterte sich sogar (Greene und Fahn,

2002). Trotz dieses relativ schlechten Ergebnisses belegen histologische Untersuchungen, dass die Transplantation von NMZs sowohl Synapsen mit Neuronen der Empfängerstruktur bilden, als auch DA freisetzen können (Reichmann et al., 2003). Ungeachtet dessen ergeben sich bei dem Einsatz von humanem Gewebe ethische Probleme, da relativ viel Material benötigt wird. So benötigt ein einzelner IPS-Patient das Gewebe von 6 – 8 Feten (Olanow et al., 1997; Hagell und Brundin, 2001), um so viele NMZs zu erhalten, dass 100.000 Zellen je Putamen längerfristig überleben, da die Zellverlustrate *in vivo* 80-95% beträgt (Rosenblad et al., 1996; Sortwell et al., 2001).

Um Strategien für ein besseres Überleben der NMZs zu entwickeln, wurden in vielen Arbeitsgruppen Experimente durchgeführt, die zeigten, dass es sinnvoll ist, dem Transplantat Wachstumsfaktoren wie GDNF (Chaturvedi et al., 2003; Yasuhara et al., 2005), BDNF (Canudas, 2005), CNTF (Clatterbuck et al., 1996), sowie Antioxidantien (Brundin et al., 2000) oder Apoptoseinhibitoren (Zhong et al., 1993; Anton et al., 1995) zuzusetzen. Durch eine solche Zugabe kann die Anzahl überlebender NMZs deutlich gesteigert werden (Olanow et al., 1997). Immunologische Probleme spielten bei den klinischen Studien keine Rolle, da das Gehirn nicht über größere Mengen antigenpräsentierender Zellen verfügt und weder Immunglobuline noch inaktivierte T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke passieren können (Bauer et al., 2002). Auch exprimieren ausdifferenzierte ZNS-Neurone weder MHC-1 noch MHC-2 Proteine (Whittemore und Onifer, 2000). Abstoßungsreaktionen bleiben demzufolge auch Jahre nach dem Absetzen der Immunsuppression, die vorsichtshalber oft gegeben wird, aus (Freed et al., 2001; Gerlach et al., 2001). Trotz dieser anfänglichen Erfolge ist es nicht zuletzt wegen der postoperativen Entwicklung und der ethischen sowie organisatorischen Probleme (alle Feten müssen in etwa gleich alt sein und zum selben Zeitpunkt zur Verfügung stehen) sehr unwahrscheinlich, dass humane NMZs in absehbarer Zeit routinemäßig transplantiert werden (Lindvall et al., 2004).

Auf der Suche nach alternativen Zellen werden seit 2001 Studien mit humanen, fetalen Retinaepithelzellen durchgeführt (Reichmann et al., 2003). Dazu wurden bei 6 IPS-Patienten 325.000 Zellen in das Putamen der stärker geschädigten Hemisphäre transplantiert, die ohne Immunsuppression überlebten und die UPDRS-Werte der Patienten um 40-60% besserten (1 Jahr postoperativ). Ihr größter Vorteil dürfte allerdings darin bestehen, dass aus dem Material eines Feten so viele Retinaepithelzellen gewonnen wurden, wie für die Therapie von 180 IPS-Patienten nötig wären.

Um das Problem der Verfügbarkeit zu lösen, zog man auch Xenotransplantate in Betracht, doch Studien mit diesem Material zeigten, neben immunologischen Problemen, nur unbefriedigende klinische Resultate (Larsson und Widner, 2000; Lindvall und Hagell, 2002a).

1.2.3.3 Humane neurale Stammzellen (hNSZ)

Unter einer Stammzelle (SZ) im ZNS wird eine Zelle verstanden, die das Potential hat, sich in Neurone, Astrozyten oder Oligodendrozyten zu differenzieren und sich in ausreichendem Maße selbst zu erneuern (Bauer et al., 2002). Während embryonale hNSZ v.a. in der inneren Zellmasse der Blastozyste vorkommen (Engelhardt et al., 2003), findet man adulte SZ in vielen Geweben: Knochenmark, Muskulatur, Leber, etc. (Engelhardt et al., 2003). Im menschlichen Gehirn konnten neurale SZ u.a. im Hippocampus, der subventrikulären Zone (SVZ), dem Rückenmark sowie im septalen und striatalen Gewebe (Goh et al., 2003) nachgewiesen werden. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen sind diese neuronalen SZ in der Lage ihren Ursprungsort zu verlassen und sich dort anzusiedeln, wo Nervenzellen zu Grunde gegangen sind. Dieser Mechanismus konnte experimentell durch die Gabe bestimmter Faktoren (z.B. FGF-2, EGF, BDNF, u.a.) ausgelöst werden (Mohapel et al., 2005). Die selbe Arbeitsgruppe fand auch Hinweise dafür, dass die Proliferation neuraler SZ in der SVZ durch einen striatalen DA-Mangel erheblich vermindert wird. Das könnte bedeuten, dass beim IPS ein Circulus vitiosus entsteht, bei dem neben dem Verlust dopaminergischer Neurone in der SN auch zusätzlich die Regenerationsfähigkeit des Systems beeinträchtigt wird. Andererseits ist bekannt, dass einige (z.B. cholinerge) Neurone gegebenenfalls ihren Phänotyp ändern und z.B. zu TH-exprimierenden Zellen transdifferenzieren können (Mohapel et al., 2005), um Zellverluste auszugleichen. In anderen Hirnregionen finden sich zwar auch teilungsfähige Zellen, doch sind diese nur in Ausnahmefällen (z.B. nach Hirnläsion) in der Lage Neurone zu bilden („Non-neurogenetic“; Goh et al., 2003). Björklund und Lindvall (2000) vermuten, dass dies eventuell daran liegt, dass diese Zellen in einer solchen Situation andere Faktoren sezernieren, welche die Differenzierung zum Neuron ermöglichen.

Weitere Vorteile neuraler SZ liegen zum Einen in ihrer guten Kultivierbarkeit, durch die ihre Multipotenz und genetische Stabilität nicht beeinträchtigt wird (Goh et al., 2003; Lindvall et al., 2004) und zum Anderen in ihrer nahezu unbegrenzten Expandierbarkeit *in vitro* (Lindvall und Hagell, 2002a).

Um sicherzustellen, dass die generierten Zellen auch wirklich die Fähigkeit zur ausreichenden DA-Synthese haben und kein tumorartiges Wachstum zeigen, muss sowohl die Differenzierung als auch die Proliferation gezielt steuerbar sein. Zur Gewinnung neuronaler

Zellen hat sich der Einsatz des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF), des fibroblastischen Wachstumsfaktors (FGF), sowie des transforming growth factors α (TGF- α) als vorteilhaft erwiesen (Goh et al., 2003).

Ob es günstiger ist die Ausdifferenzierung *in vitro* oder *in vivo* erfolgen zu lassen, wird derzeit noch intensiv untersucht. Differenziert man die Zellen vor der Transplantation (*in vitro*), so wäre neben einer qualitativen und morphologischen Kontrolle auch eine genetische Modifikation möglich, was die Gefahr einer unkontrollierten Proliferation mindern würde (Lindvall et al., 2004). Eine Reifung *in vivo* hingegen würde die funktionelle Integration der Zellen erhöhen (Barberi et al., 2003), was die Restitution verbessern könnte.

Neurale SZ haben ein großes Potential Symptome traumatischer oder neurodegenerativer Erkrankungen zu lindern (Björklund und Lindvall, 2000; Mendez et al., 2000). In klinischen Studien mit humanen, fetalen, mesenzephalen Zellen konnte gezeigt werden, dass die Patienten einen langwährenden (nachweislich 10 Jahre) Vorteil haben. Bei einigen von Ihnen konnte sogar L-Dopa abgesetzt werden, da sich die DA-Freisetzung nach Implantation der Zellen deutlich verbesserte (Lindvall et al., 2004). Allerdings litten 15% der Studienteilnehmer später an schlecht beherrschbaren Dyskinesien (Lindvall et al., 2004). Solche Nachteile und auch die Tatsache, dass die bis dato erzielten Fortschritte der Stammzelltherapie nicht die Ergebnisse einer optimalen DBS-Therapie übertreffen (Vitek, 2002), verdeutlichen den Forschungsbedarf, der zur Etablierung dieses Verfahrens noch notwendig ist.

1.2.3.4 Immortalisierte neurale Progenitoren

Unter Immortalisierung wird die Modifikation von Vorläuferzellen (Progenitorzellen) einer Zelllinie verstanden, durch welche sie die Fähigkeit zur permanenten Zellteilung behalten (Bernstein et al., 1999). Immortalisierte SZ lassen sich durch die virale Transfektion von Onkogenen erzeugen (Whittemore und Onifer, 2000). Eine Möglichkeit ist die Transfektion der Progenitorzellen mit dem Simian-Virus-40-Large-T-Antigen, welches darüber hinaus noch eine temperaturgesteuerte Proliferationskontrolle gestattet (Cattaneo und Conti, 1998; Whittemore und Onifer, 2000). Durch diese Modifikation proliferieren die Progenitorzellen bei 33° C nahezu unbegrenzt und stellen ihre Zellteilung erst dann wieder ein, wenn die Temperatur auf über 37° C angehoben wird. Bei einer Temperatur von 38-39° C beginnen sie sich zu differenzieren. Der Proliferationsstop ab 37° C lässt sich auf eine thermische Instabilität des Large-T-Antigens zurückführen, was zu einer Konformationsänderung und damit zum Funktionsverlust des Proteins führt (Whittemore und Onifer, 2000).

Da die so entstandenen Kulturen viele verschiedene Vorläuferzellen enthalten, werden einzelne Zellen entnommen und charakterisiert, was zur Generierung einzelner klonaler Zelllinien, wie z.B. der CSM14.1.-Linie, führte (Gage et al., 1995). Immortalisierte SZ-Linien haben den Vorteil, dass sie unter Laborbedingungen genetisch modifiziert werden können, um den Anforderungen des Transplantationsgebietes zu entsprechen. Desweiteren lassen sich durch solche Eingriffe Fähigkeiten der Zelle wie Wachstumsverhalten und Proteinexpression besser einschätzen, um z.B. das Risiko einer Tumorgenese zu minimieren. Snyder und Mitarbeiter (1992) konnten nachweisen, dass immortalisierte Zellen sich *in vivo* nicht unkontrolliert teilen, da die Onkogen-Expression – wie oben ausgeführt – nach der Transplantation in das wärmere Wirtsgewebe herunterreguliert wird. Allerdings ist es bislang nicht möglich sichere Aussagen darüber zu treffen, in welche Richtung sich die Zellen nach der Transplantation entwickeln werden, da die Plastizität der Zellen *in vivo* sehr ausgeprägt ist und sich nicht alle Zellen, weder *in vitro* noch *in vivo*, gleich verhalten (Whittemore und Onifer, 2000). Die zuletzt genannte Arbeitsgruppe entdeckte auch, dass immortalisierte Progenitorzellen, welche in Versuchstiere transplantiert wurden, vorrangig den gleichen Phänotyp annahmen, wie die Zellen der Umgebung, und in die gleiche Richtung differenzierten wie die umgebenden bzw. regional abgestorbenen Zellen (Whittemore und Onifer, 2000). Dies weckte Hoffnungen in traumatisch oder degenerativ veränderten Hirnregionen die untergegangenen Zellen gezielt ersetzen zu können. Diese Erwartungen wurden jedoch durch die Beobachtung von Lundberg und Mitarbeiter (1997) gedämpft, die herausfanden, dass sowohl das Überleben, als auch die Differenzierung der transplantierten Progenitoren wesentlich schlechter ausfielen, wenn keine oder nur wenige intakte Zellen in dem Empfängergewebe vorhanden waren. Damit limitiert sich die Anwendung dieser Zellart in traumatisch oder degenerativ stark veränderten Gehirnen (Lundberg et al., 1997).

1.2.3.5 Die CSM14.1 – Zellen

Der Vorteil von temperatursensitiven Zellen, wie den von uns verwendeten CSM14.1-Zellen, liegt vor allem in ihrer guten Modifizierbarkeit und Steuerbarkeit. So konnten Anton und Mitarbeiter bereits 1994 zeigen, dass Zellen dieser Linie durch Transfektion des Large-T-Antigens - wie im vorhergehenden Abschnitt ausgeführt - immortalisiert werden können, ohne dass eine Tumorgenese nach der Transplantation auftrat. Desweiteren erfüllen diese Zellen die Anforderungen, die an ein Transplantat zu stellen sind (Anton et al., 1994).

CSM14.1-Zellen:

- a) sind expandierbar,
- b) sind fähig zur gezielten Differenzierung,
- c) sind transfizierbar und gut steuerbar,
- d) sind nicht immunogen,
- e) zeigen langfristiges Überleben nach Transplantation,
- f) weisen eine funktionelle Integration nach Transplantation auf.

Wie Haas und Wree 2002 berichteten, können diese Zellen bei 33° C und unter Zugabe von 10% fetalem Kälberserum (FKS) zur Proliferation angeregt werden. Reduziert man das FKS in der Nährlösung auf 1% und erhöht die Temperatur auf 39° C – was der Temperatur im Rattenhirn entspricht (Gordon, 1990) – stellen die Zellen ihre Proliferation ein und beginnen sich zu differenzieren. Während die proliferierenden CSM14.1-Zellen kleine Zellkörper mit kurzen Fortsätzen aufweisen und in hohem Maße Nestin bilden, so nähert sich ihre Morphologie nach ein bis zwei Wochen bei 39° C derer von Neuronen an, was mit erhöhten Werten der Neuronenmarker NeuN und neuronenspezifischer Enolase (NSE) einhergeht (Haas und Wree, 2002). In bisherigen Tierexperimenten zeigten die CSM14.1-Zellen eine deutlich gesteigerte und über mindestens zwei Monate anhaltende DA-Produktion, was zu einer signifikanten motorischen Verbesserung von experimentellen Parkinson-Tieren führte (Anton et al., 1994).

1.3 Tiermodelle des Morbus Parkinson

Die Zellersatztherapie stellt eine grundlegend neue Therapiemöglichkeit in Aussicht, da sie – im Idealfall – sowohl die Krankheitssymptome als auch die Dosis, und damit die Nebenwirkungen, der anti-Parkinson Medikamente reduzieren könnte (Freed et al., 2001; Bauer et al., 2002; Lindvall und Hagell, 2002a). Um die Überlebensrate der Zellen und ihre funktionelle Integration zu verbessern, ist es notwendig die Interaktion der transplantierten Zellen mit dem Empfängergerewebe zu analysieren. Da sich solche Untersuchungen am Menschen aus ethischen Gründen verbieten, werden Tiermodelle des IPS verwendet, die die Situation im Menschen reproduzieren (Beal, 2001). Im Folgenden wird v.a. von neonatalen und adulten Tieren gesprochen. Da es in der Literatur keine festen zeitlichen Definitionen für diese Begriffe gibt, seien diese im Rahmen dieser Arbeit wie folgt definiert: Neonatal (P₀ - P₇), Juvenil (P₈ - P₂₀), Adult (> P₂₀).

1.3.1 Das 6-Hydroxydopamin Läsionsmodell

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) ist ein neurotoxischer Metabolit, der spezifisch von dopaminergen Neuronen aufgenommen und durch das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH) verstoffwechselt wird (Breese et al., 2005). Experimente mit diesem Toxin werden bereits seit 1968 von Ungerstedt durchgeführt. Nach der intraventrikulären Injektion diffundiert das Toxin in das Gewebe, wird durch den Dopamin-Transporter (DAT) in DA-Neuronen aufgenommen und akkumuliert dort (Beal, 2001). Dies führt zur Bildung großer Mengen freier Radikale, welche zum schnellen Untergang dieser Neurone führen (siehe Kapitel 1.1.1). Die Bildung intrazellulärer Einschlüsse (Lewy-Körper), wie sie für das IPS typisch sind, ist nach stereotaktischer 6-OHDA Injektion nicht zu beobachten (Dawson et al., 2002). Auch degenerieren bei diesem Modell die Neurone nicht so langsam wie beim IPS (Betarbet, 2000). Das Ausmaß der dopaminergen Deafferenzierung kann bei unilateral geschädigten, adulten Ratten *in vivo* quantifiziert werden, indem nach Applikation von Amphetamin oder Apomorphin das Rotationsverhalten der Tiere beobachtet wird (Rotationstest), was einen Vorteil gegenüber anderen Läsionsarten darstellt (Ungerstedt, 1973; Abrous et al., 1993). Die Zuverlässigkeit des Rotationstests als Kriterium für das Ausmaß der dopaminergen Deafferenzierung wurde u.a. 1983 durch Björklund und Mitarbeiter belegt.

Nach einer intraventrikulären 6-OHDA Injektion (11 µg/µl) degenerieren zunächst ca. 98% der dopaminergen SN-Neurone (Snyder-Keller et al., 1989). Ein solcher Zelluntergang - bedingt durch retrograde Degeneration - tritt auch nach intrastriataler Applikation dieses Fehlmetaboliten auf. Er ist auf die ipsilaterale SN begrenzt und erfolgt mit zeitlicher Verzögerung (Beal, 2001). Die Applikation des Neurotoxins 6-OHDA zu verschiedenen Zeitpunkten der Hirnentwicklung hat unterschiedliche Auswirkungen auf das sensorische System von Ratten (Joyce et al., 1996; Moy et al., 1997; Neal-Beliveau et al., 1999). Eine Applikation dieses Toxins in die Ventrikel, das CPu oder das mediale Vorderhirnbündel ruft bei adulten Tieren schwere motorische Ausfälle hervor, wobei die Schwere der Störungen direkt mit dem Ausmaß der striatalen DA-Depletion korreliert (Joyce et al., 1996). Bei neonatalen Ratten verursachte eine solche Läsion keine größeren motorischen Einschränkungen (Neal-Beliveau et al., 1999). Bis zum 27. Lebenstag wird die DA-Depletion ohne größere sensomotorische Ausfälle toleriert (Weihmuller und Bruno, 1989). Die Gründe für diese Auffälligkeit werden in Kapitel 4.1 diskutiert. Auf Grund der effektiven und selektiv-dopaminergen Deafferenzierung, verbunden mit dem gut quantifizierbaren Rotationsparameter, eignet sich dieses Modell zur Generierung eines IPS-Tiermodells.

1.3.2 Andere Läsionsmodelle – Eine Kurzvorstellung

1.3.2.1 Das Rotenon-Modell

Die Möglichkeit, dass Pestizide oder andere Umweltgifte an der Entstehung des IPS beteiligt sind, wird seit längerem diskutiert (Betarbet et al., 2000). Versuche mit dem Pestizid Rotenon® stützen diese Hypothese. Das Rotenon-Modell zeichnet sich durch einen langsamen, progredienten Verlust dopaminerger Neurone aus und führt zu deutlichen motorischen Defiziten. Auch kann hier die Entstehung von Zelleinschlüssen beobachtet werden, die den Lewy-Körperchen sehr ähnlich sind (Dawson et al., 2002). Rotenon wirkt jedoch bei Ratten unzuverlässig (Beal, 2001), so dass sich dieses Modell für vergleichende Untersuchungen nicht eignet.

1.3.2.2 Das MPTP-Modell

N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) ist eine chemische Verbindung, deren zellschädigende Wirkung zufällig entdeckt wurde, nachdem eine Gruppe Drogenabhängiger 1982 in Kalifornien akut an Parkinson erkrankte. Bei dem Versuch selbst Heroin herzustellen, fiel MPTP als Nebenprodukt an (Beal, 2001). Das lipophile MPTP gelangt sehr schnell ins Gehirn und wird dort durch die Monoaminoxidase B (MAO-B) der Astrozyten zu 1-methyl-4-pyridinium (MPP^+) metabolisiert, welches eine sehr hohe Affinität zum DA-Transporter besitzt (Bezard et al., 1999) und folglich in diesen Neuronen akkumuliert (Betarbet, 2000). Über eine Inhibition des Komplex 1 der mitochondrialen Atmungskette, kommt es zur Bildung freier Radikale mit konsekutivem Zelltod (Tipton und Singer, 1993). Das gefährlichste dieser Radikale ist vermutlich das Peroxynitrit, das durch die Reaktion eines $\text{NO}\cdot$ mit einem Sauerstoffradikal ($\text{O}_2\cdot$) entsteht. Ein weiterer Beleg für diese Hypothese ist die Existenz von 3-Nitrotyrosin, ein Marker für Peroxynitrit-Schäden (Schulz et al., 1995), der sich auch im Gehirn von IPS-Patienten nachweisen lässt (Beal, 2001). Der Komplex-1-Defekt betrifft sehr selektiv DA-Neurone, welche allerdings keine Lewy-Körperchen aufweisen (Beal, 2001). Die Degeneration der Neurone in der SN verläuft nach MPTP-Applikation sehr schnell (Beal, 2001), was die Vergleichbarkeit dieses Modells mit dem humanen IPS weiter einschränkt. MPTP und seine Derivate wirken nicht bei der Ratte.

1.4 Transplantationsorte und –arten

Um die funktionelle Integrität des nigro-striatalen Systems wiederherzustellen, gibt es verschiedene Ansätze. Bisher wurden insbesondere die Regionen, in welche das Spendergewebe transplantiert werden soll, sowie die Art der Aufbereitung und die

Applikation des Materials analysiert. Wie Björklund und Mitarbeiter (1983) bei Experimenten mit dopaminergem Gewebe herausfanden, kann ein Transplantat in fast jeder Hirnregion überleben, aber die Fähigkeit der dopaminergen Zellen zur Axonbildung ist nach bisherigen Erkenntnissen vornehmlich in Regionen, die physiologisch dopaminerg innerviert sind, erheblich größer. Dazu zählen in erster Linie das CPu und der Nucleus accumbens (Björklund et al., 1983). Anfänglich wurde versucht, homotop (in die SN) zu transplantieren, wobei zwar eine dopaminerge Differenzierung beobachtet werden konnte, bei der jedoch das Faserwachstum auf 1-2 mm beschränkt blieb, was nicht genügt, um die nigro-striatale Projektion wiederherzustellen (Mendez et al., 2000). Ein großer Vorteil der homotopen Transplantation liegt darin, dass diese Zellen funktionell besser integriert werden. Sie erhalten Afferenzen vom Kortex und dem Nucleus subthalamicus (STN), welche für eine physiologische (pulsatile) Entladung der DA-Neurone sorgt (Nikkhah et al., 1994). Desweiteren beobachtete diese Arbeitsgruppe, dass eine reinnervierte SN die Funktion des reinnervierten CPu im Sinne einer „Feinjustierung“ positiv beeinflussen kann. Ein langstreckiges Faserwachstum nigraler Transplantate, die in der Lage waren das Striatum zu erreichen, gelang bisher nur in neonatalen Tieren oder bei Adulten mittels „Brückentechnik“ (Nikkhah et al., 1995a; Mendez et al., 1996). Dabei werden dem Tier zwei Transplantate eingesetzt: Eines in die SN (homotop) und ein zweites in das CPu (ektop), welches den aussprossenden Neuronen des homotopen Transplantats als „Führung“ dient (Mendez et al., 1996). Auch wenn es also einige Argumente gibt, die eine homotope Transplantation befürworten, so bleibt doch weiterhin die schlechte Überlebensrate, welche im Vergleich zum CPu nur ca. ein Achtel beträgt, ein entscheidender Nachteil. Im CPu überleben im Durchschnitt 12 von 1000 transplantierten Zellen längerfristig. In der SN sind es nur 1,7 von 1000 (Nikkhah et al., 1995a).

Die Hürde der großen Entfernung zwischen SN und Striatum konnte im Tierversuch mit ektopen Transplantaten umgangen werden. Bei diesem Verfahren werden die Zellen direkt an den Wirkort des Dopamins verbracht. Die transplantierten Zellen haben hier nicht nur eine ca. 8-fach höhere Überlebensrate (siehe oben), sondern innervieren im Durchschnitt auch einen Radius von 2,5 mm, wodurch es möglich ist, eine großflächigere Reinnervation zu erzielen (Olanow et al., 1997). Die zuletzt genannte Arbeitsgruppe zeigte in klinischen Studien auch, dass mit diesem Verfahren die Symptomatik von IPS-Patienten beeinflusst werden kann: So führt eine Transplantation in das dorsale CPu v.a. zur Besserung motorischer Defizite, während eine Reinnervation des ventralen CPu vordergründig die sensomotorischen Symptome lindert (Olanow et al., 1997). Generell gilt, dass das Spendergewebe möglichst

bald nach der Entnahme transplantiert werden sollte. Dabei können die Zellen in „Gewebsblöcken“ oder als Lösung zugeführt werden. Auch wenn die Überlebensrate bei beiden ähnlich ist (Olanow et al., 1997), so bietet Letzteres doch die Möglichkeit, die DA-Zellen in der Lösung anzureichern oder das Material mehrerer Spender einzubringen (Björklund et al., 1983).

1.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

In das adulte Ratten-Striatum transplantierte CSM14.1-Zellen differenzierten sich nicht zu einem dopaminergen Phänotyp, wurden nicht in das nigro-striatale System integriert und führten auch im Rotationstest nicht zu Verbesserungen (Bentlage et al., 1999). Da diese Zellen die funktionelle Integrität des nigro-striatalen Systems nicht wieder herstellen, stellt sich die Frage nach den Ursachen hierfür.

Diese Arbeit setzt sich mit der Frage auseinander, wie sich CSM14.1-Zellen im neonatalen Milieu des CPu entwickeln, welches ein völlig anderes ist als das adulte (Saunders et al., 1999). Um dieser Frage nachzugehen, wurden neugeborene Ratten (P₁) mithilfe des Neurotoxins 6-OHDA bilateral läsiert und zwei Tage später (P₃) unilateral transplantiert. In das rechte Striatum wurden ca. 100.000 immortalisierte CSM14.1-Zellen stereotaktisch injiziert (siehe Kapitel 2). Nach 5 Wochen beurteilten wir die motorischen Leistungen anhand des Zylindertests. Eine Woche später wurden die Tiere perfundiert und das Striatum immunhistochemisch aufgearbeitet. Folgenden Fragen sollen beantwortet werden:

- a) Differenzieren sich die transplantierten CSM14.1-Zellen im Milieu der neonatalen Ratte zu dopaminergen Neuronen?
- b) Wie stark ist die TH-Immunreaktivität der transplantierten Tiere?
- c) Ändert sich das motorische Verhalten der transplantierten Tiere beim Zylindertest im Vergleich zu Kontroll- und nur läsierten Tieren?

