

Aus der Abteilung Klinische Neurophysiologie  
(Prof. Dr. med. W. Paulus)  
Im Zentrum Neurologische Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Über die Tumorigenität und den potenziellen Nutzen ausgewählter  
Stammzellersatztherapien in dem 6- Hydroxydopamin- Parkinsonmodell der  
Ratte**

INAUGURAL- DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg- August- Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Charles- Arnold Timäus  
aus  
Helmstedt

Göttingen 2012

**Dekan:** **Prof. Dr. med. Frömmel**

**I. Berichterstatter:** **Prof. Dr. med. Paulus**

**II. Berichterstatter:** **Prof. Dr. med. Dressel**

**III. Berichterstatter:** **Prof. Dr. med. Oppermann**

**Tag der mündlichen Prüfung:** **12.06.2012**

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.	Einleitung 1
1.1.	Klinik des Morbus Parkinson 1
1.2.	Pathophysiologie und Pathogenese des Morbus Parkinson 2
1.2.1.	Pathophysiologie 2
1.2.2.	Pathogenese und zelluläre Mechanismen 8
1.3.	Therapien des Morbus Parkinson 11
1.3.1.	Etablierte symptomorientierte Therapieverfahren 11
1.3.2.	Zellersatzstrategien als alternative Therapieverfahren 12
1.3.3.	Dopaminerges Gewebe vom fetalen ventralen Mesencephalon 12
1.3.4.	Embryonale Stammzellen 13
1.3.5.	Neurale multipotente Vorläuferzellen 14
1.3.6.	Adulte neurale Stammzellen 15
1.3.7.	Knochenmarkstammzellen 16
1.4.	Vom Mensch zum Tier: Tiermodelle des Parkinsonsyndroms 16
1.4.1.	Neurotoxische Tiermodelle 17
1.4.2.	6- Hydroxydopamin (6- OHDA) 17
1.4.3.	Paraquat, Rotenon und MPTP (MPPP) 18
1.4.4.	Genetische Tiermodelle 19
1.5.	Einführung in die Verhaltenstests 20
1.5.1.	Rotametrie 20
1.5.2.	Verhaltensversuche im Rotarod 22
1.5.3.	Der Zylindertest 23
1.6.	Zielsetzung 23
2.	Material und Methoden 24
2.1.	Tiere und Haltung 24
2.2.	Vorbereitung und Durchführung der stereotaktischen Läsionierung und Transplantation von Spenderzellen 24
2.2.1.	Stereotaktische Läsionierung des nigrostriatalen Systems mit 6- Hydroxydopamin 24
2.2.2.	Charakterisierung und Vorbereitung der Spenderzellen 26

2.2.3.	Striatale Transplantation und Immunsuppression	27
2.3.	Methodische Durchführung der Verhaltensversuche	28
2.3.1.	Medikamenten- induzierter Rotationstest	28
2.3.2.	Nicht- Medikamenten-abhängiger Verhaltensversuch im Rotarod	29
2.3.3.	Zylindertest	30
2.4.	Transkardiale Perfusion	31
2.5.	Histochemische und immunhistologische Verfahren	31
2.5.1.	Tyrosinhydroxylase	32
2.5.2.	Lu- 5 (Anti- Zytokeratin)	32
2.5.3.	Oct 3 / 4	32
2.5.4.	Ki 67	33
2.6.	Methodik der histologischen Untersuchungen	33
2.7.	Statistische Methoden	34
2.7.1.	Zylindertest	34
2.7.2.	Rotametrie	35
2.7.3.	Verhaltenstest im Rotarod	35
3.	Tierzahlen und Einschlusskriterien	35
4.	Resultate	36
4.1.	Ergebnisse der histologischen Untersuchungen	36
4.2.	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen: Anti- Oct- 3/4, Ki-67, Tec-3 und Anti- Zytokeratin (Lu5)	46
4.3.	Ergebnisse der Verhaltensversuche	49
4.3.1.	Analyse der Rotametrie der Kontrollgruppe und Synopsis	49
4.3.2.	Analyse der tumorfreien Tiergruppe	50
4.3.3.	Analyse der tumortragenden Tiergruppe	53
4.3.4.	Vergleichende Analyse der tumorfreien und tumortragenden Tiergruppen	54
5.	Diskussion	55
5.1.	Rolle der Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen bei der Frage der Tumorigenität	55

5.2.	Der funktionelle Effekt der dopaminergen Transplantate steht unter Einfluss der Tumorigenität	58
5.3.	Verhalten der tumorfreien Tiergruppe ist abhängig vom Nachweis dopaminерger Zellen	59
5.4.	Tumortragende Tiere profitieren funktionell vom Nachweis dopaminерger Zellen	60
5.5.	Schlussfolgerung und Ausblick	61
6.	Zusammenfassung	62
7.	Literaturverzeichnis	63
8.	Anhang	81
8.1.	Protokolle zu den histochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen	81
8.2.	Primärantikörper	83
8.3.	Abkürzungsverzeichnis	84

# Über die Tumorigenität und den potenziellen Nutzen ausgewählter Stammzellersatztherapien in dem 6- Hydroxydopamin- Parkinsonmodell der Ratte

## 1. Einleitung

### 1.1. Klinik des Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson, auch genannt idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS), ist gekennzeichnet durch das Auftreten von typischen klinischen Symptomen, die aus der kardinalen Trias Tremor, Akinese und Rigor bestehen (Pal et al. 2002).