Um abschätzen zu können wie viele der CSM14.1-Zellen tatsächlich den dopaminergen Differenzierungsweg eingeschlagen haben, betrachteten wir die Doppelmarkierung von PKH-26 und der TH-Immunfluoreszenz.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und zeitlicher Ablauf

Die Untersuchungen erfolgten an 33 männlichen Wistar Ratten (*Rattus norvegicus*, Charles River WIGA, Sulzfeld, Deutschland), welche in drei Gruppen eingeteilt wurden. Jeweils 6 neonatale Ratten kamen zusammen mit dem Muttertier in einen Makrolonkäfig (ca. 720 cm² Fläche), wo sie unter einem künstlichen 12-Stunden Hell-Dunkel Rhythmus bei $22 \pm 2^\circ \text{C}$ im Tierstall des Instituts für Anatomie der Universität Rostock gehalten wurden. Die Jungtiere wurden gesäugt und die Muttertiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardnahrung (Ssniff, Soest, Deutschland). Alle Tiere wurden, gemäß geltendem Tierschutzrecht und den Auflagen der zuständigen Behörden behandelt.

Untersucht wurden eine Kontrollgruppe ($n = 10$), deren Tiere weder läsioniert noch transplantiert wurden, eine Gruppe bilateral läsionierter Tiere ($n = 17$), sowie sechs Tiere, die nach bilateraler Läsion unilateral transplantiert wurden.

Die Läsion erfolgte am Tag 1 nach der Geburt (P_1), die Transplantation am 3. postnatalen Tag (P_3), und die Testung der Ratten im Zylindertest wurde im Alter von 5 Wochen durchgeführt (Abb. 2). Eine Woche später wurden die Tiere perfundiert, die Gehirne entnommen und der immunhistochemischen Auswertung zugeführt.



Abb. 2: Der zeitliche Ablauf im Überblick (nicht proportional).

2.2 Bilaterale 6-OHDA Läsion (dopaminerge Deafferenzierung)

Einen Tag nach der Geburt (P_1) wurden 23 Ratten nacheinander läsioniert, nachdem sie für 5 Minuten auf Eis gelegt und somit hypothermisch narkotisiert waren. Mit einem sagittalen Schnitt wurde die Kopfhaut eröffnet und der Rattenkopf in einem Neonatal Rat Adapter Stereotaxierahmen (Stoelting Co, II, USA), der in einem Stereotaxiegerät (Kopf, Tujunga, CA, USA) befestigt wurde, in der „Flat-skull“ Position eingespannt, indem zwei Metallstifte in die äusseren Gehörgänge eingeführt wurden und der Gaumen auf einer Vorrichtung ruhte. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Schädeloberfläche genau horizontal zu liegen kam. Ein über die Nase geführter Metallbügel stabilisierte das Tier in dieser Position. Die Einstellung

der Kanüle (in Bezug auf Bregma) erfolgte anhand von - in der Literatur vorgegebenen - Koordinaten (Nikkah et al., 1994).

Mittels eines Handstückbohrers (Reco Dental, Wiesbaden, Deutschland) wurde die Schädelkalotte an diesen Stellen kleinflächig (1,5 mm Durchmesser) trepaniert und die Dura mater mit einer sterilen Kanüle eröffnet. Zur Entfernung der Knochenspäne wurde die Wunde mit steriler Kochsalzlösung gespült. Eine 5 µl Hamilton® Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz), mit aufgesetzter Glaskapillare (Nikkah et al., 1994) wurde in die Halterung des Stereotaxiegerätes gesetzt und die Kanüle zu folgenden Koordinaten (im Bezug zum Bregma) vorgeschoben: AP -0,6; L \pm 0,8; -2,1 (Dura). Da das mediale Vorderhirnbündel bei neonatalen Ratten für eine gezielte Läsion noch zu klein ist, applizierten wir das Neurotoxin bilateral intraventrikulär. Nach einer Minute Wartezeit wurde in jeden Lateralventrikel 2 µl 6-Hydroxydopaminhydrochlorid-Lösung (120 µg/10µl des 6-OHDA-HCL (Sigma) in 0,2 mg/ml Ascorbinsäure-0,9% NaCl-Lösung) injiziert. Anschließend wurde die Kanüle für ca. 2 min im Gewebe belassen und dann langsam herausgezogen. Nachdem die Kopfhaut vernäht war, kamen die Tiere auf eine ca. 30° C warme Heizplatte und wurden bis zum Erwachen aus der Narkose beobachtet.

2.3 Die Transplantationsvorbereitung

2.3.1 PKH-26-Markierung der CSM14.1-Zellen

Bevor die CSM14.1-Zellen den Tieren implantiert werden konnten, musste sichergestellt werden, dass man sie in den entstehenden Hirnschnitten wieder sicher identifizieren kann. Dazu wurden die Zellen im Vorfeld mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff PKH-26 (Horan und Slezak, 1989; Haas et al., 2000) markiert.

Die PKH-markierten Zellen wurden bei einer Temperatur von 33° C in einem 10% FKS haltigem DMEM Medium (Gibco) kultiviert. Nach Beendigung der Kultivierung wurden die Zellen 20 min trypsiniert (Gibco) und anschließend bei 400 g in einer „Labofuge 200“ zentrifugiert. Hiernach wurden die CSM14.1-Zellen erneut in die 10% FKS-DMEM Lösung überführt und das Trypsin neutralisiert. Es folgten drei Waschschrte in serumfreiem DMEM und eine fünfminütige Inkubation in der PKH-26/Diluent-C Markierungslösung (Sigma). Durch Zugabe von FKS wurde die Markierungsreaktion beendet und die Zellen erneut bei 400 g zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurden die Zellen dreimal in serumfreiem DMEM gewaschen.

Um zu gewährleisten, dass alle Tiere bei der Transplantation die gleiche Anzahl an Zellen erhalten, musste die Zahl der Zellen in der Lösung bestimmt und auf einen festen Wert eingestellt werden. Mit einem Hämatozytometer (Neubauer-Zählkammer, Fischer Scientific) und einer Trypan-Blau Färbung (Sigma) wurde die Anzahl lebender Zellen ermittelt und auf ca. 100.000 vitale Zellen je μl DMEM eingestellt. Bis zur Transplantation wurde die Zellsuspension bei 4°C gelagert. Im Anschluss an die Transplantation (ca. 12 h nach der Markierung) wurde die Anzahl der lebenden Zellen erneut ermittelt. Die Auszählung ergab, dass auch zu diesem Zeitpunkt noch $> 90\%$ der Zellen vital waren. Um die Vitalität der nicht-transplantierten Zellen beurteilen zu können, wurde das bei der Transplantation nicht benötigte Material erneut bei 33°C über Nacht inkubiert.

2.3.2 Intrastriatale Transplantation der PKH-26-markierten CSM14.1-Zellen

Nachdem die Tiere am ersten Lebenstag (P_1) bilateral läsioniert worden waren, wurden sie am dritten Tag (P_3) der Transplantation ($n = 6$) unterzogen. Dazu wurden sie erneut für 5 min hypothermisch narkotisiert und anschließend im Stereotaxiegerät (Kopf, Tujunga, CA, USA) fixiert (siehe Läsion). Nachdem die Kopfhaut eröffnet und der Referenzpunkt (Bregma) freipräpariert war, konnten die stereotaktischen Positionen eingestellt werden (Nikkah et al., 1994). Der Schädel wurde – wie schon bei der Läsion – mit einem Handstückbohrer (Reco Dental, Wiesbaden, Deutschland) trepaniert und der OP-Situs mit steriler, physiologischer NaCl-Lösung gespült. Das Mikrotransplantat wurde mittels einer Glaskapillare, die einen Aussendurchmesser von ca. 50-70 μm hatte und an einer 5 μl Hamilton® Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) befestigt war, injiziert. 1 μl der Transplantatlösung (ca. 100.000 Zellen) wurde in das rechte Striatum injiziert (Koordinaten: AP +0,7; L -1,8; V -2,9. [Dura] im Bezug zum Bregma). Nach einer kurzen Wartezeit von 1 min wurde die Kanüle durch langsames Zurückziehen entfernt und die Kopfhaut vernäht. Anschließend wurden die Tiere bis zum Narkoseende wiederum auf einer Wärmplatte erwärmt.

2.4 Verhaltenstestung im Zylindertest

Der hier angewandte Zylindertest ist ein motorischer Test, der die Asymmetrie im Gebrauch der Vorderpfote bei unilateral läsionierten und / oder bilateral läsionierten und anschließend unilateral transplantierten Tieren zeigt. Er wurde 1990 erstmals von Schallert und Lindner beschrieben und durch Schallert und Tillerson (1999) modifiziert. Der Test basiert auf der instinktiven Erkundung einer neuen Umgebung (z.B. Glaszylinder), welche Ratten durchführen, sobald sie in die neue Umgebung gelangen. Sie richten sich im Glaszylinder auf und

tasten – ohne einen weiteren Stimulus, weder pharmakologisch noch durch den Untersucher – die Zylinderwand mit ihren Vorderpfoten ab. Hinter dem Zylinder werden zwei Spiegel installiert, die im Winkel von 90° zueinander stehen, um das Tier auch dann noch genau beobachten zu können, wenn es sich vom Untersucher abwendet (Abb. 3).

Alle Tiere wurden im Zylindertest getestet. Dazu wurden die Ratten in den Glaszylinder (20 cm Durchmesser) gesetzt, vor dem ein Videosystem (Sony) aufgebaut war. Mit Hilfe der Videoaufzeichnung wurden nun die ersten 30 aufeinanderfolgenden, zeitunabhängigen Wandberührungen der Vorderpfoten gezählt und das Verhältnis zwischen dem Gebrauch der rechten (ipsilaterale Transplantatseite) und linken (kontralaterale Transplantatseite) Pfote für die jeweiligen Gruppen ermittelt.

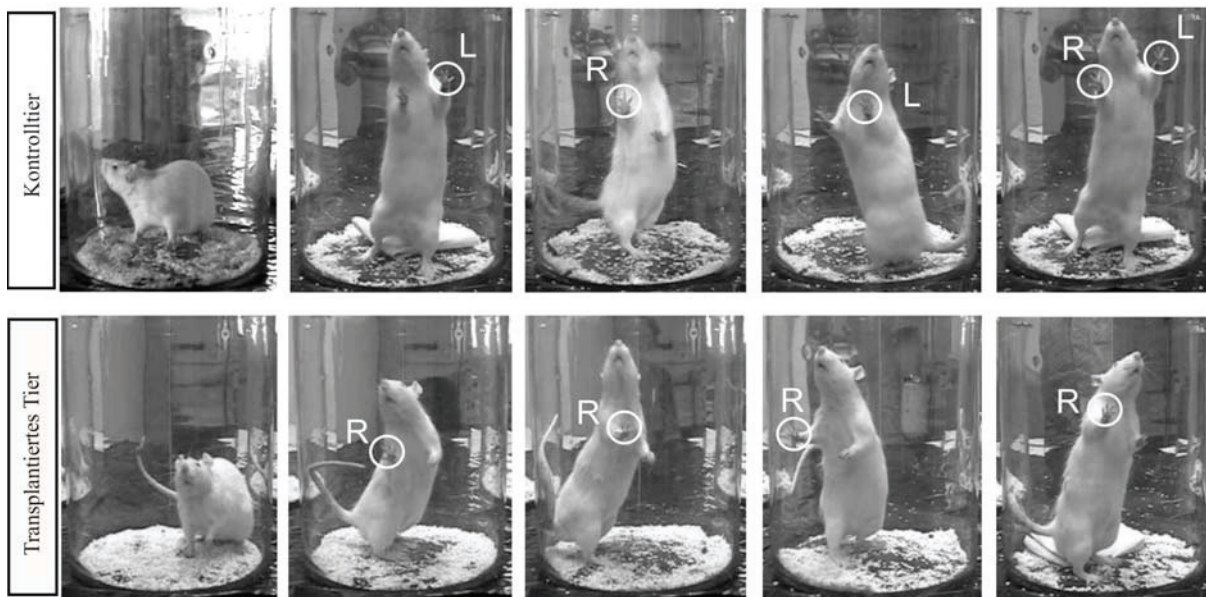


Abb. 3: Zylindertest. Die unilateral transplantierten Tiere wurden zuvor bilateral läsiert. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt ein linksseitig-transplantiertes Tier früherer Versuche und soll nur den Ablauf des Zylindertests veranschaulichen. Unsere transplantierten Tiere nutzten überwiegend die linke Vorderpfote.

2.5 Gewinnung und Aufarbeitung der Hirne

Nachdem alle Tests durchgeführt waren, wurden die Tiere in ihrer 6. Lebenswoche perfundiert. Dazu bekamen sie 90 mg/kg Pentobarbital- Na^+ (Serva) zur Narkose intra-peritoneal appliziert. Nach Wirkungseintritt wurde das Tier in Rückenlage auf einer festen Unterlage fixiert und der Thorax mit einer spitzen Schere eröffnet. Danach wurde der linke Herzventrikel eröffnet, und eine dünne Glaskanüle bis zur Aorta ascendens vorgeschoben und dort fixiert. Um den Abfluß des Blutes zu gewährleisten, wurde das rechte Herzatrium ebenfalls eröffnet. Anschließend wurden 50 ml 4° C kalte 0,9%ige NaCl-Lösung über ein Infusionssystem (Druck ca. 100 mm/Hg) in den Organismus geleitet, um das Blut auszuspülen. Daran schloss sich die Perfusion mit ca. 300 ml 4° C kaltem, 4%igem Paraform-

aldehyd (PFA; in 0,1 M PBS, pH = 7,4) an. Anschließend wurden den Tieren die Hirne entnommen und zur Nachfixierung für 4 h in 4° C kalte Perfusionslösung gelegt. Zur Kryoprotektion wurden die Hirne über Nacht in einer 20%igen Saccharose - PBS - Lösung bei 4° C equilibriert und anschließend für 5 min. in –50° C kaltes Isopentan (Roth, Best.-Nr. 39261) gelegt. Nachdem die Hirne gefroren waren, wurden sie einzeln in Metallfolie verpackt und bis zu ihrer Aufarbeitung bei –80° C gelagert.

In der Folge wurden im Kryostaten (Jung CM 3000 Leica, Germany) bei –23° C Kammer-temperatur 30 µm dicke Hirnschnitte angefertigt. Die Schnitte der zu untersuchenden Region wurden in 0,1 M PBS (pH 7,4) gefüllte 24er Zellkulturgefäße (Nunc, Deutschland) gelegt. Um eine homogene Verteilung der Schnitte in den einzelnen Färbungen zu erreichen, wurden diese nach einem bestimmten Schema auf die Schalen verteilt, von denen hier die ersten beiden dargestellt sind (Abb. 4).

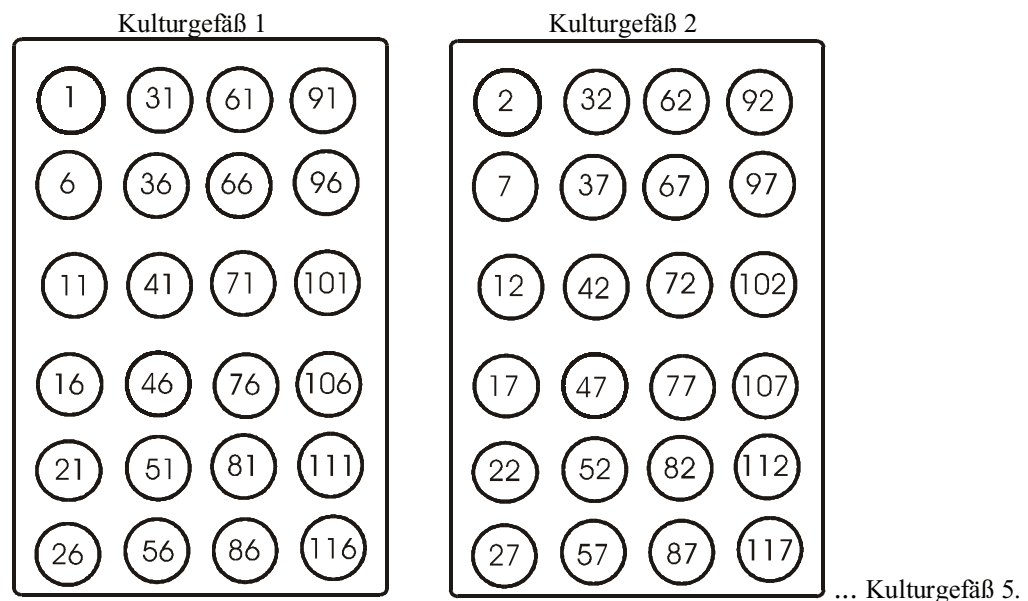


Abb. 4: Schema der systematischen Schnittverteilung in den Kulturgefäßen. Die Zahl im Kreis gibt die jeweilige Nummer der kontinuierlich gesammelten Schnitte an.

2.6 Auswahl der Schnitte

Da für die Untersuchung des CPU von zentralem Interesse ist, wurde mit dem Aufnehmen der Schnitte begonnen, sobald das Corpus callosum als einheitliches Gebilde sichtbar wurde, da sich so das Striatum ab dem ersten Drittel untersuchen ließ und die Schnitte eine ausreichende mechanische Stabilität aufwiesen. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Schnitte kontinuierlich gesammelt und in die mit PBS (0,1 M, pH 7,4) gefüllten Gefäße überführt. Nachdem das Striatum komplett aufgenommen war (5 Serien á 20 Schnitte), wurden so viele

Schnitte verworfen, bis sich ein erster, diagnostizierbarer Anschnitt der Substantia nigra zeigte. Diese wurde in analoger Weise aufgenommen (5 Serien á 16-20 Schnitte) und der immunhistochemischen Färbung zugeführt. Die fünf Serien jeder Hirnregion, die man dadurch gewann, wurden folgenden histologischen, enzymhistochemischen und immunhistochemischen Färbungen unterzogen:

- Serie I - Nisslfärbung
- Serie II - Markscheidenfärbung / Acetylcholinesterase - Färbung (AChE)
- Serie III - Anti-Tyrosin-Hydroxylase - Färbung (Anti-TH-Färbung)
- Serie IV - Anti-NeuN - Färbung
- Serie V - Anti-GFAP - Färbung

Dieses Färbeschema wurde nur bei den nicht-transplantierten Tieren durchgeführt. Tiere, die ein Transplantat erhielten, wurden gemäß Abschnitt 2.7.4. behandelt.

2.7 Verwendete Antikörper

Da die immunhistochemische Färbung auf Antigen-Antikörper Reaktionen beruht, sollen in diesem Abschnitt die verwendeten Antikörper, sowie die Funktionen der Proteine, an welche sie binden, kurz vorgestellt werden.

Tab. 1: Tabellarische Zusammenstellung der verwendeten Antikörper.

Antikörper [Herkunft]	Konzentration DAB-Färbung	Konzentration Fluoreszenz	Zielstruktur	Hersteller	Best.-Nr.
Anti-TH [Maus]	1:1000	1:500	dopaminerge & (nor-)adrenerge Zellen	Sigma	T1299
Anti-NeuN [Maus]	1:1000	1:1000	Neurone	Chemicon International	MAB377
Anti-GFAP [Maus]	1:400	1:400	Astrozyten	Sigma	G3893
Anti-NF 200 [Kaninchen]	--	1:100	Neurone	Sigma	N4142
Anti-Nurr 1 [Maus]	1:200	--	dopaminerge Zellen	Transduction Laboratories	N83220
Anti-Maus CY2 [Ziege]	--	1:400	Maus-AK	Jackson ImmunoResearch	115-226-003
Anti-Rabbit AMCA [Ziege]	--	1:100	Kaninchen -AK	Jackson ImmunoResearch	111-156-003

2.7.1 Primärantikörper

2.7.1.1 Neuronale Marker

Neuronale Marker werden eingesetzt, um Nervenzellen in einem zu untersuchenden Gewebe zuverlässig erkennen und von Gliazellen unterscheiden zu können. Im Folgenden werden die Marker besprochen, die in unserer Arbeit am aussagekräftigsten waren.

a) Anti-Tyrosin-Hydroxylase (Anti-TH)

Die Tyrosin-Hydroxylase ist das limitierende Enzym der Katecholamin-Synthese, welches die Umwandlung von L-Tyrosin zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) katalysiert (Betarbet et al., 1997). Das Enzym ist ein Tetramer aus vier gleichen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 60-68 kDa (Meyers et al., 1996a). Hauptsächlich kommen dopaminerge Neurone im ZNS und im Nebennierenmark vor und lassen sich durch Anti-TH sicher identifizieren, wobei Anti-TH nicht nur die Somata, sondern auch deren Axone darstellt (Asan, 1993). Der monoklonale TH-Antikörper bindet an das N-terminale Ende des Enzyms, das die regulatorische Domäne des Proteins beherbergt (Meyers et al., 1996a). Die Erbinformationen für die Tyrosin-Hydroxylase wird nur durch ein Gen codiert, was bei den meisten Spezies (auch der Ratte) dazu führt, dass es nur eine Form dieses Enzyms gibt. Lediglich bei den Primaten werden durch alternatives Spleißen bis zu vier Isoformen dieses Enzyms erzeugt (Haycock, 2002; Parareda et al., 2003).

In unserer Arbeit wurde Anti-TH (Sigma; Klon TH-2) bei der DAB-Färbung in der Verdünnung 1:1000 und bei der Immunfluoreszenz in der Verdünnung 1:500 angewendet.

b) Anti-Neuronal Nuclei Antikörper (Anti-NeuN)

NeuN ist ein Kernprotein, welches von nahezu jeder Nervenzelle exprimiert wird, dessen Funktion aber bislang unbekannt ist (Mullen et al., 1992).

Der neuronenspezifische Kernprotein-Antikörper (Klon A-60, aus der Maus, monoklonal, Chemicon, Deutschland) reagiert sowohl mit zentralen als auch mit peripheren Nervenzellen der meisten Wirbeltiere. Nur wenige Zellen exprimieren dieses Protein nicht und lassen sich dementsprechend auch nicht anfärben. Dazu gehören z.B. die Purkinjezellen des Kleinhirns oder die Mitralzellen des Bulbus olfactorius (Mullen et al., 1992). Von NeuN ist bekannt, dass es ca. 48 kDa schwer ist und nicht zu den Kernmatrixproteinen gehört (Gage et al., 1995). Die Färbung konzentriert sich zwar auf den Zellkern, ist aber auch im Zytoplasma noch deutlich erkennbar. Da dieses Protein erst in postmitotischen Zellen exprimiert wird, bleiben proliferierende Zellen bei dieser Färbung unerkant (Chemicon Produktinformation). Anti-

NeuN wurde von uns sowohl bei der DAB-Färbung als auch bei der Immunfluoreszenz in der Verdünnung 1:1000 verwendet.

c) Anti-Neurofilament 200 (Anti-NF 200)

Neurofilamente (NF) sind Heteropolymere aus den drei Typ IV-Polypeptiden NF-Low (68 kDa), NF-Medium (160 kDa) und NF-High (200 kDa). Mit einem Durchmesser von 10-12 nm zählen sie zu den Intermediärfilamenten. Jedes dieser Filamente besteht seinerseits aus drei verdrehten Protofibrillen, die aus zwei Tetrameren aufgebaut sind. Alle drei Neurofilamente verbinden sich zu stabilen Zytoskelettelementen, welche die Nervenzelle und ihrem Axon Stabilität verleiht (Lodish et al., 2001). Neurofilamente sind zwar nicht charakteristisch für Neurone, kommen hier aber besonders konzentriert vor, da sie den zentralen Anteil der Axone bilden und auch für ihr appositionelles Wachstum verantwortlich sind (Lodish et al., 2001). Schon daraus wird ersichtlich, warum ein Antikörper, der gegen diese Zytoskelettkomponente oder eines seiner Bestandteile gerichtet ist, zu Nervenzellen eine besonders hohe Affinität haben muss. Anti-NF 200 (Sigma) wurde bei unserer Immunfluoreszenz in der Verdünnung 1:100 angewandt.

d) Anti-Nurr1 (Anti-Nur-related factor 1)

Nurr1 ist ein Steroidhormonrezeptor, der vornehmlich in dopaminergen Zellen exprimiert wird, und zwar noch bevor diese Zellen in ihrer Entwicklung durch andere Marker erkannt werden (McKusick, 1998). Über Nurr1 ist bisher bekannt, dass er eine DNA-Bindungsstelle („Zink-Finger“) besitzt und große Ähnlichkeit zu Nurr77 – insbesondere zu dessen C-terminalen Ende – hat. Obwohl sein Ligand bisher noch unbekannt ist („Waisen-Rezeptor“), weiß man, dass er für die Differenzierung der dopaminergen Neurone von großer Bedeutung ist, denn ohne Nurr1 verharren diese Zellen in undifferenziertem Zustand (Davis und Lau, 1994). Tiere, bei denen das Nurr1-Gen deaktiviert wurde, entwickelten keine dopaminergen Neurone im Mesenzephalon (McKusick, 1998). Desweiteren wird der Aktivierung dieses Rezeptors eine Apoptose-Schutzfunktion zugeschrieben, die insbesondere in Neuronen ausgeprägt sein soll. Vor der Anwendung in der DAB-Färbung wurde Anti-Nurr1 im Verhältnis 1:200 verdünnt.

2.7.1.2 Gliamarker

Gliamarker sind Substanzen, welche die „Stromazellen“ des Nervensystems (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikrogliazellen) selektiv darstellen.

Saures Gliafaserprotein-Antikörper (Anti-GFAP)

GFAP (glial fibrillary acidic protein) polymerisiert sich zu Intermediärfilamenten von ca. 10 nm Durchmesser, die sowohl in Gliazellen, von denen die Nervenzellen eingehüllt werden, als auch in Astrozyten vorkommen (Lodish et al., 2001). Anti-GFAP (Klon: G-A-5, aus der Maus, monoklonal, Sigma) bindet an ein ca. 50 kDa schweres Intermediärprotein reifer Astrozyten. Obwohl GFAP gelegentlich auch mit Vimentin koexprimiert wird, wird das letztgenannte von Anti-GFAP nicht dargestellt (Chekhonin et al., 2001). Anti-GFAP wurde sowohl bei der DAB-Färbung als auch bei der Immunfluoreszenz in der Verdünnung 1:400 verwendet.

2.7.2 Sekundärantikörper

Da die Antikörper (AK), welche in den histologischen Präparaten die Zielstrukturen markieren, primär nicht sichtbar sind, dienen die Sekundärantikörper der Visualisierung dieser Primärantikörper. Dies gelingt entweder durch entsprechende Enzyme oder durch Fluoreszenzfarbstoffe, die am Sekundärantikörper gebunden sind. Nachdem dieser zweite AK an den Ersten gebunden hat, wird der Schnitt gewaschen, um ungebundene, überschüssige AK zu entfernen. Nach dem Waschen können die Schnitte, die mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern behandelt wurden im Mikroskop betrachtet werden. In der DAB-Färbung wird die enzymatische Eigenschaft des gebundenen Sekundärantikörpers dazu genutzt eine Folge-reaktion zu katalysieren, an deren Ende ein auswertbarer Farbumschlag steht. So führt die Oxidation von DAB durch eine an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase zu einer Braunfärbung der markierten Struktur.

2.7.2.1 Fluoreszenzkonjugierte Sekundärantikörper

a) Die polyklonalen **CY2-konjugierten** (engl. Cyanine-dye = Zyanin-Farbstoff, maximale Absorption bei 492 nm und maximale Emission bei 510 nm) Anti-Maus-Antikörper (aus Ziege, Dianova, Best.-Nr. 115-226-003, Hamburg) wurden 1:400 verdünnt.

b) Die polyklonalen **AMCA-konjugierten** (engl. Aminomethylcumarinacetate, maximale Absorption bei 350 nm; maximale Emission bei 450 nm) Anti-Kaninchen-Antikörper stammten ebenfalls aus der Ziege. AMCA bindet an die leichte Kette der Immunglobuline,

jedoch nicht an deren FC-Teil und kann somit zur Darstellung dieser Immunglobuline verwendet werden. AMCA wurde im Verhältnis 1:100 verdünnt (Dianova, Best.-Nr. 111-156-003, Hamburg).

2.7.2.2 Biotingekoppelte Sekundärantikörper

Das Vitamin Biotin ist ein Co-Enzym und unterstützt verschiedene Carboxylierungsreaktionen. Es ist in seiner aktiven Form kovalent an Enzyme gebunden (Eulitz, 2000). Bei der Avidin-Biotin Methode wird der am Antigen gebundene Primärantikörper von einem biotinylierten Sekundärantikörper erkannt. Das Biotin des Sekundärantikörpers wird aus einem Komplex von Avidin und Peroxidase gebunden. Da es hierbei zur Bildung größerer Komplexe kommt, erfolgt eine Signalverstärkung, welche durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase sichtbar wird (Eulitz, 2000). Diese Peroxidaseaktivität kann dazu genutzt werden ein Chromogen (wie z.B. das von uns verwendete DAB) zu oxidieren und somit optisch sichtbar zu machen. Die so gefärbten histologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Folgende Sekundärantikörper wurden nach Herstellerangaben verwendet:

a) Anti-Maus-Kit (Vector, Best.-Nr. 6102, Burlingame, CA, USA)

Anti-Maus (aus Pferd, polyklonal) wurde 1:200 verdünnt, die Lösungen A und B für den ABC-Komplex je auf 1:50 eingestellt. Die DAB-Lösung wurde aus 200 ml PBS plus 2 mg DAB (Sigma) sowie 2 µl 35% H₂O₂ (Sigma) hergestellt. Die Schnitte wurden für exakt acht Minuten gefärbt.

b) Anti-Kaninchen-Kit (Vector, Best.-Nr. 6101, Burlingame, CA, USA)

Anti-Kaninchen (aus Ziege, polyklonal) wurde 1:200 verdünnt, die Lösungen A und B für den ABC-Komplex je auf 1:50 eingestellt und die DAB-Lösung wurde aus 200 ml PBS plus 2 mg DAB (Sigma) sowie 2 µl 35% H₂O₂ (Sigma) angesetzt. Die Schnitte wurden ebenfalls für acht Minuten gefärbt.

2.7.3 Immunhistochemie der nicht-transplantierten Gehirne

Nachdem die Schnitte in die PBS-gefüllten Schalen überführt waren, wurden sie dreimal in PBS gewaschen. Dazu entnahm man jeden Schnitt vorsichtig mit einem feinen Pinsel und legte ihn in eine frisch gefüllte Schale, welche dann für 10 min auf einem Schüttler bewegt

wurde. Diesen Vorgang durchliefen alle Gewebeproben dreimal. Die Serien I und II konnten nach dem Waschen bereits auf gelatinisierte Objektträger (Menzel, Deutschland) aufgezogen werden und sind entweder einer Nissl-, Markscheiden- oder Acetylcholinesterase (AChE)-Färbung unterzogen worden. Diese histologischen Routinefärbungen sind im Anhang wiedergegeben.

Die Serien III – V durchliefen die immunhistochemischen Färbungen. Die Serien III-V kamen bei Raumtemperatur (ca. 20° C) für 15 min in eine 3% PBS-H₂O₂- Lösung und wurden während dieser Zeit ebenfalls kontinuierlich bewegt. Im Anschluss daran durchliefen sie erneut für 3 x 10 min den Waschgang bevor eine Lösung zum Besetzen unspezifischer Proteinbindungsstellen (Abblocklösung) auf die Schnitte pipettiert wurde. Die Zusammensetzung der Abblocklösung ist im Anhang wiedergegeben. In dieser Lösung inkubierten die Schnitte für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden sie direkt – ohne weiteren Waschgang – in die Primärantikörperlösung überführt, in der sie für 48 Stunden bei 4° C unter permanenter Bewegung inkubierten. Der erste Schnitt einer jeden Serie diente als Negativkontrolle und durchlief die gleichen Schritte, wurde aber an Stelle der Primärantikörperlösung in PBS inkubiert. Die Antikörperlösung setzte sich aus der Verdünnungslösung (PBS, Triton X-100 0,025% und BSA 1% [Sigma]) sowie dem spezifischen Antikörper zusammen:

- a) Anti TH:**
 - Monoclonal anti-Tyrosin-Hydroxylase (Klon TH-2)
 - Sigma Aldrich (USA)
 - Verdünnung 1:1000 (Best.-Nr.: T1299)
- b) Anti NeuN:**
 - Mouse anti-neuronal nuclei monoclonal antibody
 - Chemicon International (USA)
 - Verdünnung 1:1000 (Best.-Nr.: MAB377)
- c) Anti GFAP:**
 - Monoclonal anti-glial fibrillary acidic protein (Klon G-A-5)
 - Sigma-Aldrich (USA)
 - Verdünnung 1:400 (Best.-Nr.: G3893)

Zur genauen Beschreibung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Epitope dieser drei Antikörper siehe Kapitel 2.7.

Nach Ablauf der 48 Stunden wurden alle Hirnschnitte für 3 x 10 min gewaschen und der Sekundärantikörperlösung zugeführt, welche aus der Grundlösung (PBS, Triton X-100 0,025%, BSA 1% und Normalserum der Maus 1:70) und dem Anti-Maus-Antikörper (Maus-Kit, Vectastain, PK-6102; Burlingame) bzw. Anti-Kaninchen-Antikörper (Kaninchen-Kit, Vector, Best.-Nr. 6101, Burlingame, CA, USA) bestand. In dieser Lösung inkubierten die Schnitte erneut für 24 Stunden bei 4° C und permanenter Rotation.

Am letzten Tag der Färbung wurden die Schnitte 3 x 10 min in PBS gewaschen und in den Avidin-Biotin-Komplex gegeben, in dem sie weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur und ständiger Bewegung inkubierten. In dieser Lösung wurden PBS und die Reagenzien A und B aus dem Maus-Kit (Vectastain, PK-6102; Burlingame) im Verhältnis 1:50 gemischt, welche unter ständigem Rühren zuvor für mindestens 30 Minuten miteinander reagieren mussten. Hiernach wurden die Schnitte erneut für 3 x 10 min gewaschen, bevor sich die Diaminobenzidin (DAB)-Fällung anschloss.

Die DAB-Lösung setzt sich aus 200 ml PBS, 2 µl H₂O₂ (35%, Merck, Deutschland) und 20 mg DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid, Sigma-Aldrich, USA Best.-Nr. D8001) zusammen. Jeder Schnitt wurde für genau acht Minuten bei Raumtemperatur in dieser Lösung inkubiert und danach sofort in frisches PBS überführt und ein letztes Mal für 3 x 10 min in PBS gewaschen. Nachdem die immunhistochemische Färbung beendet war, wurden die Schnitte auf gelatinisierte Objektträger (Menzel, Deutschland) aufgezogen. Im Anschluss wurden sie über Nacht auf einer ca. 40° C warmen, staubgeschützten Heizplatte getrocknet. Am folgenden Tag wurden sie mittels aufsteigender Alkoholreihe und abschließendem Xylolbad (JT Baker, Holland, Best.-Nr. 34011530) entwässert. Nach dem Xylolbad wurden die Objektträger mit DePeX (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) bestrichen und mit Eindeckgläsern (Menzel, Deutschland) eingedeckt.

2.7.4 Immunhistochemie der transplantierten Hirne

Da die transplantierten Zellen mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff PKH-26 markiert wurden (Haas et al., 2000), musste bei der Aufarbeitung genau darauf geachtet werden, dass keine fettlöslichen Detergenzien wie z.B. Alkohol oder Triton X-100 verwendet werden, die PKH-26 herauswaschen würden (Haas et al., 2000). Da diese Substanzen aber notwendig sind, um die Zellmembran für Antikörper passierbar zu machen (Horan und Slezak, 1989), mussten sie durch eine andere Methode ersetzt werden.

Das „Freeze & Thaw“-Verfahren (Huneau et al., 1988, Haas et al., 2000) erlaubt eine gute Zugänglichkeit der Antikörper zu ihren intrazellulären Epitopen. Hierbei wird das Gewebe nach dem Schneiden direkt in eine 30%ige PBS-Saccharose-Lösung überführt und über Nacht darin belassen. Anschließend kommen die Schnitte in kleine Aluminiumbehälter, welche in flüssigen Stickstoff getaucht werden bis das Gewebe komplett gefroren ist. Anschließend werden die Behälter auf einer Heizplatte bis zum vollständigen Auftauen des Gewebes wiedererwärmt. Dabei ist darauf zu achten, dass das Gewebe nicht austrocknet. Dieser Durchlauf wird fünfmal wiederholt, wodurch die Zellmembranen durchlässig werden und den

Antikörpern den Zugang zu den Epitopen gestatten (Haas et al., 2000). Anschließend durchlaufen auch diese Schnitte die standardisierte Färbeprozedur, jedoch ohne Triton X-100. Die Darstellung der Primärantikörper erfolgt in der Fluoreszenzfärbung mittels Fluorochromkonjugierten Sekundärantikörpern. Die Objektträger der fluoreszenzmarkierten Schnitte werden abschließend mit wässrigem Fluoreszenz-Eindeckmedium (MöbiTec) eingedeckt und an einem dunklen, kühlen Ort verwahrt.

Während die Serien I und II weiterhin mit nicht-fluoreszierenden Färbungen wie AChE-, und Nissl-Färbungen oder Versilberungstechniken behandelt werden, erfahren die Serien III – VI folgende Fluoreszenz-Doppelmarkierungen:

Serie I	AChE, Nissl oder Versilberung	Serie IV	TH (ms) / NF 200 (rb)
Serie II	TH (ms) – DAB-Färbung	Serie V	GAD 67 (ms) / S100 β (rb)
Serie III	NeuN (ms) / GFAP (rb)	Serie VI	GFAP (ms) / TH (rb)

2.8 Betrachtung der Immunfluoreszenzen

Das von uns verwendete Leitz Aristoplan-Immunfluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) ist ein Auflichtmikroskop, welches über einen Fluoreszenz-Filterblock verfügt, der die Spektrenbereiche Rot, Grün und Blau trennt, sowie einen Rot-Grün Kombinationsfilter besitzt, mit dem es möglich ist, das rot-fluoreszierende PKH-26 mit einer Grünfluoreszenz gemeinsam zu detektieren. Dieses Verfahren bietet den Vorteil der Mehrfachmarkierung, d.h. eine Zelle kann neben der bereits bestehenden PKH-26-Markierung noch gleichzeitig mit zwei weiteren Markern dargestellt werden. In unserem Experiment wurde die sekundäre Immunfluoreszenz angewandt, bei welcher ein fluoreszierender Sekundärantikörper an den Primärantikörper bindet. Als Sekundärantikörper wurden das grün-fluoreszierende CY2 und das blau-fluoreszierende AMCA genutzt. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in dem sehr hohen Kontrast der erzeugten Bilder, wodurch auch einzelne Zellen gut beurteilbar sind. Ein grundsätzlicher Nachteil der Fluoreszenzmikroskopie ist das relativ schnelle Ausbleichen der Präparate. Dem lässt sich mit geeigneten Eindeckmedien, einer dunklen Lagerung und der sofortigen fotografischen Dokumentation wichtiger Befunde begegnen.

Die Betrachtung der fluoreszenzgefärbten Schnitte im Konfokalmikroskop (Nikon Eclipse E 400 mit konfokalem System C1) ermöglichte eine hochauflösende Visualisierung der kolokalisierten Marker. Die Zellen konnten einzeln betrachtet und Zellüberlagerungen mittels

3-dimensionalen Bildrekonstruktion besser beurteilt werden. Die Auswertung dieser Befunde erfolgt in Kapitel 3.3.2.

2.9 Verhaltensmessung

Nachdem die Tiere aller Gruppen den Zylindertest durchlaufen hatten und ihr Verhalten auf Video aufgezeichnet war, wurden die Bänder ausgewertet. Bei jedem Tier wurde der Gebrauch der Vorderpfoten beobachtet und gezählt, wie oft welche Pfote die Zylinderwand berührte. Es wurden die ersten 30 Wandberührungen zeitunabhängig gezählt und ermittelt, wie viele dieser Berührungen auf die linke bzw. die rechte Pfote entfielen. Aus den Ergebnissen aller Tiere einer Gruppe wurde das arithmetische Mittel berechnet und mit dem nicht-parametrischen U-Test (SPSS 11.01) verglichen.

2.10 Densitometrische Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

a) Auswahl und Vorbereitung der Schnitte

Vor der computergestützten Auswertung wurden alle Objektträger nochmals gründlich mit Xylol (JT Baker, Best.-Nr. 34011530 Deventer, Holland) gereinigt und unter lichtmikroskopischer Betrachtung alle Hemisphärenanschnitte einer Seite markiert. Dies war nötig, da die Seitenzuordnung der Schnitte beim Auftragen auf die Objektträger oft nicht sicher möglich war. Im Anschluss daran wurde der Referenzschnitt festgelegt, d.h. der Schnitt, welcher der Injektionsstelle am nächsten liegt. Um den Referenzschnitt zu bestimmen, wurde zunächst der Schnitt aufgesucht, der die Commissura anterior vollständig (nach Möglichkeit beide Hemisphären verbindend) zeigt (Abb. 5). Sobald diese Stelle ausfindig gemacht war, wurde der vorhergehende Schnitt als Referenzschnitt definiert (Abb. 6).

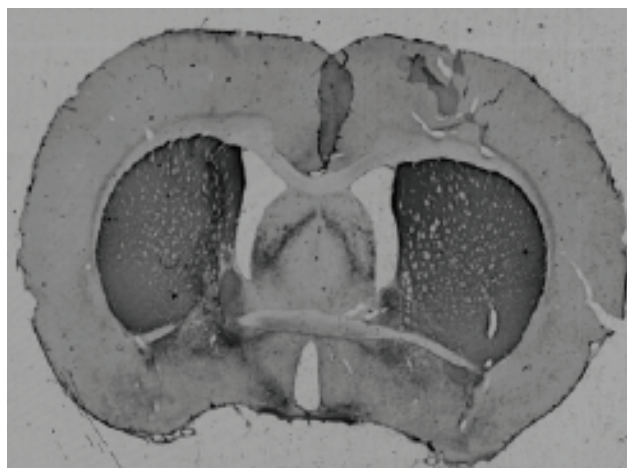


Abb. 5: Schnitt mit linksseitig durchgehender Commissura anterior.

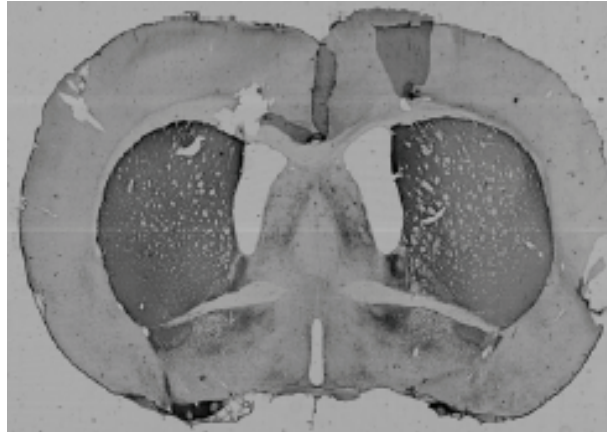


Abb. 6: Der Schnitt vor dem Commissura anterior - Schnitt ist der Referenzschnitt.

2.10.1 Das densitometrische Verfahren

Ähnlich wie in anderen Arbeiten auch (z.B. Ermert et al., 2001) wurden unsere zu analysierenden Schnitte mittels eines hochauflösenden Scanners (Nexscann 4100, Heidelberg, Deutschland) im Durchlichtmodus eingescannt und digitalisiert. Die optische Auflösung betrug für alle Bilder 5,04 µm/Pixel bei einem Grauwertumfang von 256 Intensitäten. Die digitalisierten Grauwertbilder wurden mit einem Skriptprogramm unter KS400 (Zeiss-Vision, Oberkochen) ausgewertet. Bevor das CPU einer jeden Hemisphäre mit einem Mauszeiger umfahren wurde (Morphometrie), erfolgte eine Transformation des Intensitätsbildes in ein Dichtebild bzw. optisches Dichtebild. Messungen im optischen Dichtebild werden als Densitometrie bezeichnet.

Das Licht, welches das Präparat bei der Digitalisierung durchdrang, wird als transmittiertes Licht bezeichnet, das über eine Optik auf einen Sensor geleitet wurde. Dessen digitale Werte mussten aus Gründen der Vergleichbarkeit standardisiert werden. Die Standardisierung erfolgte über eine Transformation jedes Pixels hinsichtlich der Differenz der Minimal- und Maximalwerte, als auch des Bildhintergrundes. Das Ergebniss war ein Bild bzw. Dichtebild, welches eine mittlere optische Dichte (OD) präsentierte (Oberholzer et al., 1996). Um diese sichtbar zu machen, mussten die Werte schließlich noch zwischen 0 und 255 skaliert werden. Um die Interpretation der OD zu erleichtern, wurden die Werte in Prozent umgerechnet (Abb. 7). Ein OD-Wert von 100% entspricht einer theoretischen, maximalen Immunreaktivität.

$$OD = \frac{\sum_{i=1}^n -\log\left(\frac{I - B}{W - B}\right)_i}{n}$$

Abb. 7: Formel zur Errechnung der optischen Dichte (OD).

I: zu transformierendes Intensitätsbild.

B: Hintergrundbild.

W: Bild ohne Objekt und nur mit der Beleuchtung, die zur Objektaufnahme verwendet wurde.

Gewebebereiche mit intensiver Anfärbung bzw. starker Immunreaktivität besaßen im Originalbild niedrige Pixelintensitätswerte und erschienen damit dunkel, während sie im optischen Dichtebild hohe Pixelintensitätswerte besaßen und hell erschienen. Basierend auf dieser Transformation, die Grauwertintensitäten in Grauwert-kodierte optische Dichtewerte umrechnete, wurden von immunreaktiven Arealen die mittlere Intensität der Immunreaktivität des Neuropils abgezogen. Die mittlere Intensität des Neuropils wird allgemein auch als „unspezifische Hintergrundfärbung“ bezeichnet und muss grundsätzlich als Signalanteil von immunpositiven Bereichen in die quantitative Auswertung einbezogen werden. Eine Schattierungskorrektur von Beleuchtungsinhomogenitäten war auf Grund der homogenen Objektausleuchtung durch die Scannerlampe nicht notwendig. Die mittlere optische Dichte des linken und rechten CPu wurden in eine Tabelle geschrieben und anschließend über alle Schnitte eines Tieres gemittelt, so dass sich pro Tier zwei Mittelwerte der optischen Dichte des CPu ergaben. Diese Mittelwerte wurden im Hinblick auf statistische Unterschiede untersucht.

Bei den erhobenen Daten handelt es sich um quantitative Merkmale mit metrischem Skalenniveau. Da sich auf Grund der niedrigen Stichprobenumfänge deren Verteilung nicht bestimmen lässt und sich bei der statistischen Überprüfung keine signifikanten, zeitabhängigen Unterschiede ergaben, wurde eine univariante Analyse des Faktors „Behandlung“ zwischen den CSM14.1-transplantierten und den Kontrolltieren mit Hilfe des nicht parametrischen U-Tests nach Mann-Whitney durchgeführt. Der Test erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows 11.01.

3 Ergebnisse

3.1 Verhaltenstest

Im Zylindertest konnte weder bei den nicht läsionierten noch bei den bilateral läsionierten Tieren eine Seitendifferenz (rechte vs. linke Pfote) beobachtet werden. Die Kontrolltiere zeigten ein Verhältnis zwischen linker und rechter Pfote von 15:15 ($\pm 1,76$; Abb. 8).

Bei der Auswertung wurden 30 zeitunabhängige Wandberührungen gezählt, um eventuell auftretende Unterschiede zu erkennen. In dem gezeigten Diagramm werden die Mittelwerte einer jeden Gruppe dargestellt. Die Zahlen in den Säulen geben die Anzahl der Wandberührungen der jeweiligen Pfote wider. Die Bezeichnung unter der Säule gibt die jeweils gebrauchte Pfote des Tieres und die Gruppe an. Die genauen Daten zu jedem Tier befinden sich im Tabellenanhang. Wie die Abbildung weiter verdeutlicht, zeigten die bilateral läsionierten Tiere ebenfalls nur geringe Seitenunterschiede von 14,8:15,2 ($\pm 2,10$).

Die Tiere, die nach der bilateralen Läsion ein rechtsseitiges, intrastriatales Zelltransplantat erhielten, fielen durch die übermäßig häufige Benutzung der linken Pfote auf (12,8:17,2 $\pm 1,72$). Dieser Seitenunterschied ist mit $p = 0,042$ im U-Test signifikant.

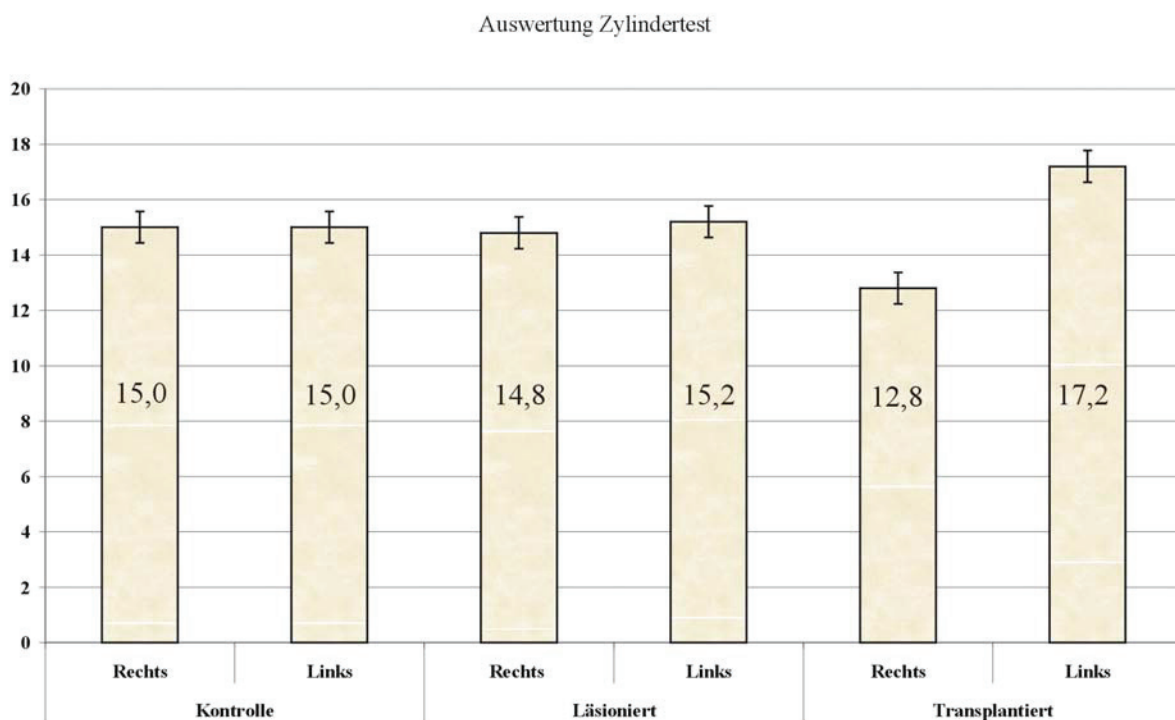


Abb. 8: Diagramm der Zylindertestergebnisse. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem jeweiligen S.E.M.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Tyrosin-Hydroxylase (TH) – Färbung (Abb. 9a - g)

Nachdem die Schnitte immunhistochemisch gefärbt waren (siehe Methoden), zeigten sich bereits bei der mikroskopischen Auswertung deutliche Unterschiede. Die Gewebe der Kontrolltiere, die weder einer Läsion noch einer Transplantation unterzogen wurden, zeigten im TH-Nachweis eine kräftige und gleichmäßige Färbung (Abb. 9a').

Die intensive braune Färbung im Bereich des CPu, weist auf eine hohe Tyrosin-Hydroxylase Immunreaktivität hin. Die Immunreaktivität ist gleichmäßig und wird typischerweise im Bereich der Faserzüge (Striae medullares) deutlich reduziert. Als Vergleich zu diesem Kontrolltier, zeigt die Abb. 9a'' die TH-Färbung eines bilateral läsierten Tieres. Hier ist zu erkennen, dass die Immunreaktivität - im Vergleich zum Kontrolltier - deutlich reduziert ist. Das CPu unterscheidet sich, bezüglich der Färbung, kaum von den kortikalen Strukturen, welche TH-arm sind (Björklund et al., 1983). Dies ist auf die erhebliche Reduktion dopaminerg Fasern in Folge der toxischen Deafferenzierung zurückzuführen, welche sich letztendlich in der stark verminderten Tyrosin-Hydroxylase - Expression manifestiert. Im Vergleich dazu zeigt die Abb. 9a''' eine deutlich kräftigere TH-Immunreaktivität auf der rechten Seite, die bedingt ist durch das einseitig eingebrachte Transplantat. Die Vergrößerung der eben besprochenen Darstellungen (Abb. 9b' - b''') bekräftigt diese Aussage: Während die Abb. 9b'' eine homogene, helle Fläche zeigt, lassen sich in den Abb. 9b' (Kontrolltier) und 9b''' (transplantiertes Tier) deutlich TH-positive Strukturen abgrenzen. Das es sich bei diesen Strukturen um Neurone und deren Axone handelt, belegt die Vergrößerung der in Abb. 9b''' bezeichneten Befunde (Abb. 9d - g). Ähnliche Feststellungen lassen sich auch über die Substantia nigra (SN) treffen, die für die jeweiligen Gruppen in den Abb. 9c' - c''' dargestellt ist. Die SN eines Kontrolltieres (Abb. 9c') zeigt im kaudalen Bildabschnitt eine kräftige, dunkel-gefärbte und nach lateral spitz auslaufende SN, die in dieser Form weder beim bilateral läsierten Tier (Abb. 9c'') noch beim transplantierten Tier (Abb. 9c''') zu erkennen ist. Das Fehlen der SN in der zuletzt genannten Darstellung lässt sich durch die striatale (ektopy) Lage des Transplantats erklären, welches die nigro-striatale Projektion nicht wieder errichten konnte.

3.2.2 Nissl - Färbung (Abb. 10a + b)

In den Nisslfärbungen ist die dopaminerge Deafferenzierung erwartungsgemäß nicht erkennbar. Im läsierten Tier (Abb. 10b) ist die Färbung etwas schwächer ausgeprägt. Bei

der Betrachtung dieser Darstellung fallen keine umschriebenen Zelluntergänge auf. Die Färbung stellt sich nur etwas schwächer dar.

Anhand der Abbildung 10g soll kurz erläutert werden, aus welcher Region die Schnitte stammen und welche Strukturen an ihnen zur Orientierung wichtig sind. Die Schnitte stammen aus der mittleren Region des CPu (Bregma: -0,30 mm; Interaurallinie: 8,70 mm). Ummantelt vom Cortex cerebri sind in der Bildmitte die CPu zu erkennen, an deren medialer Seite noch das Restlumen der Ventriculi laterales (LV) angeschnitten ist. Am kranialen Rand des CPu befindet sich das Corpus callosum (CC).

3.2.3 Markscheidenfärbung (Abb. 10c + d)

Die Markscheiden sind in dieser Darstellung als dunkle Strukturen erkennbar. Da hierbei das Myelin der Nervenscheiden gefärbt wird, spiegelt die Färbung die Verteilung der Axone wieder. In der Abb. 10d erkennt man das CPu mit seinen kortikostriatalen bzw. kortikofugalen Faserbündeln als dunkle Flecken. Am prominentesten tritt das Corpus callosum hervor, da es den größten Fasertrakt des Gehirns darstellt. Im unteren Teil der Abb. 10c + d sind deutlich zwei schwarze Punkte zu sehen, bei denen es sich um den vorderen Anteil der Commissura anterior handelt. Im direkten Vergleich zwischen dem bilateral läsierten Tier und dem Kontrolltier sind auch in dieser Darstellung keine größeren Entmarkungsherde im läsierten Tier erkennbar.

3.2.4 Acetylcholin-Esterase (AChE) - Färbung (Abb. 10e + f)

AChE ist eine Cholinesterase, welche in den postsynaptischen Abschnitten des CPu enthalten ist. Das in cholinergen Interneuronen vorkommende AChE spaltet das im synaptischen Spalt befindliche Acetylcholin in Acetyl und Cholin, welches dadurch inaktiviert wird. In der AChE-Darstellung erscheinen Strukturen, die dieses Enzym besitzen, dunkel. Anhand der Abb. 10e wird deutlich, dass dieses Enzym im CPu besonders stark exprimiert wird. Auch wenn die alleinige Betrachtung der AChE-Darstellung ungeeignet ist, eine Aussage über die dopaminerge Deafferenzierung nach 6-OHDA Applikation zu machen (MacKenzie et al., 1989), so ist sie doch wichtig, um eventuelle Veränderungen des cholinergen, striatalen Systems – in Folge der toxischen Deafferenzierung – erkennen zu können. Auch die übrigen Färbungen (Nissl, Markscheiden, etc.) dienen der Erkennung von evtl. auftretenden morphologischen Veränderungen des CPu. Bei den densitometrischen Messungen wurden aber lediglich die TH-Darstellungen ausgewertet.

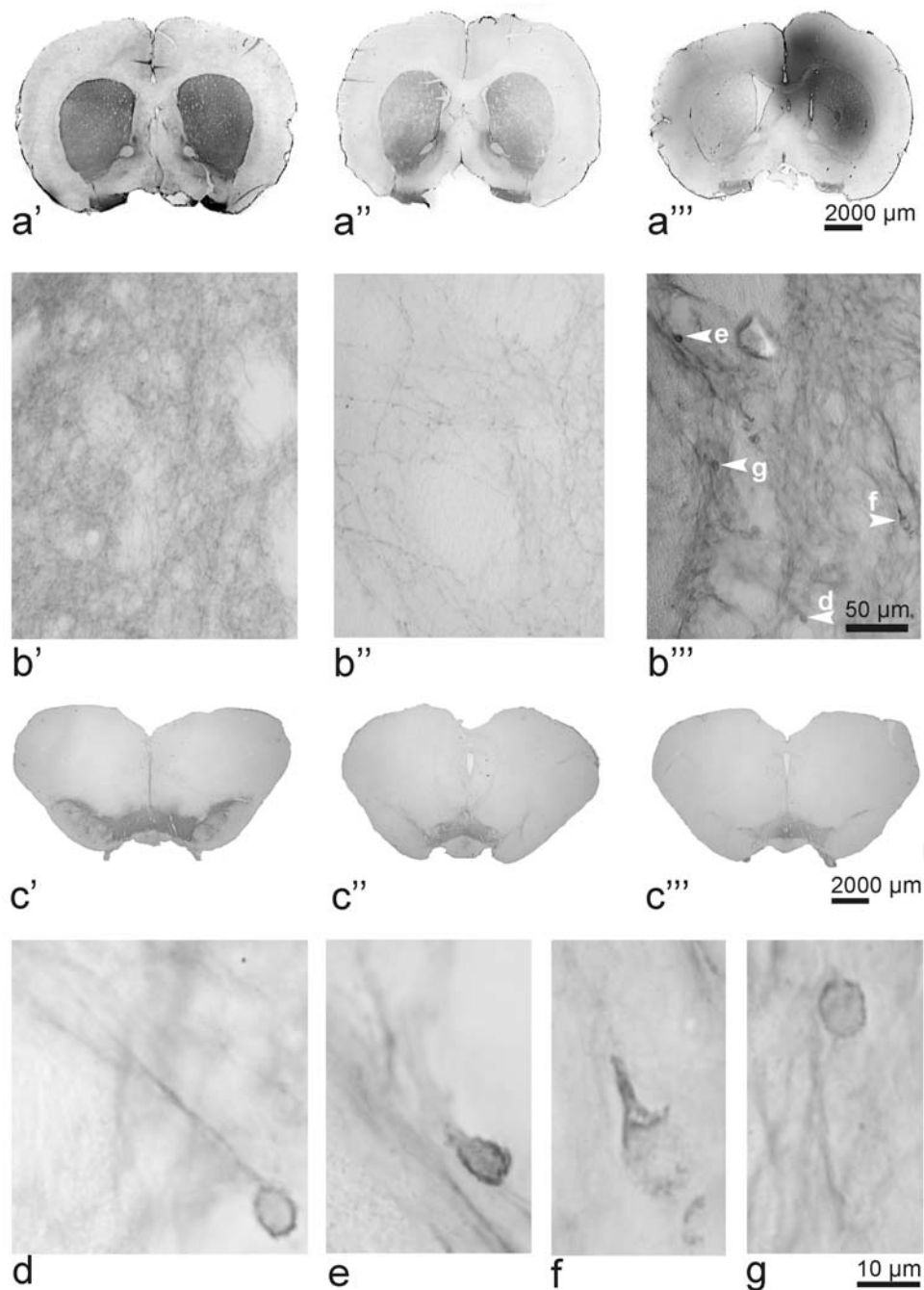


Abb. 9: TH - Verteilung im bilateral läsierten und unilateral transplantierten Rattenhirn.

- a) Frontalschnitte durch das CPu.
 - a' CPu-Region eines Kontrolltieres mit starker TH-Immunreaktivität.
 - a'' CPu-Region eines bilateral läsierten Tieres.
 - a''' CPu-Region eines bilateral läsierten und anschließend unilateral transplantierten Tieres.
- b) Vergrößerung der CPu-Regionen.
 - b' Kontrolltier.
 - b'' Bilateral läsiertes Tier.
 - b''' Bilateral läsiert und unilateral transplantiertes Tier.
- c) Darstellung der Substantia nigra in den entsprechenden Gruppen.
- d) – g) Vergrößerung der TH-positiven Neurone aus Abb. b'''.

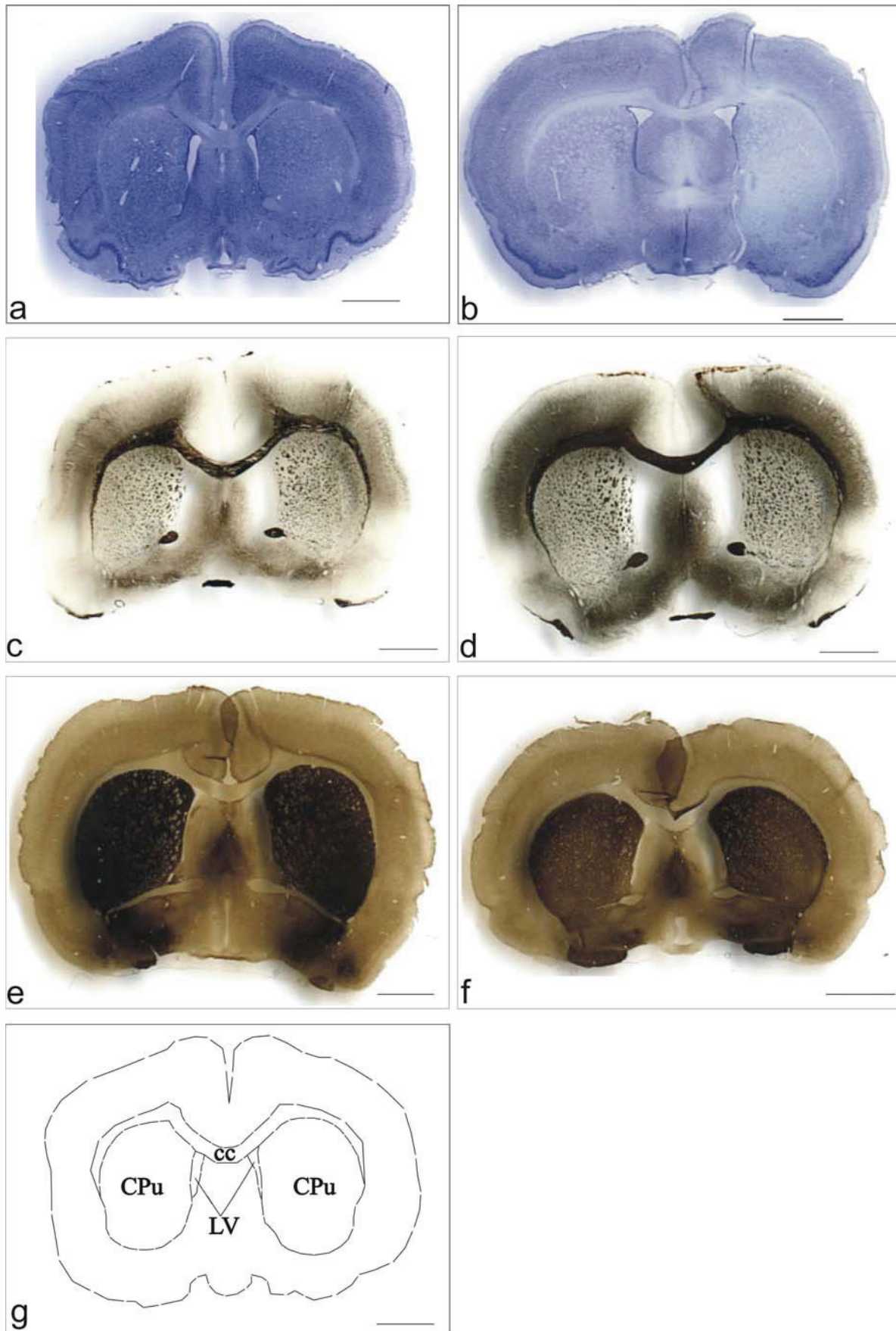


Abb. 10: Nissl-, Markscheiden- und AChE-Färbungen des CPu mit Übersichtsskizze. Maßstäbe 2000 μm .

- Abb.:10** a) Nissl-Färbung des Striatums eines Kontrolltieres.
b) Nissl-Färbung des Striatums eines bilateral läsierten Tieres.
c) Markscheiden-Färbung des Striatums eines Kontrolltieres.
d) Markscheiden-Färbung des Striatums eines bilateral läsierten Tieres.
e) AChE-Färbung des Striatums eines Kontrolltieres.
f) AChE-Färbung eines bilateral läsierten Tieres.

3.3 Mikroskopische Auswertung

3.3.1 Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 11)

Auf Grund der PKH-26-Markierung der transplantierten CSM14.1-Zellen konnten wir diese in den Gewebsschnitten eindeutig identifizieren. Die Zellen strahlten bei Betrachtung eine kräftige, rote Fluoreszenz aus (Abb. 11a + b).

Eine Schätzung mittels aufgelegtem Objektmikrometer ergab, dass die Zellen zwischen 800 – 1100 µm in das umgebende Gewebe migrierten. Der Nachweis, dass sich die transplantierten Zellen auch *in vivo* in Neurone differenzieren, gelang mit dem Rot-Grün Kombinationsfilter, welcher die Kolokalisation zweier Chromophore, wie Abb. 11c + d zeigt, in einer Zelle erlaubt (Rot = PKH, Grün = NeuN). Während sich die neuronal ausdifferenzierten Zellen in dieser Färbung als orangefarbene oder rote Zellen darstellen, die von einem grünen Saum umgeben sind, erscheinen dopaminerg-ausdifferenzierte Zellen in der TH-Färbung grün gepunktet, da sich die Tyrosin-Hydroxylase im Zytoplasma befindet (Abb. 11e + f).

3.3.2 Konfokalmikroskopie (Abb. 12)

Bei eingehender konfokalmikroskopischer Untersuchung der fluoreszenzmikroskopischen Befunde konnten wir die oben aufgeführten Ergebnisse bestätigen. Die transplantierten Zellen heben sich durch ihre kräftige, rote PKH-Markierung deutlich von dem umgebenden Gliagewebe (grün = GFAP) ab (Abb. 12a). Umgeben wird das Transplantat von einer - in der Abb. 12e gezeigten - Glianarbe, welche durch den Marker GFAP (grün) erfasst wurde. Eine Kolokalisation zwischen den Markern PKH-26 und GFAP war in unseren Tieren nicht festzustellen, was darauf hindeutet, dass in unserem Experiment eine solche gliale Differenzierung nicht erfolgte.

Durch die Konfokalmikroskopie konnte bei mehreren Zellen eindeutig die Expression dopaminerg Marker nachgewiesen werden. So ist die Co-Expression zwischen PKH-26 (Rot) und TH (Grün) ein Beleg für die dopaminerge Differenzierung der transplantierten Zellen. Während die Abb. 12b + c die Zellen jeweils in einzelnen Fluoreszenzen darstellen, zeigt die Abb. 12d die zeitgleiche Detektion beider Spektren. In dieser Abbildung erkennt man die grün gefärbte Tyrosin-Hydroxylase im Zytoplasma, welches von der mittels PKH rot

dargestellten Zellmembran umgeben wird. Dies belegt das Vorhandensein der Tyrosin-Hydroxylase im Zytoplasma der transplantierten CSM14.1-Zellen.

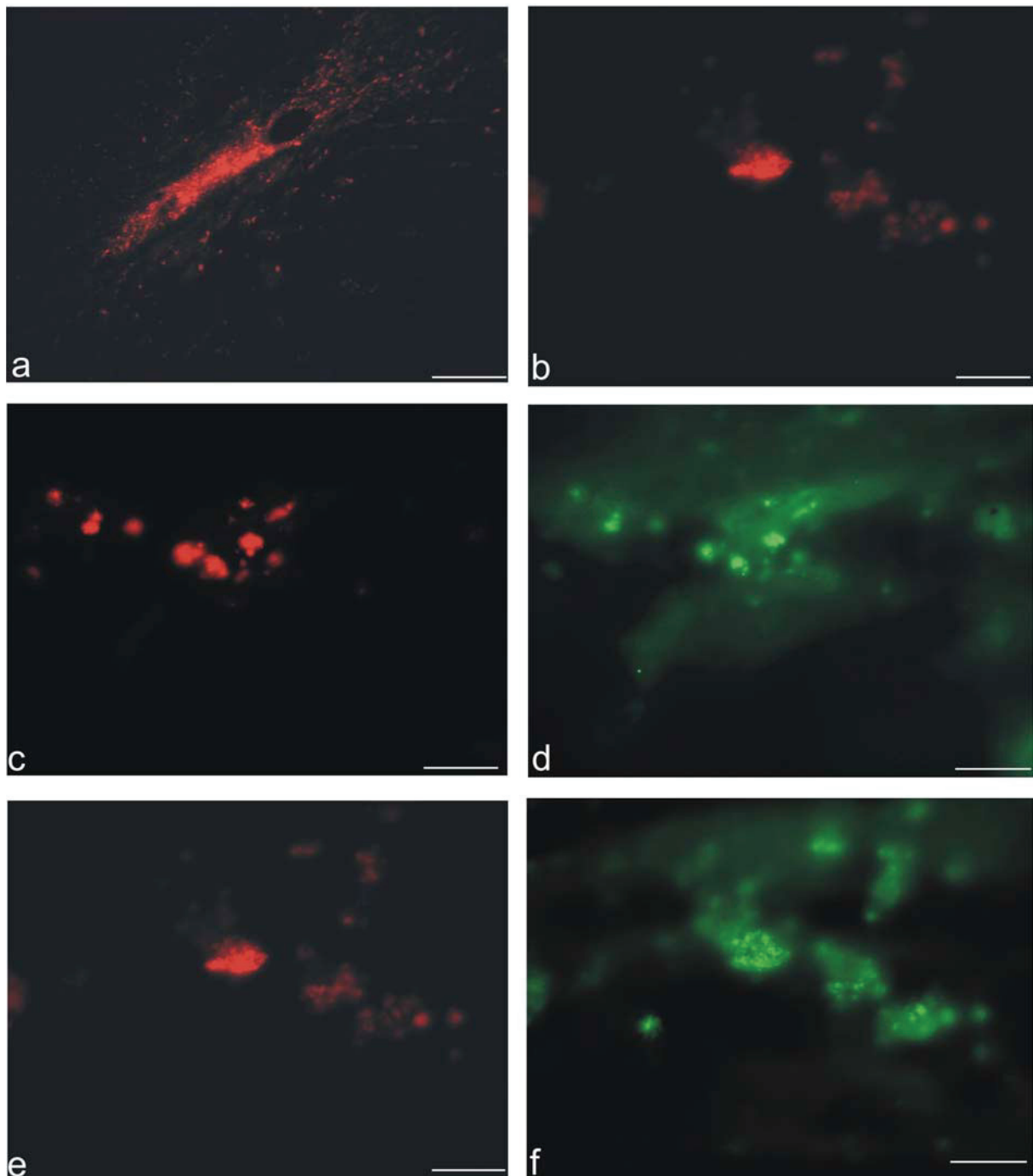


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

- a) Transplantat Übersicht. Rot: PKH. Maßstab 150 μm .
- b) Transplantat Übersicht. Rot: PKH. Maßstab 50 μm .
- c) PKH (Rot) - Darstellung einzelner Zellen. Maßstab 50 μm .
- d) Neu-N (Grün) - Darstellung derselben Zellen wie in Abb. 11c. Maßstab 50 μm .
- e) PKH (Rot) - positive Zelle. Maßstab 50 μm .
- f) Intrazytoplasmatische TH-Markierung (Grün) derselben Zelle wie in 11e. Maßstab 50 μm .

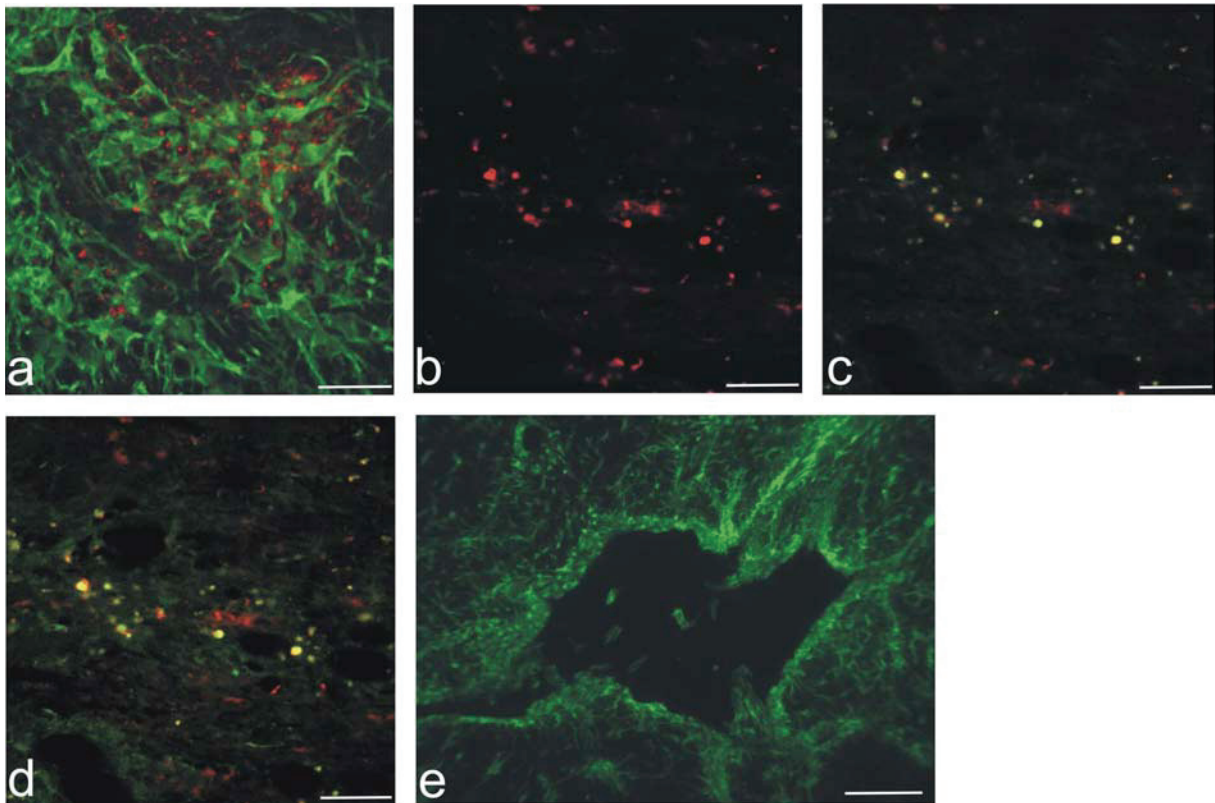


Abb. 12: Konfokalmikroskopische Aufnahmen.

- a) PKH-26 markierte Zellen (Rot), umgeben von Glianarbe. Maßstab 150 μm .
- b) PKH-26-markierte Zellen (Rot). Maßstab 100 μm .
- c) Dieselben Zellen wie in 12c in TH-Darstellung (grün). Maßstab 100 μm .
- d) PKH-26 (Rot) – TH (Grün) Doppelmarkierung. Maßstab 100 μm .
- e) Glianarbe in GFAP-Darstellung (Grün). Maßstab 200 μm .

3.4 Densitometrie

Die normierte Messung der optischen Dichte in den standardisierten immunhistochemischen Reaktionen ergab für die Kontrolltiere (weder läsioniert noch transplantiert) im Mittel $11,11\% \pm 2,73\%$. Die ODs der bilateral 6-OHDA läsionierten Ratten betrugen bei dieser normierten Messung $2,08\% \pm 0,39\%$. Wie man der Abb. 13 entnehmen kann, liegen die Messdaten der läsionierten Tiere deutlich unter denen der Kontrollen. Die transplantierten Tiere wiesen eine optische Dichte von $14,45\% \pm 1,84\%$ auf. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden von allen Tieren einer jeden Gruppe die Mittelwerte gebildet und grafisch dargestellt (Abb. 13).

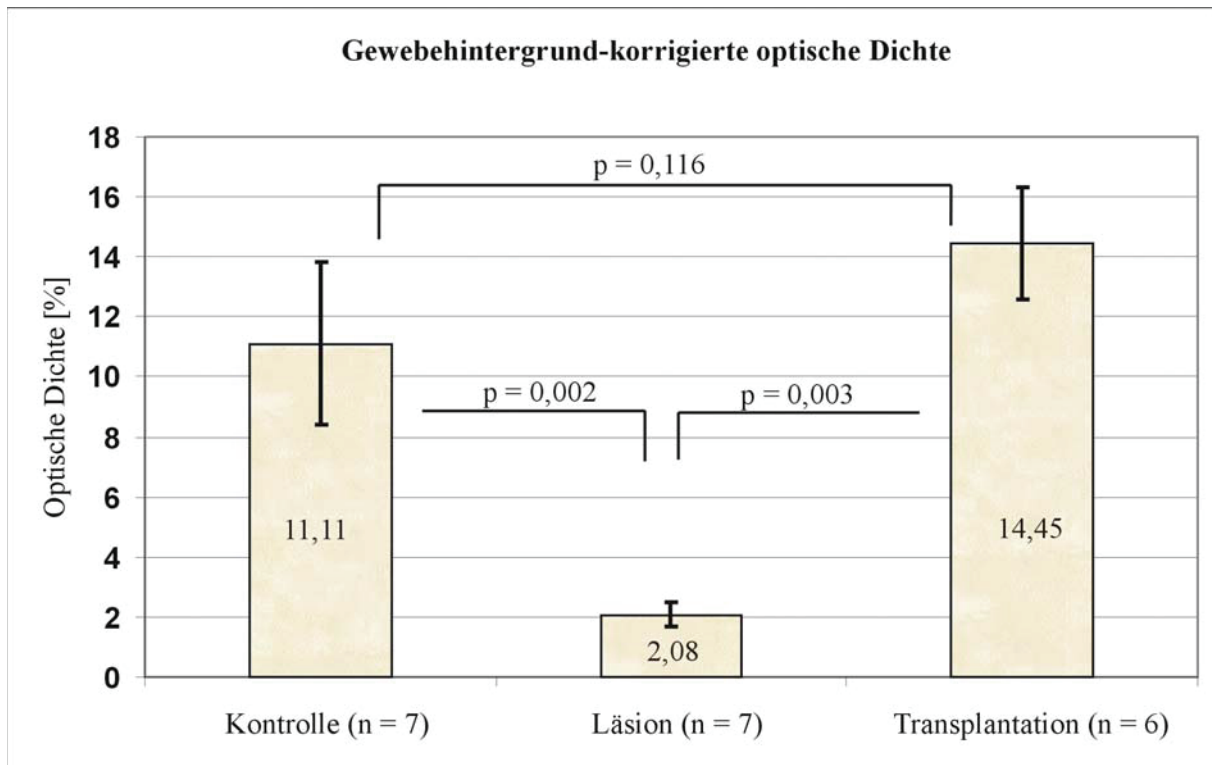


Abb. 13: Mittelwerte der korrigierten optischen Dichte für die jeweiligen Versuchsgruppen mit Angabe der Signifikanzwerte zwischen den einzelnen Gruppen.

Ein Vergleich der Gruppen untereinander soll die Unterschiede verdeutlichen: Zwischen der Kontrollgruppe und den läsionierten Tieren konnte ein signifikanter ($p = 0,002$ im U-Test) Unterschied von 9,03% errechnet werden. Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit den transplantierten Ratten - die nach dem selben Schema durchgeführt wurde - fiel ein Unterschied von 3,34% zu Gunsten der transplantierten Tiere auf, welcher aber mit $p = 0,116$ statistisch nicht signifikant ist. Bei den transplantierten Ratten war eine um 2% höhere mittlere OD der TH-Immunreaktivität - im Vergleich zu den Kontrolltieren - zu verzeichnen. Die Gründe dafür werden im nächsten Kapitel diskutiert. Wird derselbe Wert zwischen den Daten der läsionierten und der transplantierten Ratten ermittelt, so ergibt sich hier eine Differenz von 12,37%. Dieser Wert ist mit $p = 0,003$ (U-Test) statistisch hoch signifikant.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht funktionelle und strukturelle Effekte transplanteder CSM14.1-Zellen in Hirnen neonatal dopaminerg-deafferenzierter, männlicher Wistar-Ratten. Diesem Experiment liegt die Annahme zu Grunde, dass die ektope Transplantation der CSM14.1-Zellen in das Striatum neonataler Tiere, bezüglich des Zellüberlebens und der TH-Bildung, bessere Resultate erbringt, als in adulten Tieren (Herman et al., 1991; Bentlage et al., 1999; Sortwell et al., 2001). Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass junge Tiere in ihrer zentralnervösen Extrazellulärmatrix (engl. extracellular matrix = ECM) ein anderes Expressionsmuster wachstumsfördernder und -hemmender Faktoren aufweisen als adulte (Mendez et al., 1996; Krobert et al., 1997; Saunders et al., 1999; Mohapel et al., 2005) und dass solche Faktoren maßgeblichen Einfluss auf das Überleben der Zellen und die funktionellen Resultate haben (Lindvall und Hagell, 2002a).

In unserer Arbeit wird gezeigt, dass transplantierte CSM14.1-Zellen im Striatum neonataler Ratten überleben und ein dichtes Netzwerk TH-positiver Fasern bilden können. Zu diesem Zweck erhielten die Tiere am ersten postnatalen Tag (P_1) eine Injektionen des Fehlmetaboliten 6-OHDA in beide Lateralventrikel, worauf sich - zwei Tage später - in einer Gruppe die unilaterale Transplantation der CSM14.1-Zellen anschloss. Da alle Tiere der selben Rasse angehörten, gleichen Geschlechts und in etwa gleich schwer waren, war eine Randomisierung nicht erforderlich. Wie in Kap. 1.3 aufgeführt, galten bei unseren Tieren folgende Alterseinteilungen: Neonatal ($P_0 - P_7$), Juvenil ($P_8 - P_{20}$), Adult ($> P_{20}$).

4.1 Auswertung des Verhaltenstests

In unserem Experiment wird weiterhin gezeigt, dass eine bilaterale, intraventrikuläre 6-OHDA Applikation am ersten postnatalen Tag (P_1) zu einem nahezu vollständigen Verlust dopaminerger Fasern im CPU und dopaminerger Neurone in der SN führt. Nach der bilateralen Deafferenzierung waren die Tiere motorisch nur moderat eingeschränkt. Schwere Störungen, wie Adipsie oder Aphagie, welche im adult-läsionierten Tier beobachtet wurden (Snyder-Keller et al., 1989; Luthman et al., 1994; Neal-Beliveau et al., 1999), traten bei den neonatalen Tieren nicht auf.

Die Tatsache, dass unsere bilateral läsionierten Tiere im Zylindertest ähnlich agieren wie die intakte Kontrollgruppe, führen wir darauf zurück, dass durch die bi-ventrikuläre Läsion der DA-Spiegel in beiden Hemisphären etwa gleichstark vermindert wurde, so dass kein Seitenunterschied entstand (Snyder-Keller et al., 1989; Nikkhah et al., 1995b). Dieses Gleichgewicht wurde durch das Einbringen des Transplantats wieder gestört, was in einer

bevorzugten Nutzung der (zum Transplantat) kontralateralen Pfote beim Erkundungsverhalten (Glaszylinder) resultierte (Nikkhah et al., 1995b), da auch bei Nagetieren der Tractus corticospinalis auf die kontralaterale Seite kreuzt (Nieuwenhuys et al., 1998; Donkelaar et al., 2004).

Der Verhaltenstest wurde erst im Alter von 5 Wochen durchgeführt, da die Ratten zum Zeitpunkt der Transplantation (P₃) motorisch und körperlich nicht so weit entwickelt waren, diesen Test zu absolvieren (Joyce et al., 1996). Auch bedarf es einiger Zeit, bis die Zellen sich im Wirtsgewebe differenzieren, Axone bilden und synaptische Verbindungen knüpfen. Wie Snyder-Keller et al. bereits 1989 zeigten, erfolgt die Axonbildung der transplantierten Zellen im Wesentlichen in den ersten 15 Tagen nach dem Eingriff, so dass auch zu späteren Zeitpunkten keine wesentlich höhere Innervationsdichte zu erwarten ist.

Bedingt durch die ektope Lage unseres Transplantats, konnte keine nigro-striatale Projektion errichtet werden. Diesbezüglich scheinen die hier vorgestellten positiven Befunde im Widerspruch zu den Ergebnissen von Mendez et al. (2000) zu stehen, nach denen eine Rekonstruktion dieser Bahn als Grundvoraussetzung für die motorische Erholung gilt. Es ist zwar bekannt, dass bestimmte afferente Regulationsmechanismen das Transplantat nur erreichen können, wenn dieses in loco typico (der Substantia nigra) platziert wurde (Nikkhah et al., 1995b), doch konnten Abrous et al. bereits 1990 nachweisen, dass auch nicht vollständig integrierte Zellen, welche aber zumindest zur Dopaminbildung fähig sind („DA-Minipumpen“) und einen konstanten DA-Spiegel gewährleisten, das motorische Verhalten günstig beeinflussen können.

Auch sind die motorischen Testverfahren wie der Zylindertest oder pharmakologisch-induzierte Rotationstests kaum geeignet den klinischen Erfolg einer solchen Transplantation umfassend zu beurteilen, da ihre Sensibilität nicht hoch genug ist. Motorische Ausfälle bilden sich in diesen Tests bereits zurück, wenn erst 5% - 10% der DA-Neurone ersetzt worden sind (Kirik et al., 1998; Reader et al., 1999), bzw. die TH-Aktivität insgesamt über 10% ansteigt (Burke et al., 1990). Ein wirklich sicher-positives Testergebnis (rotierende Tiere) erhält man im Apomorphin-Rotationstest erst, wenn der Anteil der TH-positiven Fläche im CPu unter 2% absinkt (Burke et al., 1990), was im Umkehrschluss bedeutet, dass in diesem Test die Tiere bereits ab 3% Reinnervation erste Zeichen einer motorischen Besserung zeigen. Der Rotationstest wurde von uns nicht durchgeführt, da dieser bei den Kontrolltieren, sowie bei den nur-läsionierten Tieren auf Grund des fehlenden interhemisphärischen DA-Ungleichgewichts nicht anwendbar war und somit ein Vergleich mit den transplantierten Tieren nicht möglich wäre. Daraus ergibt sich, dass das Hauptziel einer Transplantation darin bestehen

muss, die striatalen Zellen wieder mit Dopamin zu versorgen, unabhängig von dessen Bildungsort oder Transportweg.

4.1.1 Molekularbiologische Gründe für die gefundenen Verhaltensunterschiede zwischen adult- und neonatal-läsionierten Tieren

In der Literatur wird das Ausbleiben schwerer motorischer Ausfälle bei Jungtieren mit einer erhöhten Plastizität des neonatalen Hirns begründet, welche bis maximal P₇ (Neal-Beliveau et al., 1999) nachweisbar ist und sich als prä- und postsynaptische Veränderung, sowie Anpassung im Transmittersystem manifestiert (Luthman et al., 1994).

Erfolgte bei adulten Tieren eine nahezu vollständige (> 90%) dopaminerge Deafferenzierung durch 6-OHDA, so fielen diese Tiere durch schwere sensomotorische Ausfälle wie Aphagie, Akinese, sensorischer Neglekt auf (Joyce et al., 1996), die einem fortgeschrittenen IPS-Syndrom ähneln (Ungerstedt et al., 1971). Bei adult-läsionierten Tieren konnte eine postsynaptische Dopamin D₂-Rezeptor Hochregulation festgestellt werden, begleitet von einer D₂- und Preproenkephalin (PPE) – mRNA Hochregulation, sowie einem erhöhten Met-Enkephalin (ENK)-Spiegel (Chritin et al., 1993). Die Erhöhung der D₂-Rezeptordichte sowie der D₂-mRNA-Menge beginnt nach ca. 5 Tagen und erreicht ihre maximale Ausprägung nach 2-3 Wochen. Diese Erhöhung findet allerdings nur statt, wenn die Läsion mindestens 90% betrug und schwindet nach ca. 11 Monaten wieder (Joyce et al., 1996). Als Folge der D₂-Erhöhung findet eine vermehrte Produktion von GAD- und PPE-mRNA in den striatopallidalen Neuronen statt (Chritin et al., 1993). Ferner führt der läsionsbedingte DA-Verlust zu einer steigenden Zahl cholinergischer Interneurone, welche allerdings bei höherem DA-Spiegel (Erhöhung, Transplantat) wieder abnimmt (MacKenzie et al., 1989). Durch vermehrte DA-Produktion der verbliebenen Neurone kommt es bei adult-läsionierten Ratten zu einem leichten Wiederanstieg des extrazellulären DA-Spiegels, der mit einer moderaten Erholung der Tiere einhergeht (Joyce et al., 1996). Diese Erholung ist an das Überleben von mindestens 5% der dopaminergen Neurone gebunden (Robinson et al., 1990) und ist sehr empfindlich gegenüber nachträglich applizierten DA-Antagonisten, deren Einsatz die Tiere nahezu akinetisch werden lässt (Snyder et al., 1985). Die Arbeitsgruppe um Gerfen konnte 1990 in diesen Tieren eine langanhaltende, deutliche Verminderung der D₁-Rezeptordichte sowie erniedrigte D₁- und Preprotachykinin (PPT)-mRNA-, Substanz P-Spiegel nachweisen, welche sich v.a. im Matrix-Kompartiment manifestiert. Da eine ungestörte Bewegungs- und Verhaltenskoordination einer ausgeglichenen D₁-D₂ – Interaktion bedarf (Clark et al., 1987), die bei diesen Tieren nicht mehr gegeben ist, wird diese Dissoziation, welche in einer Überaktivität des D₂-Rezeptor – Enkephalin-Systems und in einer Unteraktivität des D₁-

Rezeptor – Substanz P - Systems Ausdruck findet (Joyce et al., 1996), mitverantwortlich gemacht für die schweren sensomotorischen Beeinträchtigungen adult-läsionierter Ratten.

Übereinstimmend mit unseren Beobachtungen, sind bei neonatal-läsionierten Tieren die Ausfälle diskret und oft nur mit Hilfe subtiler Tests (Zungen- oder Pfotengebrauch) ermittelbar (Joyce et al., 1996). Auch die nachträgliche Gabe von DA-Antagonisten wird von diesen Tieren problemlos verkraftet, was ein Hinweis dafür ist, dass die neonatal-läsionierten Ratten auf das verbliebene DA nicht zwingend angewiesen sind (Breese et al., 1985). Eine erneute 6-OHDA Läsion des adulten Tieres, welches bereits an P_{0/1} dopaminerg deafferenziert wurde, führt aber dennoch zu kontralateralen, sensomotorischen Fehlleistungen, so dass auch in neonatal läsionierten Ratten dem DA noch eine gewisse Bedeutung zugesprochen werden muss (Joyce et al., 1996).

Die intraventrikuläre Läsion an P_{0/1} führte zu einem ausgeprägten Verlust dopaminerger Neurone im Patch-Kompartiment der ventralen SNpc, gefolgt von dauerhaften Veränderungen im DA-Rezeptorstatus (Gerfen et al., 1990). Im Gegensatz zu den adulten Tieren, fand sich hier - mit einer Verzögerung von ca. 7 Tagen - eine Verminderung der D₁-Rezeptordichte im CPu: Im medialen Teil war sie ab P₇ nachweisbar, wohingegen sie im dorsolateralen Teil erst ab P₃₅ auftrat (Frohna et al., 1995). Diese Veränderung ließ sich in beiden Gebieten noch an P₉₀ nachweisen. Bemerkenswert ist, dass die D₁-mRNA - nach einer anfänglichen Verminderung - nach ca. 2 Wochen wieder anstieg und auf einem erhöhten Niveau verblieb (Frohna et al., 1995). Dies legt eine funktionelle Entkopplung zwischen der Rezeptorbildung und der Transkription seiner mRNA nahe, deren Konsequenz bislang noch nicht verstanden ist. Beim adult-läsionierten Tier korrelierte die D₁-Rezeptordichte noch direkt mit der Bildung der D₁-mRNA (Joyce et al., 1996). Die verminderte D₁-Dichte wurde durch eine Hypersensitivität der verbliebenen Rezeptoren zum Teil kompensiert. Diese Sensitivitätssteigerung erfolgte nur, sofern die dopaminerge Deafferenzierung mindestens 98% betrug und könnte ein Grund für die beobachtete Hyperaktivität und das ebenfalls gelegentlich gezeigte autoaggressive Verhalten sein (Breese et al., 1985), welches unsere Tiere auch zeigten.

Verglichen mit dem D₁-Rezeptor wurde der D₂-Rezeptor von der intraventrikulären Läsion an P_{0/1} kaum beeinträchtigt, da er später als der D₁-Rezeptor gebildet wird und darüber hinaus vornehmlich in der Matrix lokalisiert ist (Luthman et al., 1990). Das würde auch erklären, warum selbst starke DA-Depletionen (> 90%) nicht zu einer D₂-Beeinflussung - weder der Rezeptordichte, noch der mRNA-Menge - führten (Neal-Beliveau et al., 1993). Zugleich schien bei frühzeitig (P_{0/1}) läsionierten Tieren, die funktionelle Kopplung zwischen dem D₂-

Rezeptor-System und dem Met-Enkephalin-System auszubleiben, so dass die D₂ vermittelte Signaltransduktion keinen Einfluss mehr auf das Met-Enkephalin-System hatte (Joyce et al., 1996). Ferner schien sich bei neonatal-läsionierten Tieren keine D₂-vermittelte, DA-abhängige Kontrolle der cholinergen Interneurone zu etablieren (MacKenzie et al., 1989). Bei Adulten kann sich diese funktionelle Kopplung auch nach dopaminergen Läsionen neu etablieren und eine Kontrolle des Met-Enkephalin-Systems (wieder) gestatten (Pollack und Wooten, 1992).

Eine läsionsbedingte Veränderung, welche bei frühzeitig läsionierten (bis P₃) Ratten schon recht lange bekannt ist und anfänglich als Kompensationsmechanismus aufgefasst wurde, ist die serotonerge Hyperinnervation des CPu (Snyder et al., 1986; Luthman et al., 1994). Moy und Mitarbeiter konnten 1997 zeigen, dass sich der Serotoningehalt der Gewebe nach der Läsion fast verdoppelte, zugleich aber die Dichte der DA-D₁- und Serotonin-Rezeptoren anstieg, was einen Widerspruch bedeutet, da eigentlich verminderte Transmitterspiegel zu einer kompensatorischen Rezeptor-Hochregulation führen müssten (Marsden et al., 1982). Da in diesen Tieren die Empfindlichkeit des 5-HT Aufnahmemechanismus und die Anzahl der 5-HT Fasern deutlich anstieg (Towle et al., 1989) wurde vermutet, dass dieser Transmitter einen Ersatz für das fehlende DA darstellt. Da aber Snyder-Keller und Mitarbeiter 1989 beobachteten, dass serotonerge Fasern keine Synapsen belegen, welche durch die dopaminerge Deafferenzierung frei wurden, wurde dieses Konstrukt in Frage gestellt. Wäre dies der Fall, so hätten transplantierte, dopaminerge Zellen keine freien Bindungsstellen mehr vorgefunden und somit auch keine Besserung der sensomotorischen Leistungen bewirken können. Nachdem Moy et al. 1997 den Nachweis erbrachten, dass sich Tiere, bei denen sowohl das dopaminerge als auch das serotonerge System geschädigt wurden, genauso verhielten, wie nur dopaminerg-läsionierte Tiere, war klar, dass Serotonin nicht als alleiniger Kompensationsmechanismus fungiert. Im Gegenzug erweckte die Feststellung, dass das Ausmaß der 5-HT-Reinnervation eng mit dem Grad der sensomotorischen Ausfälle korreliert, 1987 bei Whishaw und Mitarbeitern den Verdacht, dass 5-HT evtl. eine der Ursachen für die beobachteten leichten Ausfälle sein könnte und auch Joyce et al. (1996) vermutete, dass die serotonerge Hyperinnervation nach neonataler 6-OHDA Läsion die beobachteten oralen Dyskinesien der Tiere mitbedingen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Vielzahl der Veränderungen im neonatal läsionierten Tier zwar Erklärungsansätze für deren kompensatorische Fähigkeiten liefert, aber noch keine zufriedenstellende Beantwortung dieser Frage erlaubt.

4.2 Immunhistochemische Auswertung

4.2.1 Lichtmikroskopische Auswertung

a) Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Färbung

Die immunhistochemische Aufarbeitung der Hirne zeigt die morphologischen Korrelate zu unseren bisherigen Resultaten. Die Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Färbung erbringt die aussagekräftigsten Ergebnisse und wird im Anschluss densitometrisch quantifiziert. In der Kontrollgruppe zeigt sich hier eine kräftige, gleichmäßige Anfärbung des CPu (Abb. 9a'), welche auf einen hohen Gehalt dieses Enzyms hinweist. Bei läsionierten Tieren, konnte diese intensive TH-Färbung erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden, wie die Abb. 9a'' belegt. Dies bestätigt die Arbeit von Xavier und Mitarbeitern (2005), welcher ebenfalls eine signifikante Abnahme der optischen Dichte, sowie der Neuronendichte in densitometrischen Quantifizierungen 6-OHDA-läsionierter Ratten findet. Das CPu erscheint bei diesen Tieren blass und selbst der dopaminarme Kortex (Björklund et al., 1983) ist kräftiger angefärbt. Auf Grund des deutlichen Ausmaßes der dopaminergen Deafferenzierung führten wir keine stereologische Quantifizierung der verbliebenen TH-positiven Neurone durch. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei unserem Versuchsaufbau ca. 98% der dopaminergen Neurone degeneriert sind, so wie es von Snyder-Keller et al. (1989) und anderen Arbeitsgruppen beschrieben wird.

4.3 Densitometrische Auswertung

Die Densitometrie ist eine geeignete Methode zur semi-quantitativen Erfassung von Farbeintensitäten (optische Dichte, OD) in immunhistochemischen Schnitten (Oberholzer et al., 1996; Xavier et al., 2005). Um den Effekt von Schnittdicken- und immunhistochemischen Variabilitäten auf die OD zu reduzieren, wurden die Dichtewerte bezüglich des unspezifisch gefärbten Hintergrundes bildanalytisch korrigiert.

Da einige Tiere nach der Behandlung verstarben, waren die Stichprobengrößen unterschiedlich. Jedoch dürfen Stichproben unterschiedlicher Größe mit dem nicht-parametrischen U-Test verglichen werden (Bortz, 1989). Bei klinischen Studien sind einfach-blinde oder doppelt-blinde Auswertungen zwingend erforderlich, um die Evidenz bzw. Glaubhaftigkeit und damit die Objektivität zu erhöhen. Die Maskierung, insbesondere des Verhaltenstests, konnte in dieser Untersuchung nicht erfolgen, da die aufwendige Vorbereitung und langwierige Auswertung des Verhaltenstests lediglich von zwei Mitarbeitern unseres Institutes vorgenommen wurde. Außerdem wurde bei den Tieren ein zeitunabhängiges,

qualitativ nominales Merkmal bzw. Ereignis gezählt, das entweder eindeutig ausgeprägt und erkennbar war, oder nicht. Bei der Densitometrie wusste der Auswerter nicht, aus welcher Versuchstiergruppe die Schnitte kamen, allerdings ließ sich auf Grund der immunhistochemischen TH-Färbung deutlich erkennen, aus welcher Gruppe das Präparat stammte. Da weiterhin das gesamte CPu für die Messung abgegrenzt werden musste, und nicht etwa kreisförmige Stichproben in bestimmten Bereichen des CPu vom Auswerter gesetzt wurden, kann an dieser Stelle kein Bias oder systematischer Fehler zustandekommen.

Die Densitometrieergebnisse der Kontrollgruppe lagen bei ca. 11 Prozent, was bedeutet, dass die Intensität der TH-Darstellung hier 11% der maximal möglichen Intensität (Schwarz) beträgt. Vergleicht man dies mit der Gruppe der läsionierten Ratten, so fällt auf, dass die geschädigten Tiere eine erhebliche Reduktion der Intensität auf ca. 2% aufweisen. Dies belegt eine Verminderung dieses Parameters in dieser Gruppe um mehr als 80%, bedingt durch die Wirkung des Neurotoxins 6-OHDA (Xavier et al., 2005). Dieser Wert entspricht den bisherigen Literaturangaben (Snyder-Keller et al., 1989). Zwar ist die Färbeintensität nicht gleich der TH-Faserdichte (Anzahl TH-positiver Fasern je Fläche), doch ist es zulässig eine direkte Korrelation beider Parameter zu unterstellen, wenn man davon ausgeht, dass sich die Fasern relativ gleichmäßig anfärben, was laut Burke und Mitarbeitern (1990), die die TH-Färbung als robuste und gleichmäßige Färbung beschreiben, der Fall ist.

Die Densitometrie belegt nicht nur die erfolgreiche dopaminerge Deafferenzierung des nigrostriatalen Systems, sondern liefert auch die Beweise für die erfolgte Dopaminsynthese der transplantierten Zellen: Die Tiere, die ein Transplantat in das rechte Striatum erhielten, zeigen auf dieser Seite eine deutlich erhöhte mittlere Dichte (14,5%). Verglichen mit der kontralateralen (linken) Seite des selben Individuums, als auch im Vergleich mit den nur-läsionierten Tieren, ist dieser Unterschied mit $p = 0,003$ statistisch hoch signifikant.

Zusammen mit den fluoreszenzmikroskopischen Bildern ergibt sich hieraus, dass die CSM14.1-Zellen erfolgreich den dopaminergen Differenzierungsweg eingeschlagen haben, an dessen Ende ein eindeutiger, messbarer, motorischer Verhaltenseffekt steht. Die Bedeutung dieses Resultats wird ersichtlich, da eine weitere Arbeit (Haas; in Vorbereitung) das gleiche Experiment an adulten Hemiparkinsonratten durchführt, wobei keine neuronale Differenzierung der CSM14.1-Zellen gefunden wird, sondern diese Zellen in den adulten Tieren eine gliale Differenzierung zu GFAP-positiven Zellen zeigen.

Eine Besonderheit, die bei der Datenerhebung ins Auge fällt, ist die Tatsache, dass die transplantierten Tiere mit ihren densitometrischen Daten über den Werten der intakten

Kontrolltiere liegen. Auch wenn dieser Unterschied nur 3,35% beträgt und statistisch nicht signifikant ist ($p = 0,116$), erfordert dies eine nähere Untersuchung.

Eine Erklärung liegt in der experimentell veränderten Struktur des Striatums: Bei unserem Eingriff transplantierten wir ca. 100.000 Zellen in das Striatum – einer Hirnregion, die unter physiologischen Bedingungen kaum dopaminerge Neurone enthält, sondern diesen Transmitter mittels axonalem Transport aus der Substantia nigra erhält (Reader und Dewar, 1999). Im CPu der Ratte kommen dopaminergen Zellsomata sehr selten vor (Betarbet et al., 1997), und dann auch keinesfalls so zahlreich wie bei den hier gezeigten transplantierten Tieren, so dass das artifizielle Einbringen dopaminergener Neurone in diese Hirnregion eine Erklärung für den erhöhten OD-Wert der transplantierten Gruppe sein könnte. Desweiteren kommt eine interindividuell unterschiedliche Reaktivität der immunhistochemisch markierten Strukturen als Fehlerquelle in Betracht (Xavier et al., 2005).

4.3.1 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Da die PKH-26 Färbung eine robuste Färbemethode ist, die auch das Freeze & Thaw Verfahren übersteht und Zellen nachweislich bis zu 4 Monate nach Transplantation markiert (Haas et al., 2000), konnte der morphologische Nachweis bei den transplantierten Ratten mittels Immunfluoreszenzmikroskopie erfolgen. Die PKH-26-markierten mesenzephalen CSM14.1-Progenitorzellen bilden mit ihren Axonen ein netzförmiges Gebilde, welches von dichtem Gliagewebe umgeben ist. In dem Transplantat finden sich einige doppelt markierte Zellen, die neben der roten PKH-26- auch die grüne TH-Fluoreszenz emittieren (Abb. 11e + f und Abb. 12b – d). Dies ist ein Hinweis, dass sich diese Zellen in einen dopaminergen Phänotyp differenziert haben. Auch der Nachweis einer PKH-26 und NeuN - Kolokalisation dieser Zellen (Abb.11c + d) belegt eine neuronale Differenzierung. Zusammen mit den Veränderungen des motorischen Verhaltens legt dies den Schluss nahe, dass die CSM14.1-Zellen aktiv Dopamin synthetisieren und sezernieren, was einer funktionellen Restitution des läsierten CPu entspricht.

Wir fanden keine Kolokalisation PKH-26-positiver Zellen mit GFAP. Allerdings ist die mikroskopische Auswertung glialer Marker nur eingeschränkt beurteilbar, da das umgebende Gliagewebe sehr intensiv fluoresziert und einen eventuell vorhandenen, schwachen Randsaum um eine PKH-26-positive Zelle überstrahlen könnte.

Die Vitalität der Zellen wird durch die erfolgte Differenzierung und das beobachtete Migrationsverhalten belegt: Durch Objektmikrometer-Schätzungen konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen zw. 800 – 1100 μm in das umliegende Wirtsgewebe migriert sind,

was in etwa den Werten bei adulten Tieren entspricht, wo sie nach Transplantation in die SN (vom Injektionskanal gemessen) zw. 700 – 1400 µm zurücklegten (Petrov, 2004).

Hinweise auf eine unkontrollierte Zellteilung im Transplantat, welche eventuell zu einer Tumorgenese hätten führen können, fanden wir nicht. Dies bestätigt Voruntersuchungen von Haas und Wree (2002) an dieser Zelllinie, in denen gezeigt wurde, dass diese Zellen bei 39° C (der Hirntemperatur von Ratten; Gordon, 1990) nicht proliferieren. Auch fallen bei der Betrachtung der Ventrikelform keine ungewöhnlichen Veränderungen auf, die für eine übermäßige Druckerhöhung seitens des Transplantats sprechen würden. Diese Beobachtung schließt zwar eine Tumorgenese nicht vollständig aus, da auch während der Gewebsgewinnung und –bearbeitung mechanische Kräfte auf die Schnitte einwirkten, macht sie aber weniger wahrscheinlich.

Wir werten daher das Überleben und die dopaminerge Differenzierung der CSM14.1 - Zellen als Hinweis auf die wachstumsfördernden Eigenschaften des neonatalen Milieus. Welche Faktoren daran beteiligt sein könnten, wird im Abschnitt 4.4 näher erläutert.

4.3.2 Beurteilung der Primärantikörper

Da neben PKH-26 auch noch andere Substanzen zur Markierung bestimmter Strukturen verwendet wurden und ebenfalls potentielle Fehlerquellen im Versuchsaufbau sind, soll an dieser Stelle noch etwas näher auf diese Stoffe eingegangen werden.

a) Anti-Tyrosin-Hydroxylase

Anti-TH bindet an das N-terminale Ende und reagiert sowohl mit der humanen Form des Enzyms, als auch mit der in der Ratte exprimierten Variante (Sigma Produktinformation). Da die Tyrosin-Hydroxylase das Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese ist (Betarbet et al., 1997), wäre es natürlich auch möglich, dass noradrenerge und adrenerge Zellen durch unsere Färbung dargestellt wurden, was jedoch auf Grund der Tatsache, dass die Tiere motorische Verbesserungen erfahren haben und diese Verbesserungen auf die Anwesenheit von Dopamin schließen lässt, unwahrscheinlich ist.

b) Anti – NeuN

Anti -“Neuronal Nuclei” (NeuN) bindet an eine Neuronen-spezifische DNA-Bindungsstelle und markiert dadurch nahezu alle Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems. Eine Ausnahme hiervon bilden z.B. die Purkinje-, Mitral- und Photorezeptorzellen der Retina (Wolf et al., 1996). Die Färbung konzentriert sich v.a. auf den Kern, ist aber auch im Zyto-

plasma und in den anfänglichen Axonabschnitten erkennbar. Der Marker kann sowohl bei adulten als auch neonatalen Tieren der meisten Vertebraten eingesetzt werden (Chemicon Produktinformation), allerdings nur, wenn sich die Zellen bereits im postmitotischen Stadium befinden (Mullen et al., 1992). Anti-NeuN ist somit ein geeigneter Marker zur Identifizierung neuronaler Zellen. Wegen der kräftigen Anfärbung fast aller postmitotischer Neurone, hat sich NeuN als Standardmarker für Nervenzellen durchgesetzt (Gage et al., 1995).

c) **Anti – GFAP**

In Gewebeproben von Schweinen, Nagern und Menschen konnte gezeigt werden, dass der Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (engl. Glial fibrillary acidic protein = GFAP) mit hoher Spezifität an ein Intermediärfilament von Astrozyten und Gliazellen bindet (Chekhonin et al., 2001). Gegen Vimentin – einem Zytoskelettfilament, welches gelegentlich in Gliomzellen oder Astrozyten koexprimiert wird richtet sich Anti-GFAP nicht (Sigma Produktinformation). Auch kommt es nicht gemeinsam mit Neurofilamenten in einer Zelle vor (Petrov, 2004). Eingeschränkt wird seine Spezifität lediglich dadurch, dass sich dieser Marker auch gegen alle Neoplasien, die von den genannten Zellarten ausgehen (z.B. Gliome), richtet. Da solche Neoplasien in unseren Transplantaten nicht zu beobachten waren, ist dieser Antikörper zur Detektion glialer und astrozytärer Zellen geeignet.

4.4 Die morphologische Integration und TH-Synthese ektop transplantierter CSM14.1-Zellen

Die Transplantation von NMZs erfolgte bislang v.a. in adulte Tiere, doch mit meist unbefriedigenden Ergebnissen. Die Anzahl überlebender Zellen lag oft deutlich unter 20% (Rosenblad et al., 1996; Sortwell et al., 2001; Chaturvedi et al., 2003). Nach der Transplantation von fetalen, dopaminergen Zellen in adulte Tiere (P₂₀) beobachteten Bentlage und Mitarbeiter (1999) eine Konglomeratbildung der Zellen – die Neurone lagen in tropfenförmigen Haufen zusammen und zeigten morphologisch kaum eine Interaktion mit dem Wirtsgewebe. Wie Snyder-Keller et al. (1989) herausfand, lag das Faserwachstum nur bei ca. 1-2 mm und die Dopamin-Sekretion der Zellen erfolgte ungesteuert.

Anders hingegen war die Situation in jüngeren Tieren (P₃ , P₁₀): Hier bildeten die in die SN transplantierten NMZs dichte Zellverbände (Netze) und zeigten ein wesentlich intensiveres Faserwachstum, welches z.T. das CPu oder das mediale Vorderhirnbündel erreichte (Bentlage et al., 1999). Auch war die Besserung der klinischen Symptome bei den jüngeren Ratten (bis

max. P₁₀) im Rotationstest viel ausgeprägter, was darauf schließen lässt, dass die transplantierten Zellen wesentlich besser in das nigro-striatale System eingebunden und von diesem kontrolliert wurden. Da in unserer Arbeit statistisch signifikante Ergebnisse im Zylindertest erzielt wurden, kann man davon ausgehen, dass in unserem Modell mindestens 8000 – 10.000 Zellen überlebt haben, da Bentlage und Mitarbeiter 1999 zeigten, dass zum Erlangen motorischer Besserungen diese Anzahl überlebender Zellen nötig ist.

Unsere Ergebnisse nach der Transplantation von CSM14.1 Progenitorzellen in das bilateral läionierte, neonatale Rattenhirn bestätigen die Arbeiten von anderen Forschungsgruppen. So zeigten Anton und Mitarbeiter 1994, dass die Transplantation von temperatursensitiven, immortalisierten, nigralen Progenitorzellen im adulten IPS-Rattenmodell zu langanhaltenden motorischen Verbesserungen führte, die nachweislich auf eine vermehrte DA-Bildung zurückzuführen waren (Anton et al., 1994). Gestützt wird diese Beobachtung durch Haas und Wree (2002), der bei den temperatursensitiven CSM14.1-Zellen nach Anhebung der Temperatur auf 39° C eine vermehrte TH-Expression *in vitro* beobachten konnte. Auch die Arbeitsgruppe um Cattaneo zeigte 1998, dass temperatursensitive Progenitorzellen *in vivo* überleben und sich sowohl in adulten als auch in neonatalen Tieren in eine neurogene und/oder gliale Richtung differenzieren können. Weder Cattaneo et al. (1998) noch wir haben eine Tumorgenese nach Transplantation der Progenitorzellen beobachtet.

Experimente mit anderen Transplantaten (z.B. Xenotransplantaten) ergaben, dass eine erfolgreiche Integration des Transplantats mehr vom Alter des Empfängers als vom Typ des Transplantats abhängt (Snyder-Keller et al., 1989; Bentlage et al., 1999).

Desweiteren fiel nach 6-OHDA Läsion die massive Behinderung älterer Tiere auf, welche in dieser Form bei Jungtieren nicht zu verzeichnen war. Wie im Kapitel 4.1 ausgeführt, verstarben einige Adulte an einer bilateralen DA-Depletion (oft bedingt durch Aphagie und Adipsie), während Neugeborene diesen Eingriff wesentlich besser - oft sogar ohne größere motorische Ausfälle - verkrafteten (Snyder-Keller et al., 1989; Luthman et al., 1994; Neal-Beliveau et al., 1999).

In Hinblick darauf stellt sich die Frage, warum eine Integration von Zelltransplantaten in adulte Tiere bislang scheiterte bzw. erheblich schlechtere Ergebnisse lieferte (Hermann et al., 1991; Mendez et al., 1996; Bentlage et al., 1999; Haas, in Vorbereitung)? So wird die Ansicht vertreten, dass das adulte Hirn wesentlich mehr inhibitorische Faktoren exprimiert als das neonatale (Mendez et al., 1996; Olsson et al., 1997; Sortwell et al., 2001) und dass adulte Astrozyten eine Neurogenese in dieser Hirnregion bei Weitem nicht mehr so intensiv unterstützen, wie sie es beim neonatalen Tier tun (Krobert et al., 1997; Joosten et al., 2004).

Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, werden im Folgenden die Faktoren erläutert, die in der Literatur diesbezüglich als wesentlich erachtet werden. Vorgreifend lässt sich aber bereits jetzt sagen, dass das biochemische Milieu im adulten Hirn die strukturelle und funktionelle Integration transplanteder NMZs wesentlich weniger unterstützt, als das Milieu eines juvenilen, sich noch in der Entwicklung befindlichen Hirnes.

4.4.1 Transplantation in neonatale Tiere

Die Tatsache, dass die motorischen Veränderungen in Abhängigkeit vom Läsionsalter (neonatal, juvenil, adult) sehr unterschiedlich sind (Castaneda et al., 1990; Penit-Soria et al., 1997 Breese et al., 2005), lässt darauf schließen, dass die funktionelle Integration der Zellen auch vom Alter des Wirtstieres abhängt (Snyder-Keller et al., 1989). Versuche NMZs in adulte Tiere zu transplantieren, verliefen hinsichtlich der schlechten Überlebensrate von 5-20% nicht zufriedenstellend (Rosenblad et al., 1996; Sortwell et al., 2001; Chaturvedi et al., 2003). Obwohl sich bei diesen Experimenten im Bereich der Substantia nigra (v.a. dorsal) einige Zellkonglomerate fanden, die auch kurze Fortsätze bildeten, wurde die nigro-striatale Projektion nicht verbessert und es erfolgte auch keine Kollateralbildung vom nigro-striatalen Trakt zum Transplantat (Nikkhah et al., 1994). Da dies jedoch bei homotopen Transplantaten eine der Grundvoraussetzungen für die erfolgreiche Behandlung des IPS ist (Kapitel 1.2.3), muss versucht werden die Kollateralbildung zu induzieren. Folgende Faktoren fördern die Integration transplanteder NMZs und werden in der Literatur als relevant betrachtet:

- | | |
|--------------------------|--|
| a) Faktoren der ECM: | NCAM. |
| b) Astrozytäre Faktoren: | Chondroitin-6-Sulfat, Tenascin, Laminin. |
| c) Wachstumsfaktoren: | PDGF, GDNF, BDNF, CNTF. |

4.4.2 Veränderte neuronale, zelluläre Adhäsionsmoleküle (NCAM)

Bereits 1996 stellten Barker und Mitarbeiter fest, dass das adulte Hirngewebe für aus-sprossende Axone schwerer zu durchdringen sei als das juvenile. In der frühen Reifungsphase des dopaminergen Systems spielt die polysialisierte Form des Adhäsionsmoleküls (PAS-NCAM) mit einem Molekulargewicht (MG) von 200-230 kDa eine herausragende Rolle für das Auswachsen der Neuriten (Uryu et al., 1999). Es enthält alpha-2-8-gebundene N-Acetylneuraminsäure-Reste, welche die Adhäsivität, im Vergleich zu der adulten Form (die diese Reste nicht hat), deutlich mindern (Butler et al., 1997). Diese Form des Moleküls wird im dorsolateralen Striatum bis zu Beginn der 4. Lebenswoche exprimiert, um danach durch die leichtere Isoform (MG 140-180 kDa) ersetzt zu werden, welche diese Reste nicht mehr

aufweist (DiFiglia et al., 1989; Uryu et al., 1999). Da das Axonwachstum im CPu bis P₁₈ im Wesentlichen abgeschlossen ist, wird vermutet, dass die nicht-polysialisierte Form der Stabilisierung synaptischer Kontakte dient (Uryu et al., 1999), denn der Verlust dieses chemischen Restes erhöht die Bindungskraft des NCAM um das 4-5fache (Szele et al. 1994; Gopinath et al., 1996; Butler et al., 1997). Diese Theorie wird dadurch erhärtet, dass die Synapsenbildung im CPu zwischen P₁₃-P₁₇ erfolgt und die Herunterregulation von PAS-NCAM ab dem 18. postnatalen Tag beginnt (Uryu et al., 1999). Die selbe Arbeitsgruppe fand 1999 weitere Belege für diese Theorie, da sie nachweisen konnte, dass im adulten Tier PAS-NCAM v.a. in Gebieten mit erhöhter Plastizität vorkommt. Auch nach Hirnverletzungen wurde ein Wiederanstieg des PAS-NCAM in den verletzten Gebieten beobachtet (Krushel et al., 1995), was – durch die verminderte Bindungskraft – ein (erneutes) Axonwachstum begünstigt. Auch stellte diese Arbeitsgruppe fest, dass kurz nach der PAS-NCAM Verminderung (3. Lebenswoche) elektrophysiologische Aktivitäten im CPu messbar wurden. Gopinath et al. (1996) vermutet, dass die DA-Zelle mit der Expression des reifen NCAM ihre Migration stoppt und die TH-Synthese aufnimmt. Der Grund für die erschwerte Durchdringbarkeit des Neuropils für auswachsende Axone liegt wahrscheinlich in der erhöhten Adhäsionskraft des reifen NCAM und dem daraus resultierenden verminderten Abstand zwischen den Zellmembranen im Gewebe. Diese Theorie wird dadurch gestützt, dass die PAS-NCAM Verminderung zeitnah zur intrazellulären Herunterregulation von Dynamin-1, einem Mikrotubulinassoziierten-Protein (MAP) erfolgt. Diese Vorgänge führen zur Stabilisierung des Zytoskeletts, was schließlich in der adulten Formgebung der Zelle mündet (Szele et al., 1994). Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Rückbildung von PAS-NCAM im Striatum dem gleichen kaudo-rostralen Gradienten folgt wie die Neuronenreifung (Szele et al., 1994).

4.4.3 Die Rolle der Astrozyten

Dass Astrozyten während der Hirnentwicklung eine bedeutende Rolle spielen, belegen zahlreiche Arbeiten (Krobert et al., 1997; Pierret et al., 1998; Reuss et al., 2000; Chadi et al., 2004; Joosten et al., 2004). Während der Entwicklung neuronaler Strukturen vermitteln Astrozyten das Auswachsen von Neuronen sowie deren Zielführung, wozu ein Zell-zu-Zell Kontakt nötig scheint (Joosten et al., 2004). Dieser Kontakt könnte sowohl über Cadherine als auch über NCAM vermittelt werden. Desweiteren ist bekannt, dass Astrozyten eine Reihe von Faktoren sezernieren, welche das Faserwachstum beeinflussen, z.B. bFGF, FGF-2, Laminin, Integrine und Proteoglykane (Reuss et al., 2000; Joosten et al., 2004). In welchen Mengen und

unter welchen Umständen diese Faktoren gebildet werden, ist derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen. Die Arbeitsgruppe um Krobert fand 1997, dass ältere Astrozyten mehr wachstumsinhibierende Substanzen, wie zum Beispiel Chondroitin-6-sulfat, Tenascin und verschiedene Proteoglykane bilden, womit evtl. erklärt werden kann, warum Astrozyten die Integration von Zelltransplantaten in adulten Hirnen weniger unterstützen, als sie dies bei neonatalen tun (Krobert et al., 1997). Auch könnten transplantateigene, embryonale Gliazellen durch diese vermehrte Produktion inhibierender Faktoren behindert werden. Dazu passt auch die Beobachtung von Mendez und Mitarbeitern (1996), dass das neonatale Hirn mehr wachstumsfördernde Faktoren (Laminin, Kollagen, Fibronectin) enthält (Mendez et al., 1996; Bentlage et al., 1999).

Die bessere Überlebensrate transplanteder Zellen im neonatalen oder juvenilen Hirn (Sortwell et al., 2001) könnte auch durch Faktoren wie FGF-2 bedingt sein. FGF-2 wird von Astrozyten gebildet und fördert das Überleben dopaminergischer Zellen während der Entwicklung (Reuss et al., 2000). Die Bildung dieses Faktors beginnt zwar erst nachdem die auswachsenden Neurone ihre Zielstruktur erreicht haben, dennoch führt ein (experimentell herbeigeführter) Mangel an FGF-2 zu verminderten Zelldifferenzierungs- und Überlebensraten (Reuss et al., 2000). Erwähnenswert ist auch, dass die Bildung von FGF-2 durch die DA-Synthese stimuliert wird. In Situationen verminderter DA-Bildung (wie dem IPS) könnte sich durch die verminderte Expression von FGF-2 ein Circulus vitiosus einstellen, an dessen Ende ein vermehrter Untergang dopaminergischer Neurone steht (Reuss et al., 2000). Demnach besitzen Astrozyten im adulten Hirn Eigenschaften, die ein ungünstigeres Milieu für die funktionelle Integration transplanteder Zellen schaffen.

4.4.4 Wachstumsfaktoren

Es konnte experimentell gezeigt werden, dass hohe Konzentrationen von Wachstumsfaktoren in der Lage sind die Mitose neurogener Vorläuferzellen anzuregen (Goh et al., 2003). Daher wird im Folgenden näher auf den Zusammenhang zwischen den für das dopaminerge System wichtigen Faktoren und deren Veränderungen im neonatalen Hirn, während seiner Entwicklung, eingegangen.

4.4.4.1 Platelet derived growth factor (PDGF)

PDGF ist ein Dimer, bestehend aus einer A- und einer B-Kette, welche über eine Disulfidbindung verbunden sind. Es liegt im Extrazellulärraum als AA, AB oder BB-Isoform

vor (Smits et al., 1993). Obwohl PDGF sowohl bei neonatalen als auch bei adulten Tieren nachweisbar ist, lässt sich insbesondere in der postnatalen Reifungsphase, als auch nach traumatischen oder chemischen (z.B. 6-OHDA) Läsionen, eine stark vermehrte Expression nachweisen (Funa et al., 1996; Mohapel et al., 2005). Die Hauptfunktion dieses Proteins besteht in der proliferationsfördernden Wirkung auf Gliazellen. Die Arbeitsgruppe um Funa (1996) fand Hinweise dafür, dass die Isoform AA das Neuritenwachstum dopaminerger Zellen fördert, während BB die Anzahl TH-exprimierender Neurone erhöht (mitogene Wirkung). Im intakten Gehirn bilden Gliazellen allerdings kein PDGF (Smits et al., 1993). Diese uneinheitliche Wirkung, welche mitogen auf DA-Neurone wirkt, aber nicht zu einer quantitativen Zunahme dopaminerger Neurone im nigro-striatalen System führt (Mohapel et al., 2005), deutet auf eine zeit- und lokalisationspezifische Funktion dieses Faktors hin.

4.4.4.2 Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)

GDNF ist ein potenter neurotropher Faktor mit Wirkung auf DA-Neurone (Chaturvedi et al., 2003). Seine Wirkung wurde erstmals in Zellkulturen beobachtet, in denen er neben der Entwicklung dieser Neuronen auch deren Regeneration nach Traumata unterstützte (Oo et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um Canudas (2005) verwendet GDNF als wichtigen Marker für die axonale Sprossung nigraler DA-Neurone. Neben diesen entwicklungsfördernden Eigenschaften wurde für diese Substanz auch eine volumenvergrößernde und überlebensfördernde Wirkung auf transplantierte NMZs beschrieben. Diese Wirkung war auch zu beobachten, wenn die Zellen vor der Transplantation mit GDNF inkubiert wurden (Chaturvedi et al., 2003). Zheng und Mitarbeiter (2005) beschreiben, dass GDNF sowohl den apoptotischen als auch den nekrotischen Zelltod verzögern bzw. verhindern kann, was ein Mechanismus der überlebensfördernden Wirkung sein könnte. Während der Entwicklungsphase wird GDNF v.a. in mittelgroßen, striatalen Neuronen gebildet und vermutlich (auch) via axonalem Transport in die SNpc gebracht, weshalb es auch in einigen TH-Fasern nachweisbar ist (Oo et al., 2005). Seine Expression erfolgt aber nur zwischen E₂₀ – P₇, weshalb in voll entwickelten Hirnen die neurotrophe Wirkung dieses Faktors nicht mehr nachweisbar ist (Strömberg et al., 1993). Ähnliche Erkenntnisse erbrachten *in situ* Hybridisierungs-Experimente von Rosenblad et al. (1996). Obwohl nach Hirnverletzungen GDNF-positive Gliazellen beobachtet wurden, geht man derzeit davon aus, dass im intakten postnatalen Hirn lediglich striatale Neurone diesen Faktor bilden (Oo et al., 2005). Die Produktion dieses Faktors im Striatum sich entwickelnder Hirne kann als weiteres Argument für die bessere Integration transplanterter NMZs in neonatale Hirne gewertet werden. Ein Therapieansatz zur Verbesserung des

geschädigten nigro-striatalen Systems in IPS-Patienten könnte die Implantation GDNF-transfizierter Vektoren sein, da einige Arbeiten belegen, dass dadurch die Erholung geschädigter Neurone gefördert wird (Chaturvedi et al., 2003; Zheng et al., 2005). Dieser Therapieansatz könnte auch bei älteren IPS Patienten zur Anwendung kommen, da sich beim IPS die betroffenen Neurone für lange Zeit in einem dysfunktionalen - aber noch reversiblen - Zustand befinden, bevor sie endgültig absterben (Zheng et al., 2005). Die Hoffnung auf eine erfolgreiche klinische Anwendung beim Menschen wird auch durch experimentelle Erfolge im Primatenmodell gestützt (Zheng et al., 2005) und auch in adulten Ratten wurde eine ca. 2 Wochen andauernde Erhöhung des DA-Spiegels und –metabolismus nach einmaliger GDNF-Gabe beobachtet (Rosenblad et al., 1996).

4.4.4.3 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

BDNF ist ein potentes Neurotrophin, welches im Rattenhirn ab ca. P₁₀ gebildet wird (Canudas et al., 2005). Seine Wirkung scheint v.a. darauf zu beruhen, dass es in pathologischen Situationen das Überleben dopaminergener Neurone fördert (Yoshimoto et al., 1995). Laut Krobert und Mitarbeitern (1997) könnte es bei der Bildung von Antioxidantien oder der Stabilisierung des intrazellulären Kalziumionenspiegels mitwirken. In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass BDNF sowohl die Zellverluste nach intraventrikulärer 6-OHDA Injektion um ca. 20% verminderte (Krobert et al., 1997), als auch das Überleben transplanteder NMZs und deren Axonaussprossung deutlich erhöhte (Wang et al., 2002). Wie diese Arbeitsgruppe weiterhin herausfand, sank die Apomorphin-induzierte Rotation der unilateral läsierten und anschließend mit NMZs transplanteden Ratten im Durchschnitt um 19%. Mohapel et al. fanden 2005 heraus, dass BDNF in geschädigten Gehirnen auch die Migration von Vorläuferzellen aus der SVZ in das benachbarte CPu begünstigt und dort ihre dopaminerge Differenzierung fördert. Diese Erkenntnisse legen den Schluss nahe, dass dieser Faktor v.a. in geschädigten Gehirnen für die funktionelle Restitution von Bedeutung ist, was ihn auch zur Unterstützung der Überlebensfähigkeit transplanteder NMZs geeignet erscheinen lässt.

4.4.4.4 Ciliary neurotrophic factor (CNTF)

CNTF, ein Mitglied der α -helikalen Zytokinsuperfamilie, wird erst in der zweiten postnatalen Woche exprimiert (Richardson, 1994). Der hydrophile Faktor besteht aus 200 Aminosäuren und ist im Zytoplasma von Astrozyten lokalisiert (Richardson, 1994). Sein Rezeptor besteht aus drei Einheiten: Das Grundgerüst wird von einem LIF-Rezeptor gebildet, an den eine

α -Untereinheit gebunden ist (Conover et al., 1993). Der Rezeptor CNTFR- α wird vornehmlich im ZNS gebildet, wobei er im adulten CPU allerdings nur in sehr geringem Maße vorkommt (Haas et al., 2004). Weinelt und Mitarbeiter (2003) fanden heraus, dass CNTF den Stoffwechsel und die Proliferationsrate von Stammzellen beschleunigt und die Apoptoserate der sich differenzierenden Zellen senkt. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer erhöhten neuronalen Toleranz gegenüber freien Radikalen und Veränderungen im Elektrolytmilieu (Weinelt et al., 2003). Da CNTF die Regeneration geschädigter Neurone fördern und die Apoptose verzögern kann, kommen hohe Konzentrationen dieses Faktors in der Nähe zerebraler Läsionen vor (Richardson, 1994). Wie Clatterbuck und Mitarbeiter 1996 beschrieben, begünstigt CNTF auch die Differenzierung glialer Vorläuferzellen zu Astrozyten, was mit einer erhöhten GFAP-Bildung einhergeht. Darüber hinaus induziert es die Expression des nerve-growth-factor-Rezeptors P75^{NGFR} von Mikrogliazellen. Diese Beobachtung belegt, dass dieses Zytokin sowohl auf Gliazellen, als auch auf Neurone - deren Überleben durch diesen Faktor nachweislich gefördert wird - Einfluss hat (Richardson, 1994). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Faktoren dem extrazellulären Milieu neonataler Tiere proliferations- und differenzierungsfördernde Eigenschaften verleihen, was maßgeblich zum Überleben transplantierter Zellen beiträgt.

4.5 Beantwortung der Fragestellung

Die in Kapitel 1.5 gestellten Fragen bezüglich dieser Arbeit lassen sich aus dem bisher Gesagten wie folgt beantworten:

a) *Differenzierten sich die transplantierten CSM14.1-Zellen im Milieu der neonatalen Ratte zu dopaminergen Neuronen?*

Nach den Erkenntnissen, die unsere Arbeit erbracht hat, kann davon ausgegangen werden, dass die CSM14.1-Progenitorzellen nach der intrastriatalen Transplantation in bilateral läionierte, juvenile Ratten einen dopaminergen Differenzierungsweg einschlagen haben und auch zur Dopaminsynthese und -freisetzung fähig sind. Eine gliale Differenzierung, wie sie in adulte Tieren zu verzeichnen war, konnten wir nicht feststellen.

b) *Wie stark fällt die TH-Immunreaktivität der transplantierten Tiere aus?*

Der rein subjektive Eindruck einer kräftigen TH-Immunreaktion in der TH-Färbung wurde durch die densitometrische Analyse der Schnitte bestätigt. Die optische Dichte der transplan-

tierten Tiere lag um 12,37% über den Werten der bilateral läsionierten Tiere. Dieser Unterschied ist mit $p = 0,003$ statistisch hoch signifikant.

c) Wie änderte sich das motorische Verhalten der transplantierten Tiere beim Zylindertest im Vergleich zu Kontroll- und nur läsionierten Tieren?

Nachdem sowohl bei den intakten Kontrolltieren, als auch bei den läsionierten Tieren auf Grund des fehlenden interhemisphärischen DA – Ungleichgewichts keine Präferenz einer Vorderpfote im Zylindertest erkennbar war, zeigten die transplantierten Tiere eine deutliche Bevorzugung der – kontralateral zum Transplantat gelegenen – linken Pfote. Der Unterschied war mit $p = 0,042$ statistisch signifikant.

4.6 Ausblicke

Abschliessend lässt sich sagen, dass die von uns in neonatale (P_3) Ratten transplantierten CSM14.1-Zellen in der Lage waren, sich dopaminerg zu differenzieren. Die guten funktionellen und morphologischen Resultate, verbunden mit den signifikanten Ergebnissen des Verhaltenstests, legen den Schluss nahe, dass durch die Transplantation der CSM14.1-Zellen eine funktionelle Restitution des nigro-striatalen Systems gelang.

Auch wenn erste Erfolge der Transplantationstechnik unbestreitbar sind, so muss man doch einräumen, dass in klinischen Studien v.a. jüngere Patienten (unter 60 Jahren) von diesem Verfahren profitieren – ein Alter, welches die Zielgruppe dieser Therapie (Patienten bei denen das pharmakologische Therapiepotential ausgeschöpft ist) meist überschritten haben (Greene und Fahn, 2002). Nach Aussage dieser Autoren verschlechterten sich bestimmte Fähigkeiten der älteren Patienten (v.a. Gehen und Gleichgewicht) nach der Transplantation von NMZs sogar. Im Durchschnitt besserte sich der UPDRS-Wert lediglich um 28% (Freed et al., 2001), was angesichts erfolgsversprechender Alternativen, wie der tiefen Hirnstimulation (Vitek, 2002), als ungenügend zu bewerten ist. Da in dieser Arbeit keine Aussage zur Rate der überlebenden Zellen gemacht werden konnte, kann diesbezüglich auch kein Vergleich mit adulten Tieren durchgeführt werden. In der Literatur wird beschrieben, dass im neonatalen Hirn deutlich mehr Zellen überleben als im Adulten (Sortwell et al., 2001). Durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren (PDGF, BDNF, GDNF, u.a.) und Apoptosehemmern, wird versucht dem Ziel einer möglichst hohen Überlebensrate transplanterter Zellen näherzukommen. Dass es sich lohnt, diesen Ansatz weiter zu verfolgen, belegen Resultate von Lindvall und Hagell (2002a), die nachweisen konnten, dass die Anwendung solcher Faktoren das Überleben um den Faktor 2-4 erhöhen kann.

Im Hinblick auf die gravierenden Unterschiede zwischen den Resultaten adult- vs. neonatal-transplanteder Tiere, sowie den in Kapitel 4.4 diskutierten Aspekten bezüglich der Expression einzelner Faktoren, liegt es Nahe, das genaue Expressionsmuster dieser Substanzen zu analysieren und herauszufinden, wie sich die Synthese dieser Faktoren in der weiteren zeitlichen Entwicklung der Tiere gestaltet. Dazu ist es notwendig, die Proteinexpression eines neonatalen Tieres zu analysieren und zu vergleichen, welche Proteine in der jeweiligen Gruppe zu bestimmten Zeitpunkten hoch- oder herunterreguliert wurden. Obwohl Saunders und Mitarbeiter bereits 1999 konstatierten, dass das Neuropil des neonatalen Hirns eine völlig andere Milieuzusammensetzung aufweist als das des adulten Tieres, ist eine topografisch definierte Proteom- und Transkriptom-Analyse bis heute nicht erfolgt.

Unsere Ergebnisse stützen Befunde anderer Gruppen, die erhebliche Unterschiede zwischen der neonatalen und der adulten „CPu-Nische“ (Doetsch, 2003) eruierten, so dass es sinnvoll ist, diese zeitlich variablen Strukturen mittels differentieller Fragestellung auf der Transskriptom- und Proteomebene gezielt zu untersuchen. Vielleicht ist es dann möglich ein Milieu zu erzeugen, in dem Zelltransplantate zur strukturellen oder sogar funktionellen Integration führen, um traumatisch oder degenerativ veränderte Gehirne effektiver therapieren zu können. Im Mittelpunkt unserer Bemühungen steht das Ziel, IPS-Patienten eine Alternative zu den bisherigen Therapieformen, welche oftmals mit erheblichen unerwünschten Wirkungen und Risiken einhergehen, anbieten zu können.

5 Literaturverzeichnis

Abrous DN, Choulli K, Simon H, LeMoal M, Herman JP (1990) Behavioural effects of intracerebral dopaminergic grafts after neonatal destruction of the mesencephalic dopaminergic system. *Prog Brain Res* 82: 481-487.

Abrous DN, Torres EM, Dunnett SB (1993) Dopaminergic grafts implanted into the neonatal or adult striatum: Comparative effects on rotation and paw reaching deficits induced by subsequent unilateral nigrostriatal lesions in adulthood. *Neuroscience* 54: 657-668.

Anton R, Kordower JH, Maidment NT, Manaster JS, Kane DJ, Rabizadeh S, Schueller SB, Yang J, Rabizadeh S, Edwards RH, Markham CH, Bredesen DE (1994) Neural-targeted gene therapy for rodent and primate Hemiparkinsonism. *Exp Neurol* 127: 207-218.

Anton R, Kordower JH, Kane DJ, Markham CH, Bredesen DE (1995) Neural transplantation of cells expressing the anti-apoptotic gene bcl-2. *Cell Transplant* 4: 49-54.

Asan E (1993) Comparative single and double immunolabeling with antisera against catecholamine biosynthetic enzymes: Criteria for the identification of dopaminergic, noradrenergic and adrenergic structures in selected rat brain areas. *Histochemistry* 99: 427-442.

Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Anselme LP, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MAS, Studer L (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in Parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 2: 1200-1207.

Barker RA, Dunnett SB, Faissner A, Fawcett JW (1996) The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. *Exp Neurol* 141: 79-93.

Bauer P, Knoblich R, Mix E, Pahnke J, Rolfs A (2002) Aktueller Stand und Perspektive der Zelltransplantation bei neurodegenerativen Erkrankungen. *Dtsch Z Nervenheilkd* 21: 88-93.

Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2: 325-334.

Bentlage C, Nikkhah G, Cunningham MG, Björklund A (1999) Reformation of the nigrostriatal pathway by fetal dopaminergic micrografts into the substantia nigra is critically dependent on the age of the host. *Exp Neurol* 159: 177-190.

Bernstein C, Bernstein H, Payne C (1999) Cell Immortality: Maintenance of cell division potential. In: Macieira-Coelho A (Hrsg.): *Cell immortalization; Progress in molecular and subcellular biology*. Band 24. Springer; Berlin, Heidelberg. 23-50.

Betarbet R, Turner R, Chockkan V, DeLong MR, Allers KA, Walters J, Levey AI, Greenamyre JT (1997) Dopaminergic neurons intrinsic to the primate striatum. *J Neurosci* 17: 6761-6768.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzi G, Garcia-Osuna M, Panov AL, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3: 1301-1306.

Bezard E, Gross CE, Fournier MC, Dovero S, Bloch B, Jaber M (1999) Absence of MPTP-induced neuronal death in mice lacking the dopamine transporter. *Exp Neurol* 155: 268-273.

Björklund A, Dunnett SB, Stenevi U, Lewis ME, Iversen SD (1980) Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: Functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res* 199: 307–333.

Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH (1983) II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol Scand (Suppl. 522)*: 9-18.

Björklund A, Lindvall O (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 3: 537-544.

Bortz J (1989) Statistik für Sozialwissenschaftler. Springer; Berlin, Heidelberg, New York.

Breese GR, Napier TC, Mueller RA (1985) Dopamine agonist-induced locomotor activity in rats treated with 6-hydroxydopamine at differing ages: Functional supersensitivity of D1-dopamine receptors in neonatally-lesioned rats. *J Pharmacol Exp Ther* 234: 447-455.

Breese GR, Knapp DJ, Criswell HE, Moy SS, Papadeas ST, Blake BL (2005) The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: A model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Res Rev* 48: 57-73.

Brundin P, Pogarell O, Hagell P, Piccini P, Widner H, Schrag A, Kupsch A, Crabb L, Odin P, Gustavii B, Björklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Oertel WH, Quinn NP, Rehncrona S, Lindvall O (2000) Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarooids in Parkinson's disease. *Brain* 123: 1380-1390.

Burke RE, Cadet JL, Kent JD, Karanas AL, Jackson-Lewis V (1990) An assessment of the validity of densitometric measures of striatal tyrosine hydroxylase-positive fibers: Relationship to apomorphine-induced rotations in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *J Neurosci Methods* 35: 63–73.

Butler AK, Uryu K, Morehouse V, Rougon G, Chesselet MF (1997) Regulation of the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule in the developing striatum: Effects of cortical lesions. *J Comp Neurol* 389: 289-308.

Canudas AM, Pezzi S, Canals JM, Pallas M, Alberch J (2005) Endogenous brain-derived neurotrophic factor protects dopaminergic nigral neurons against transneuronal degeneration induced by striatal excitotoxic injury. *Brain Res Mol Brain Res* 134: 147-154.

Castaneda E, Whishaw IQ, Lerner L, Robinson TE (1990) Dopamine depletion in neonatal rats: Effects on behavior and striatal dopamine release assessed by intracerebral microdialysis during adulthood. *Brain Res* 508: 30-39.

Cattaneo E und Conti L (1998) Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J Neurosci Res* 53: 223-234.

Chadi G, Gomide VC (2004) FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *Cell Biol Int* 28: 849-861.

Chaturvedi RK, Agrawal AK, Seth K, Shukla S, Chauhan S, Shukla Y, Sinha C, Seth PK (2003) Effect of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) co-transplantation with fetal ventral mesencephalic cells (VCM) on functional restoration in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesioned rat model of Parkinson's disease: Neurobehavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. *Int J Devl Neurosci* 21: 391-400.

Chekhonin VP, Gurina OI, Dmitrieva TB, Shepeleva II, Ryabukhin IA, Babich GN (2001) Monoclonal anti-GFAP antibodies: Extraction, characteristics and immuno-enzyme assay. *Bull Exp Biol Med* 132: 188-191.

Chritin M, Feuerstein C, Savasta M (1993) Time-course of changes in striatal levels of DA uptake sites, DA D2 receptor and preproenkephalin mRNAs after nigrostriatal dopaminergic denervation in the rat. *Mol Brain Res* 19: 318-323.

Clark D, White FJ (1987) D1 dopamine receptor: The search for a function. *Synapse* 1: 347-388.

Clatterbuck RE, Price DL, Koliatsos VE (1996) Ciliary neurotrophic factor stimulates the expression of glial fibrillary acidic protein by brain astrocytes in vivo. *J Comp Neurol* 369: 543-551.

Conover JC, Ip NY, Poueymirou WT, Bates B, Goldfarb MP, DeChiara TM, Yancopoulos GD (1993) Ciliary neurotrophic factor maintains the pluripotentiality of embryonic stem cells. *Development* 119: 559-565.

Costantini LC, Isacson O (1999) Dopamine neuron grafts: Development and molecular biology. In: Di Porzio U, Pernas-Alonso R, Perrone-Capano C (Hrsg.): Development of dopaminergic neurons. Neuroscience intelligence unit 4. RG Landes Company, Austin, Texas: 123-144.

Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism - chronic treatment with L-Dopa. *N Engl J Med* 280: 337-345.

Cummings JL (1997) Parkinson's disease and Parkinsonism. In: Joseph AB, Young RR (Hrsg.): Movement disorders in neurology and neuropsychiatry. Blackwell Scientific Publication; Oxford; London: 195-203.

Davis IJ, Lau LF (1994) Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol* 14: 3469-3483.

Dawson TM, Mandir AS, Lee MK (2002) Animal models of PD: Pieces of the same puzzle? *Neuron* 35: 219-222.

Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AH (1994) Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* 35: 38-44.

Dickson DW (2002) Neuropathology of Parkinsonian disorders. In: Jankovic JJ, Tolosa E (Hrsg.): Parkinson's disease and movement disorders. 4. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, Baltimore, New York: 256-259.

DiFiglia M, Marshall P, Covault J, Yamamoto M (1989) Ultrastructural localization of molecular subtypes of immunoreactive neural cell adhesion molecule (NCAM) in the adult rodent striatum. *J Neurosci* 9: 4158-4168.

Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13: 543-550.

Donkelaar HJ, Lammens M, Wesseling P, Hori A, Keyser A, Rotteveel J (2004) Development and malformations of the human pyramidal tract. *J Neurol* 251: 1429-1442.

Ehringer H, Hornykiewicz O (1960) Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin Wochenschr*: 1236-1239.

Engelhardt M, Deschler B, Müller CI, Lübbert M (2003) Plastizität adulter Stammzellen: Wunschtraum oder Realität? *Dtsch Arztebl* 49: 2514-2520.

Ermert L, Hocke AC, Duncker HR, Seeger W, Ermert M (2001) Comparison of different detection methods in quantitative microdensitometry. *Am J Pathol* 158: 407-417.

Eulitz D (2000) Dopaminerge Neurone im motorischen und limbischen Mesenzephalon der Ratte unterscheiden sich in ihrer Ausstattung mit Kir3-Kanälen. Medizinische Dissertation, Freie Universität Berlin.

Follett KA (2004) Comparison of pallidal and subthalamic deep brain stimulation for the treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Neurosurg Focus* 17: 14-19.

Freed WJ, Morihisa JM, Spoor E (1981) Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature* 292: 351-352.

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S (2001): Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710-719.

Frohna PA, Neal-Beliveau BS, Joyce JN (1995) Neonatal 6-OHDA lesions lead to opposing changes in the levels of dopamine receptors and their mRNAs. *Neuroscience* 68: 505-518.

Funa K, Yamada N, Brodin G, Pietz K, Ahgren A, Wictorin K, Lindvall O, Odin P (1996) Enhanced synthesis of platelet-derived growth factor following injury induced by 6-hydroxydopamine in rat brain. *Neuroscience* 74: 825-833.

Gage FH, Ray J, Fisher LJ (1995) Isolation, characterisation and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18: 159-192.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Sibley DR (1990) D₁ and D₂-dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250: 1429-1432.

Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (2001) Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen, Klinik, Therapie. Springer Verlag, Wien, New York.

Goh ELK, Ma D, Ming GL, Song H (2003) Adult neural stem cells and repair of the adult central nervous system. *J Hematother Stem Cell Res* 12: 671-679.

Gopinath G, Sable V, Sailaja K, Tandon PN (1996) Cell surface molecules (NCAM and L1) in intrastriatal transplants of embryonic mesencephalon in rats. *Neuroscience* 73: 161-169.

Gordon CJ (1990) Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* 47: 963-991.

Gratzl M, Langley K (1991) Markers for neural and endocrine cells. VCH-Verlag; New York, Basel, Cambridge.

Greene PE, Fahn S (2002): Status of fetal tissue transplantation for the treatment of advanced Parkinson's disease. *Neurosurg Focus* 13: 1-4.

Haas SJP, Bauer P, Rolfs A, Wree A (2000) Immunocytochemical characterization of in vitro PKH-26-labeled and intracerebrally transplanted neonatal cells. *Acta Histochem* 102: 273–280.

Haas SJP, Wree A (2002) Dopaminergic differentiation of the Nurr1-expression immortalized mesencephalic cell line CSM14.1 in vitro. *J Anat* 201: 61-69.

Haas SJP, Ahrens A, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of ciliary neurotrophic factor. *J Anat* 204: 271-281.

Hagell P, Brundin P (2001) Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 741-752.

Haycock JW (2002) Species differences in the expression of multiple tyrosine hydroxylase protein isoforms. *J Neurochem* 81: 947-953.

Hedner T, Lundborg P (1981) Neurochemical characteristics of cerebral catecholamine neurons during the postnatal development in the rat. *Med Biol* 59: 212-223.

Herzog J, Deuschl G, Volkmann J (2003) Die tiefe Hirnstimulation in der Therapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms. *Dtsch Z Nervenheilkd* 22: 498-503.

Herman JP, Abrous DN, LeMoal M (1991) Anatomical and behavioral comparison of unilateral dopamine-rich grafts implanted into the striatum of neonatal and adult rats. *Neuroscience* 40: 465-475.

Hirsch CE, Herrero MT (1997) Neurochemical correlates of Parkinsonism. In: Obeso JA, DeLong MR, Ohye C, Marsden CD (Hrsg.) *Advances in neurology* 74, Lippincott-Raven, Philadelphia: 119-126.

Horan PK, Slezak SE (1989) Stable cell membrane labeling. *Nature* 340: 167-168.

Huneau D, Villarroya S, Scholler R (1988) Monoclonal antibody labeling of human spermatozoa: An electron microscope study. *Int J Androl* 11: 13-24.

Joosten EAJ, Veldhuis WB, Hamers FPT (2004) Collagen containing neonatal astrocytes stimulates regrowth of injured fibers and promotes modest locomotor recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 77: 127-142.

Joyce JN, Frohna PA, Neal-Beliveau BS (1996) Functional and molecular differentiation of the dopamine system induced by neonatal denervation. *Neurosci Biobehav Rev* 20: 453-486.

Kirik D, Rosenblad C, Björklund A (1998) Characterization of behavioral and neuro-degenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152: 259-77.

Krobert K, Lopez-Colberg I, Cunningham LA (1997) Astrocytes promote or impair the survival and function of embryonic ventral mesencephalon co-grafts: Effects of astrocyte age and expression of recombinant brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 145: 511-523.

Krushel LA, Sporns O, Cunningham BA, Crossin KL, Edelman GM (1995) Neural cell adhesion molecule (N-CAM) inhibits astrocyte proliferation after injury to different regions of the adult rat brain. *Proc Natl Acad Sci* 92: 4323-4327.

Larsson LC, Widner H (2000) Neural tissue xenografting. *Scan J Immunol* 52: 249-256.

Le Gros Clark WE (1940) Neuronal differentiation in implanted foetal cortical tissue. *J Neurol Psychiatry* 3: 263-284.

Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD (1990) Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247: 574-577.

Lindvall O, Hagell P (2002a) Neural and stem cell transplantation. In: Jankovic JJ, Tolosa E (Hrsg.): *Parkinson's disease and movement disorders*. 4. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, Baltimore, New York: 663-673.

Lindvall O, Hagell P (2002b): Role of cell therapy in Parkinson's disease. *Neurosurg Focus* 13: 1-9.

Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A (2004) Stem cell therapy for human neuro-degenerative disorders – how to make it work. *Nat Med* 10 Suppl: 42-50.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2001) *Molekulare Zellbiologie*. 4. Aufl. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin.

Lotharius J, Brundin P (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: Dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci* 3: 932-942.

Lundberg C, Martinez-Serrano A, Cattaneo E, McKay RDG, Björklund A (1997) Survival, integration and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp Neurol* 145: 342-360.

- Luthman J, Lindqvist E, Young D, Cowburn R (1990) Neonatal dopamine lesion in the rat results in enhanced adenylate cyclase activity without altering dopamine receptor binding or dopamine- and adenosine 3'-5'-monophosphate-regulated phosphoprotein (DARP-32) immunoreactivity. *Exp Brain Res* 83: 85-95.
- Luthman J, Herrera-Marschitz M, Lindqvist E (1994) Unilateral neonatal intracerebro-ventricular 6-hydroxydopamine administration in rats: I. Effects on spontaneous and drug-induced rotational behaviour and on postmortem monoamine levels. *Psychopharmacology* 116: 443-450.
- MacKenzie RG, Stachowiak M, Zigmond MJ (1989) Dopaminergic inhibition of striatal acetylcholine release after 6-hydroxydopamine. *Eur J Pharmacol* 168: 43-52.
- Marsden CD (1982) Basal ganglia disease. *Lancet* 2: 1141-1147.
- Marsden CD, Linazasoro G, Obeso JA (1997) An introduction to the new surgery for Parkinson's disease. In: Obeso JA, DeLong MR, Ohye C, Marsden CD (Hrsg.): *Advances in neurology*, Vol. 74, Lippincott-Raven, Philadelphia: 143-147.
- McIntyre CC, Savasta M, Walter BL, Vitek JL (2004) How does deep brain stimulation work? Present understanding and future questions. *J Clin Neurophysiol* 21: 40-50.
- McKusick VA (1998) Mendelian inheritance in man – a catalog of human genes and genetic disorders. 12. Aufl. The Johns Hopkins University Press; Baltimore, London.
- Melamed E, Zoldan J, Galili-Mosberg R, Ziv I, Djaldetti R (2000) Current management of motor fluctuations in patients with advanced Parkinson's disease treated chronically with levodopa. In: Przuntek H, Müller T (Hrsg.): *Diagnosis and treatment of Parkinson's disease – State of the Art*. Springer; Wien: 173-183.
- Mendez I, Sadi D, Hong M (1996) Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *J Neurosci* 16: 7216-7227.
- Mendez I, Baker KA, Hong M (2000) Simultaneous intrastriatal and intranigral grafting (double grafts) in the rat model of Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev* 32: 328-339.
- Meyers AR (Editor): *Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine*, Vol. 1, VCH-Verlag Weinheim, New York, Basel, Cambridge: 1996a.
- Meyers AR (Editor): *Encyclopedia of molecular biology and molecular medicine*, Vol. 2, VCH-Verlag Weinheim, New York, Basel, Cambridge: 1996b.
- Mohapel P, Frielingsdorf H, Haggblad J, Zachrisson O, Brundin P (2005) Platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induce striatal neurogenesis in adult rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Neuroscience* 132: 767-776.
- Moy SS, Criswell HE, Breese GR (1997) Differential effects of bilateral dopamine depletion in neonatal and adult rats. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 425-435.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211.

Neal-Beliveau BS, Joyce JN (1993) D1 and D2 dopamine receptors do not up-regulate in response to neonatal intrastriatal 6-hydroxydopamine lesions. *Neurosci Lett* 160: 77-80.

Neal-Beliveau BS, Joyce JN (1999) Timing: A critical determinant of the functional consequences of neonatal 6-OHDA lesions. *Neurotoxicol Teratol* 21: 129-140.

Nieuwenhuys R, Donkelaar HJ, Nicholson C: The central nervous system of vertebrates. Vol. 3, Springer; Berlin, Heidelberg; 1998.

Nikkhah G, Bentlage C, Cunningham MG, Björklund A (1994) Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci* 14: 3449-3460.

Nikkhah G, Cunningham MG, Cenci MA, McKay RD, Björklund A (1995a) Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. I. Evidence for anatomical reconstruction of the nigrostriatal pathway. *J Neurosci* 15: 3548-3561.

Nikkhah G, Cunningham MG, McKay RD, Björklund A (1995b) Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. II. Transplant – induced behavioral recovery. *J Neurosci* 15: 3562–3570.

Oberholzer M, Östreicher M (1996) Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol* 105: 333-355.

Olanow CW, Freeman TB, Kordower JH (1997) Neural transplantation as a therapy for Parkinson's disease. In: Obeso JA, DeLong MR, Ohye C, Marsden CD (Hrsg.): *Advances in neurology*, Vol. 74, Lippincott-Raven, Philadelphia: 249-269.

Olanow CW, Tatton WG, Jenner P (2002) Mechanisms of cell death in Parkinson's disease. In: Jankovic JJ, Tolosa E (Hrsg.): *Parkinson's disease and movement disorders*. 4. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia, Baltimore, New York: 38-59.

Olsson M, Bentlage C, Wictorin K, Campbell K, Björklund A (1997) Extensive migration and target innervation by striatal precursors after grafting into the neonatal striatum. *Neuroscience* 79: 57-78.

Onifer SM, White LA, Whittemore SR, Holets VR (1993) In vitro labeling strategies for identifying primary neural tissue and a neuronal cell line after transplantation in the CNS. *Cell Transplant* 2: 131-149.

Oo TF, Ries V, Cho J, Kholodilov N, Burke RE (2005) Anatomical basis of glial cell line-derived neurotrophic factor expression in the striatum and related basal ganglia during postnatal development of the rat. *J Comp Neurol* 484: 57-67.

Pankratz N, Foroud T (2004) Genetics of Parkinson disease. *NeuroRx* 1: 235-242.

Parareda A, Villaescusa JC, Sanchez de Toledo J, Gallego S (2003) New splicing variants for human tyrosine hydroxylase gene with possible implications for the detection of minimal residual disease in patients with neuroblastoma. *Neurosci Lett* 336: 29-32.

Parkinson J (1817) *An essay on the shaking palsy*. London, Sherwood, Neely and Jones.

Penit-Soria J, Durand C, Herve D, Besson MJ (1997) Morphological and biochemical adaptations to unilateral dopamine denervation of the neostriatum in newborn rats. *Neuroscience* 77: 753-766.

Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ, Seiger A, Olson L, Wyatt RJ (1979) Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204: 643-647.

Petrov S (2004) Transplantation der Progenitorzelllinie CSM14.1 in die Substantia nigra bei Hemiparkinsonratten. Medizinische Dissertation. Universität Rostock.

Pierret P, Quenneville N, Vandaele S, Abbaszadeh R, Lanctôt C, Crine P, Doucet G (1998) Trophic and tropic effects of striatal astrocytes on cografed mesencephalic dopamine neurons and their axons. *J Neurosci Res* 51: 23-40.

Pöttsch O, Sommer B (2003) Bevölkerung Deutschlands bis 2050 – Ergebnisse der 10. koordinierten Bevölkerungsvorrausberechnung. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden.

Pollack AE, Wooten GF (1992) D₂ dopaminergic regulation of striatal preproenkephalin mRNA levels is mediated at least in parts through cholinergic interneurons. *Mol Brain Res* 13: 35-41.

Pollak P, Benabid AL, Limousin P, Benazzouz A (1997) Chronic intracerebral stimulation in Parkinson's disease. In: Obeso JA, DeLong MR, Ohye C, Marsden CD (Hrsg.) *Advances in neurology* Vol. 74, Lippincott-Raven, Philadelphia: 213-220.

Reader TA, Dewar KM (1999) Effects of denervation and hyperinnervation on dopamine and serotonin systems in the rat neostriatum: Implications for human Parkinson's disease. *Neurochem Int* 34: 1-21.

Reichmann H, Goßrau G, Sommer U (2003) Neue Ansätze zur Transplantation von Dopamin produzierenden Zellen und Stammzellen. *Nervenarzt* 74: 22-26.

Reuss B, Unsicker K (2000) Survival and differentiation of dopaminergic mesencephalic neurons are promoted by dopamine-mediated induction of FGF-2 in striatal astroglial cells. *Mol Cell Neurosci* 16: 781-792.

Richardson PM (1994) Ciliary neurotrophic factor: A review. *Pharmacol Ther* 63: 187-198.

Robinson TE, Castaneda E, Whishaw IQ (1990) Compensatory changes in striatal dopamine neurons following recovery from injury induced by 6-OHDA or methamphetamine: A review evidence from microdialysis studies. *Can J Psych* 44: 253-275.

Rosenblad C, Martinez-Serrano A, Björklund A (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor increases survival, growth and function of intrastriatal fetal nigral dopaminergic grafts. *Neuroscience* 75: 979-985.

Saggu H, Cooksey J, Dexter D, Wells FR, Lees A, Jenner P, Marsden CD (1989) A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in Parkinsonian substantia nigra. *J Neurochem* 53: 692-697.

Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM (1999) Barrier mechanisms in the brain, II. Immature brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 85-91.

Schallert T, Tillerson JL (1999) Intervention strategies for degeneration of dopamine neurons in Parkinsonism. *Central nervous system disease*, Humana Press Inc., Totowa: 131-151.

Schulz JB, Matthews RT, Muqit MMK, Brown SE, Beal MF (1995) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem* 64: 936-939.

Shimura H, Hattori N, Kubo S (2000) Familial Parkinson's disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25: 302-305.

Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB (1989) *Basic neurochemistry*. 4. Aufl. Raven Press, New York.

Smits A, Odin P, Duan WM, Brundin P, Widner H, Heldin CH, Lindvall O, Funa K (1993) Expression of platelet-derived growth factor in and around intrastriatal embryonic mesencephalic grafts. *Cell Transplant* 2: 151-162.

Snyder AM, Stricker EM, Zigmond MJ (1985) Stress-induced neurological impairments in an animal model of Parkinsonism. *Ann Neurol* 18: 544-554.

Snyder AM, Zigmond MJ, Lund RD (1986) Sprouting of serotonergic afferents into striatum after dopamine-depleting lesions in infant rats: A retrograde transport and immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 245: 274-281.

Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Anorl-Aldea S, Hartwig EA, Cepko CL (1992) Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* 66: 33-51.

Snyder-Keller AM, Carder RK, Lund RD (1989) Development of dopamine innervation and turning behavior in dopamine-depleted infant rats receiving unilateral nigral transplants. *Neuroscience* 30: 779-794.

Spiegel EA, Wycis HT, Marks M, Lee AJ (1947) Stereotaxic apparatus for operations on the human brain. *Science* 106: 349-350.

Strömberg I, Björklund L, Johansson M, Tomac A, Collins F, Olson L, Hoffer B, Humpel C (1993) Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo. *Exp Neurol* 124: 401-412.

Sortwell CE, Camargo MD, Pitzer MR, Gyawali S, Collier TJ (2001) Diminished survival of mesencephalic dopamine neurons grafted into aged hosts occurs during the immediate postgrafting interval. *Exp Neurol* 169: 23-29.

Sudha K, Rao A, Rao S, Rao A (2003) Free radical toxicity and antioxidants in Parkinson's disease. *Neurol India* 51: 60-62.

Szele FG, Dowling JJ, Gonzales C, Theveniau M, Rougon G, Chesselet MF (1994) Pattern of expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing and adult rat striatum. *Neuroscience* 60: 133-144.

Thompson WG (1890) Successful brain grafting. *NY Med J* 51: 701-702.

Tintner R, Jankovic J (2002) Treatment options for Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 15: 467-476.

Tipton KF, Singer TP (1993) Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J Neurochem* 61: 1191-1206.

Toda H, Hamani C, Lozano A (2004) Deep brain stimulation in the treatment of dyskinesia and dystonia. *Neurosurg Focus* 17: 9-13.

Towle AC, Criswell HE, Maynard EH, Lauder JM, Loh TH, Mueller RA, Breese G (1989) Serotonergic innervation of the rat caudate following a neonatal 6-hydroxydopamine lesion: An anatomical, biochemical and pharmacological study. *Pharmacol Biochem Behav* 34: 367-374.

Tretiakoff C (1919) Contributions a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de soemmering avec quelques Deductions relatives a la Pathogenie des Troubles de Tonus musculaire et de la Maladie de Parkinson. Paris Thesis.

Ungerstedt U (1968) 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5: 107-110.

Ungerstedt U (1971) Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol Scand* 367: 95-122.

Ungerstedt U (1973) Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol Scand* 367: 49-68.

Uryu K, Butler AK, Chesselet MF (1999) Synaptogenesis and ultrastructural localization of the polysialylated neural cell adhesion molecule in the developing striatum. *J Comp Neurol* 405: 216-232.

Vitek JL (2002) Deep brain stimulation for Parkinson's disease. A critical re-evaluation of STN versus GPi DBS. *Stereotact Funct Neurosurg* 78: 119-131.

Wang ZH, Ji Y, Shan W, Zeng B, Raksadawan N, Pastores GM, Wisniewski T, Kolodny EH (2002) Therapeutic effects of astrocytes expressing both tyrosine hydroxylase and brain-derived neurotrophic factor on a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 113: 629-640.

Weihmuller FB, Bruno JP (1989) Age-dependent plasticity in the dopaminergic control of sensorimotor development. *Behav Brain Res* 35: 95-109.

Weinelt S, Peters S, Bauer P, Mix E, Haas SJP, Dittmann A, Wree A, Cattaneo E, Knoblich R, Strauss U, Rolfs A (2003) Ciliary neurotrophic factor overexpression in neural progenitor cells (ST14A) increases proliferation, metabolic activity and resistance to stress during differentiation. *J Neurosci Res* 71: 228-236.

Whishaw IQ, Funk DR, Haeryluk SJ, Karbaszewski ED (1987) Absence of sparing of spatial navigation, skilled forelimb and tongue use and limb posture in the rat after neonatal dopamine depletion. *Physiol Behav* 40: 247-253.

Whittemore SR (1997) Immortalizing central nervous system cells. In: Crawley JN, Gerfen CR, McKay R, Rogawski MA, Sibley DR, Skolnick P (Eds.), *Current protocols in neuroscience*. Wiley, New York.

Whittemore SR, Onifer SM (2000) Immortalized neural cell lines for CNS transplantation. *Prog Brain Res* 127: 49-65.

Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blümcke I (1996) NeuN: A useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem* 44: 1167-1171.

Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Cunha CD, Deonizio JMD, Netto CA, Achaval M (2005) A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Protoc* 16: 58-64.

Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Wenji Y, Kameda M, Matsui T, Miyoshi Y, Date I (2005) Early transplantation of an encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-producing cell demonstrating strong neuroprotective effects in a rat model of Parkinson disease. *J Neurosurg* 102: 80-89.

Yoritaka A, Hattori N, Uchida K, Tanaka M, Stadtman ER, Mizuno Y (1996) Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2696-2701.

Yoshimoto Y, Lin Q, Collier TJ, Frim DM, Breakefield XO, Bohn MC (1995) Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 691: 25-36.

Zheng JS, Tang LL, Zheng SS, Zhan RY, Zhou YQ, Goudreau J, Kaufman D, Chen AF (2005) Delayed gene therapy of glial cell line-derived neurotrophic factor is efficacious in a rat model of Parkinson's disease. *Mol Brain Res* 134: 155-161.

Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE (1993) Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *Proc Natl Acad Sci* 90: 4533-4537.

6 Anhang

Zusammensetzung wichtiger Substanzen

PBS – Phosphate buffered saline (Zusammensetzung für einen Liter)

- NaCl 8,00 g
 - KCl 0,20 g
 - Na₂HPO₄ 1,42 g
 - KH₂PO₄ 0,27 g
 - Aqua dest. 800 ml
- mit HCl auf den pH-Wert 7,4 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

4% Paraformaldehyd (PFA)

- 40 g Paraformaldehyd (Merck, Deutschland, Best.-Nr. 1.04005.1000) in 1 L PBS (0,1 M pH 7,4) geben
- Gemisch auf 65° C erhitzen (zur Lösung des Paraformaldehyd)
- nach dem Abkühlen kann die Lösung verwendet werden

Saccharoselösung (20%)

- 40 g Haushaltszucker gelöst in 200 ml PBS

Abblocklösung

- a) PBS
- b) Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma; Deutschland)
- c) Bovine-Serum-Albumin (BSA 3%, Sigma-Aldrich; Deutschland)
- d) Normalserum der Maus 1:70 (Mouse-Kit, Vectastain, PK-6102; Burlingame).

Diaminobenzidin (DAB)-Lösung

- a) 200 ml PBS
- b) 20 mg DAB
- c) 2 µl H₂O₂

Beschreibung wichtiger Färbungen und Arbeitsschritte

Beschichtung von Objektträgern zum Aufziehen flottierender Schnitte:

1. 0,5 g Gelatine unter Erwärmung (60° C) in 500 ml Aqua dest. lösen, anschließend 0,25 g Chromalaun (Kalium-Chrom-III-Sulfat) zugeben und lösen.
2. in der Zwischenzeit die Objektträger in die Ständer packen, kurz in Leitungswasser tauchen und anschließend in Aqua dest. ausschwenken (Staub und Schmutz entfernen).
3. anschließend die Objektträger für einige Sekunden in Azeton oder 70% EtOH entfetten und wiederum zweimal mit Aqua dest. spülen.
4. die vollständig gelöste Gelatinelösung auf 50° C abkühlen lassen und die Objektträger für einige Sekunden darin schwenken um eine vollständige Beschichtung zu erreichen.
5. Die Objektträger bei 50° C in den Ofen packen und nach dem trocknen staubgeschützt lagern.

Nissl - Färbung (Kresylviolett)

- Präparate nach aufziehen auf Objektträger für 15 min auf einer Heizplatte (37° C) trocknen
- 45 min in 4%igem PFA (pH 7,0) bei Raumtemperatur fixieren
- 3 x 2 min in Aqua dest. waschen
- 30 min in Kresylviolett bei 60° C färben (alle 10 min umrühren)
- 2 min in Aqua dest. waschen
- aufsteigende Alkoholreihe (Propanol):
 - 2 x 2 min in 70%
 - 2 min in 80%
 - 2 x 2 min in 90%
 - 2 x 2 in 96%, im ersten Gang die Objekte differenzieren und im zweiten Gefäß sammeln
 - 2x 3 min in 100%
 - 3 x 5 min in Xylol
- Eindecken mit De-Pe-X

Markscheidenfärbung

- 1) Kryostatschnitte dreimal mit Aqua dest. spülen und trocknen lassen
- 2) Pyridin 30 min
- 3) Aqua dest. 3 x 5 min
- 4) Ammoniumsilbernitrat 30 min
- 5) 1%ige CH₃COOH 3 x 3 min
- 6) Entwicklung 20 min (mindestens)
- 7) 0,5%ige CH₃COOH 2 x 5 min
- 8) fließend wässern 10 min
- 9) Polymax 10 min (Kodak, Best.-Nr.: 5211388)
- 10) fließend wässern 10 min
- 11) in Aqua dest. spülen kurz
- 12) aufsteigende Alkoholreihe
- 13) Eindecken

Versilberung (Staining of cell bodies)

1. Herstellung von Kryostatschnitten

2. Prinzip

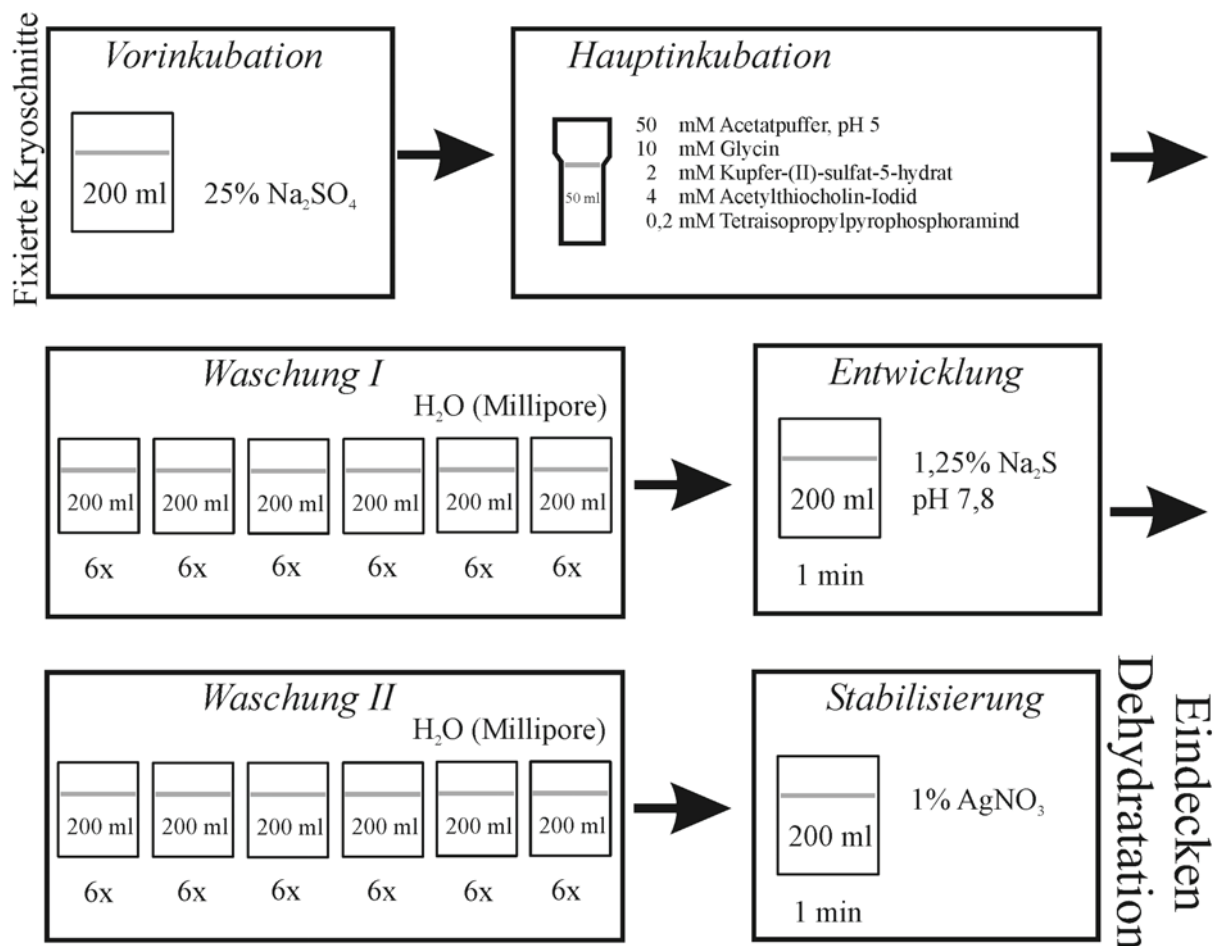
Durch die konzentrierte Ameisensäure (CH₂O₂) und H₂O₂ entstehen Radikale, die versilbert werden. Die versilberten Strukturen entsprechen den Nissl-Schollen, d. h. dem rauen endoplasmatischen Reticulum.

3. Färbung

- Fixierung: 15 min mit 3,7%igem PFA, phosphatgepuffert und kontinuierlich bewegt
- Spülen: 3 x 2 min in Aqua bidestilata
- Vorinkubation: 4%ige Ameisensäure für 3 h
- Inkubation in folgendem Gemisch bei 4° C über Nacht:
 - 20 ml konz. Ameisensäure
 - 60 ml H₂O₂
 - 120 ml Aqua bidest.
- Wässern: mit fließendem Wasser für 15 min
- Spülen: 0,5%ige Essigsäure (C₂H₄O₂) für je 5 min

- Entwicklung: physikalischer Entwickler
Lösung A: 100 ml
Lösung B: 30 ml
Lösung C: 70 ml
(Körbchen öfter bewegen und Küvette = zoppen)
- erst Lösung B und C - filtrieren und für 5 min rühren, dann Lösung A dazugeben
- unter mikroskopischer Kontrolle solange inkubieren, bis gewünschte Intensität erreicht ist (~ 30 min, bei fortwährender Bewegung)
- Spülen: 0,5%ige Essigsäure III für 5 min
- Wässern: für 5 min bei fließend lauwarmen Wasser
- Fixieren: Unifix für 10 min (etwas bewegen)
- Wässern: für 5 min bei fließend lauwarmen Wasser

Acetylcholinesterase (AChE) – Färbung (Übersichtssizze)



7 Tabellen

Tab. 1: Datenübersicht der behandelten Tiere.

Nr.	Geburt	Behandlung	Datum	Bregma	Zielkoordinaten
1	23.09.03	Kontrolltier			
2	23.09.03	Kontrolltier			
3	23.09.03	Kontrolltier			
4	23.09.03	Kontrolltier			
5	23.09.03	Kontrolltier			
6	23.09.03	Kontrolltier			
7	23.09.03	Kontrolltier			
8	23.09.03	Kontrolltier			
9	23.09.03	Kontrolltier			
10	23.09.03	Kontrolltier			
11	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,18 L 6,59 V 7,52	A 7,12 L 6,67+6,51 V 7,31
12	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,01 L 6,6 V 7,52	A 6,95 L 6,68+6,52 V 7,31
13	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,04 L 6,57 V 7,55	A 6,98 L 6,65+6,49 V 7,34
14	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,045 L 6,48 V 7,64	A 6,99 L 6,56+6,40 V 7,43
15	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,19 L 6,58 V 7,56	A 7,13 L 6,66+6,50 V 7,35
16	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,28 L 6,55 V 7,74	A 7,13 L 6,63+6,47 V 7,35
17	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,08 L 6,62 V 7,55	A 6,86 L 6,71+6,55 V 7,24
18	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,05 L 6,65 V 7,53	A 7,02 L 6,70+6,54 V 7,34
19	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,09 L 6,59 V 7,60	A 6,99 L 6,73+6,57 V 7,32
20	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 6,95 L 6,59 V 7,37	A 7,03 L 6,67+6,51 V 7,39
21	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 6,94 L 6,69 V 7,48	A 6,89 L 6,67+6,51 V 7,16
22	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,00 L 6,60 V 7,42	A 6,88 L 6,71+6,55 V 7,27
23	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,09 L 6,60 V 7,21	A 6,94 L 6,68+6,52 V 7,21
24	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,06 L 6,59 V 7,18	A 7,03 L 6,68+6,52 V 7,21
25	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,26 L 6,55 V 7,47	A 7,00 L 6,67+6,51 V 7,27
26	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,04 L 6,56 V 7,45	A 7,22 L 6,63+6,47 V 7,26
27	23.09.03	6-OHDA, bilateral	24.09.03	A 7,01 L 6,55 V 7,41	A 6,98 L 6,64+6,48 V 7,24
28	23.09.03	6-OHDA, CSM, re Stri	26.09.03	A 7,09 L 6,60 V 6,57	A 7,16 L 6,42 V 6,28
29	23.09.03	6-OHDA, CSM, re Stri	26.09.03	A 7,15 L 6,57 V 6,50	A 7,22 L 6,39 V 6,21
30	23.09.03	6-OHDA, CSM, re Stri	26.09.03	A 7,32 L 6,62 V 6,64	A 7,39 L 6,44 V 6,35
31	23.09.03	6-OHDA, CSM, re Stri	26.09.03	A 7,15 L 6,55 V 6,57	A 7,22 L 6,37 V 6,28
32	23.09.03	6-OHDA, CSM, re Stri	26.09.03	A 7,04 L 6,55 V 6,62	A 7,11 L 6,37 V 6,33
33	23.09.03	6-OHDA, CSM, re Stri	26.09.03	A 7,16 L 6,68 V 6,59	A 7,23 L 6,50 V 6,30

Tab. 2: Zylindertestresultate der Kontrolltiere.

Gruppe/Tier	Wandberührungen der rechten Pfote	Wandberührungen der linken Pfote
Intakt/1	13	17
Intakt/2	14	16
Intakt/3	13	17
Intakt/4	18	12
Intakt/5	15	15
Intakt/6	13	17
Intakt/7	17	13
Intakt/8	16	14
Intakt/9	16	14
Intakt/10	15	15
Mittelwert	15,0	15,0
Standardabweichung	1,76	1,76

Tab. 3: Zylindertestresultate der bilateral läsionierten Tiere.

Gruppe/Tier	Wandberührungen der rechten Pfote	Wandberührungen der linken Pfote
6-OHDA/1	13	17
6-OHDA/2	14	16
6-OHDA/3	12	18
6-OHDA/4	16	14
6-OHDA/5	15	15
6-OHDA/6	16	14
6-OHDA/7	19	11
6-OHDA/8	12	18
6-OHDA/9	16	14
6-OHDA/10	15	15
6-OHDA/11	18	12
6-OHDA/12	17	13
6-OHDA/13	12	18
6-OHDA/14	14	16
6-OHDA/15	15	15
6-OHDA/16	12	18
6-OHDA/17	15	15
Mittelwert	14,8	15,2
Standardabweichung	2,1	2,1

Tab. 4: Zylindertestresultate der transplantierten Tiere.

Gruppe/Tier	Wandberührungen der rechten Pfote	Wandberührungen der linken Pfote
6-OHDA/TrStr/1	15	15
6-OHDA/TrStr/2	13	17
6-OHDA/TrStr/3	10	20
6-OHDA/TrStr/4	14	16
6-OHDA/TrStr/5	13	17
6-OHDA/TrStr/6	12	18
6-OHDA/TrStr/7		
Mittelwert	12,8	17,2
Standardabweichung	1,72	1,72

8 Thesen

- 1.) Das idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS) ist eine neurodegenerative Erkrankung, deren Inzidenz im Zuge der demografischen Entwicklung weiter zunehmen wird.
- 2.) Beim IPS degenerieren aus bislang ungeklärter Ursache dopaminerge Neurone der Substantia nigra.
- 3.) Auf Grund der unerwünschten Arzneimittelwirkungen als Spätfolge der medikamentösen Therapie und dem zunehmenden Leidensdruck der Patienten, besteht ein Bedarf an neuen Therapiemethoden.
- 4.) Da bekannt ist, dass beim IPS eine bestimmte Neuronenart an einer klar definierten Lokalisation im Gehirn zu Grunde geht, ist es prinzipiell möglich diese Neurone zu ersetzen und somit den Betroffenen eine kausale Therapie als Alternative zu den bisherigen symptomatischen Therapieformen anzubieten.
- 5.) Das 6-OHDA-Modell ist ein anerkanntes und gut beschriebenes Läsionsmodell, welches die Situation beim Menschen akzeptabel widerspiegelt.
- 6.) Neonatal bilateral-läsionierte Tiere zeigen, im Gegensatz zu adult-läsionierten, kaum motorische Ausfallserscheinungen.
- 7.) Transplantierte CSM14.1-Progenitorzellen differenzieren sich im neonatalen - jedoch nicht im adulten - Rattenhirn in dopaminerge Neurone und sind zur DA-Produktion und DA-Freisetzung fähig.
- 8.) Transplantierte CSM14.1-Progenitorzellen zeigen im neonatalen Rattenhirn keine gliale Differenzierung.
- 9.) Die neonatal, bilateral läsionierten und anschließend unilateral transplantierten Tiere zeigen deutliche motorische Verhaltensbesserungen, gegenüber den nur-läsionierten Tieren.

9 Erklärung

Die vorgelegte Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe - außer der Personen, denen im Kapitel 11 gedankt wurde - verfasst und ich andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die wörtlich oder inhaltlich verwendeten Stellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich noch kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Rostock, den 1. März 2007

.....
Stephan Beckmann

10 Lebenslauf

Name: Stephan Beckmann
Kontakt: Beckmann79@gmx.net

Bildungsweg: - August 1986 – Juni 1999 Kooperationschule Friesack
- vom 15.01.1996 – 17.12.1996 Studienjahr Australien
- am 26.06.1999 – Abschluss des Abiturs (1,7)
- vom 01.07.1999 – 31.07.2000 Zivildienst (Sozialstation Friesack)
- vom 01.01.2001 – 31.08.2001 Praktikum in der Havellandklinik Nauen
- seit dem 01.10.2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock

Famulaturen: - vom 02.02.2004 – 29.02.2004 Anästhesie und allgemeine Intensivmedizin
am Allgemeinen Krankenhaus (AKH) Wien
- vom 30.08.2004 – 24.09.2004 Innere Medizin in der Havellandklinik Nauen
- vom 07.02.2005 – 08.03.2005 Neurologie an der Universität Rostock
- vom 11.07.2005 – 07.08.2005 Allgemeinmedizin (Praxis) in Rostock
- vom 03.03.2006 – 17.03.2006 Unfallchirurgische Ambulanz der Universität
Rostock

PJ: - vom 14.08.2006 – 03.12.2006 Chirurgie am Kantonsspital Liestal (Schweiz)
- vom 04.12.2006 – 25.03.2007 Urologie an der Universität Rostock
- vom 26.03.2007 – 15.07.2007 Innere Medizin an der Universität Rostock

Publikationen:

1. Haas SJP, Beckmann S, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) Intracerebrally transplanted CSM14.1-cells lead to preferential forelimb use in Parkinsonian neonatal rats. FENS Forum Abstracts 2: A019.22.
2. Haas SJP, Beckmann S, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) CSM14.1-cells transplanted into the striatum of Parkinsonian neonatal rats lead to a preferential forelimb use. Second International Meeting of the Stem Cell Network North Rhine Westphalia, 1.4.-2.4.2004.
3. Haas SJP, Beckmann S, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) CSM14.1-cells transplanted into the striatum of Parkinsonian neonatal rats lead to a preferential forelimb use. 97. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft vom 31.5. bis 4.6.2004 in Rostock, 96.
4. Haas SJP, Beckmann S, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) Immortalized CSM14.1-cells differentiate after transplantation into the striatum of Parkinsonian neonatal rats in dopaminergic neurons. The human brain: Modelling and remodelling. 2nd international Conference Santa Lucia, Rome, Italy, Oct., 6th-9th, 2004, 97.
5. Haas SJP, Beckmann S, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) Transplantation of immortalized CSM14.1-cells into the striatum of Parkinsonian neonatal rats leads to a striatal dopaminergic reinnervation and a preferential forelimb use. Proceedings of the FEBS Advanced course of new molecular strategies to treat neurodegenerative diseases, 17.7.-23.7.2004, Ofir, Portugal, 47.
6. Haas SJP, Beckmann S, Schmitt O, Petrov S, Wree A (2005) Transplantation of CSM14.1-cells in the neonatal dopaminergic deafferented striatum leads to a therapeutic improvement and dopaminergic reinnervation. Anat Ges 99 (Ann Anat Suppl 186): 41.
7. Beckmann S, Haas SJP, Wree A, Schmitt O (2006) Transplantation of CSM14.1-cells into a neonatal 6-OHDA-lesion model exhibit significant behavioral recovery. Mov Disord 21, Suppl 13: S 75.
8. Haas SJ, Beckmann S, Petrov S, Andressen C, Wree A, Schmitt O (2007) Transplantation of immortalized mesencephalic progenitors (CSM14.1-cells) into the neonatal Parkinsonian rat caudate putamen. J Neurosci Res. 85: 778-786.

11 Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Schmitt für die kontinuierliche, sehr engagierte Betreuung der Arbeit, die Densitometrie und deren statistische Auswertung sowie für das unermüdliche Korrigieren des schriftlichen Teils bedanken.

Für die Einführung in die Labortechniken und die Vorbereitungen der CSM14.1-Zellen sowie deren Transplantation möchte ich Herrn Dipl.-Biologen Haas danken. Ohne seine Zuarbeit beim Läsionieren, Transplantieren und dem Auswerten der Zylindertests wäre diese Arbeit nicht in diesem Umfang möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. med. Wree danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Für die Anfertigung der Nissl-, Markscheiden- AChE-Färbungen und die tägliche Unterstützung im Labor gilt auch Frau Kuhnke, Frau Waldmann und Frau Winzer mein Dank. Ihre Hilfe hat mir den Laboralltag erheblich vereinfacht.

Für die Betreuung während der Konfokal-Mikroskopie, sowie manchem wertvollen Hinweis, sei auch Herrn PD Dr. rer. nat. Andressen ganz herzlich gedankt.

Nicht zuletzt danke ich Prof. Dr. rer. nat. Jonas (Institut für Medizinische Biologie) und seinen Mitarbeitern für die Hilfe beim „Freeze & Thaw“-Verfahren.