Ein asymmetrischer, arm- und distal betonter **Ruhetremor** tritt mit einer Frequenz von 4 bis 5 Hertz (Hallett 2003) auf, der aber in bis zu 25 % der Fälle fehlen kann. In 69% der Fälle ist der Ruhetremor schon bei Manifestation sichtbar (Hughes et al. 1993). In 50- 70 % der Fälle ist der Tremor das Initialsymptom (Pal et al. 2002). Zum Ruhetremor gesellt sich gelegentlich ein Haltetremor (Hallett 2003). Der Ruhetremor sistiert gewöhnlich im tiefen Schlaf, um dann in oberflächlicheren Schlafstadien und beim Aufwachen wieder aufzutreten (Comella 2003). Die Pathophysiologie des Tremors ist bis heute noch nicht endgültig geklärt. Tiermodelle mit läsioniertem nigrostriatalem System bieten keine Tremorzeichen (Péchadre et al. 1976) und eine L- Dopa- Therapie zeigt nur geringe Wirkung auf die Symptome. Man nimmt unter anderem eine Beteiligung des thalamischen Systems bei der Pathogenese des Tremors an. (Jankovic 2003; Findley und Gresty 1984; Mc Auley 2003).

Der **Rigor** ist durch einen anhaltenden beschleunigungsunabhängigen Muskelhypertonus der Agonisten und Antagonisten gekennzeichnet, der bei passiver Bewegung des betroffenen Gliedes deutlich wird (Pal et al. 2002). Er beginnt meist proximal und führt an der oberen Extremität nicht selten zunächst zu Schulterschmerzen, die häufig zu einer rheumatischen Fehldiagnose führen (Ceballos- Baumann 2006).

Die **Bradykinese** ist das Symptom, welches die Patienten am meisten einschränkt. Es ist außerdem das Symptom, welches eine signifikante Korrelation zum nigrostriatalen Untergang zeigt und passend dazu auch empfindlich auf eine L-Dopa- Therapie anspricht (Pal et al. 2002).

Die Bradykinese bedingt außerdem viele zweitrangige Symptome, wie Mikrographie, Sprachstörungen (Mueller 1971) und eine reduzierte Mimik („Maskengesicht“).

Offiziell wird neuerdings die posturale Instabilität zu den Kardinalsymptomen einer Parkinsonerkrankung gezählt (Jankovic 2008). Die posturale Instabilität tritt allerdings erst im fortgeschrittenen Verlauf auf und ist gegenüber L- Dopa weniger empfindlich als z.B. die Bradykinesie. Dies gab Anlass zur Annahme eines abweichenden pathophysiologischen Mechanismus für die posturale Instabilität, der außerhalb des nigrostriatalen Systems liegen muss. Die genaue Lokalisation ist bis heute nicht bekannt. Es wurde außerdem vorgeschlagen, die typische Haltung und Gangart der Betroffenen als Kardinalsymptome aufzunehmen (Giladi 2001).

## **1.2. Pathophysiologie und Pathogenese des Morbus Parkinson**

### **1.2.1. Pathophysiologie**

Das Parkinsonsyndrom beschreibt einen Symptomkomplex, der gemeinsam mit den hyperkinetischen Störungen zu den Bewegungsstörungen (engl. Movement disorders) gezählt wird. Das anatomische Korrelat der Bewegungsstörungen wurde in beiden Fällen in einem subkortikalen heterogenen System gefunden, welches eine Feedbackschleife mit den kortikalen Regionen bildet. Die entscheidenden Nervenzellen sind in Form der Basalganglien und der Substantia nigra organisiert (Albin et al. 1989).

Bei den Parkinsonsyndromen steht der kortiko- striato- pallido- thalamo- kortikale Kreislauf im Mittelpunkt des Pathomechanismus. Dieses System wird entscheidend durch nigrostriatale Projektionen moduliert. Diese Projektionen nehmen in Folge der Degeneration der dopaminergen Neurone im Krankheitsverlauf kontinuierlich ab. Informationen, die die Basalganglien erreichen, werden überwiegend parallel verarbeitet, obwohl es auch Hinweise auf kollaterale Verbindungen gibt. Zum Beispiel zeigen die Axone zahlreiche Verbindungen mit Neuronen, die auf dem Weg des Axons liegen. Der parallele Informationsfluss wird als Segregation bezeichnet (Alexander und Crutcher 1990). Nach neuen Erkenntnissen erscheint die Organisation der Basalganglien weniger segregiert als bis vor kurzem noch angenommen und ist eher mit einem komplexen Netzwerk zu vergleichen (Parent 2000).

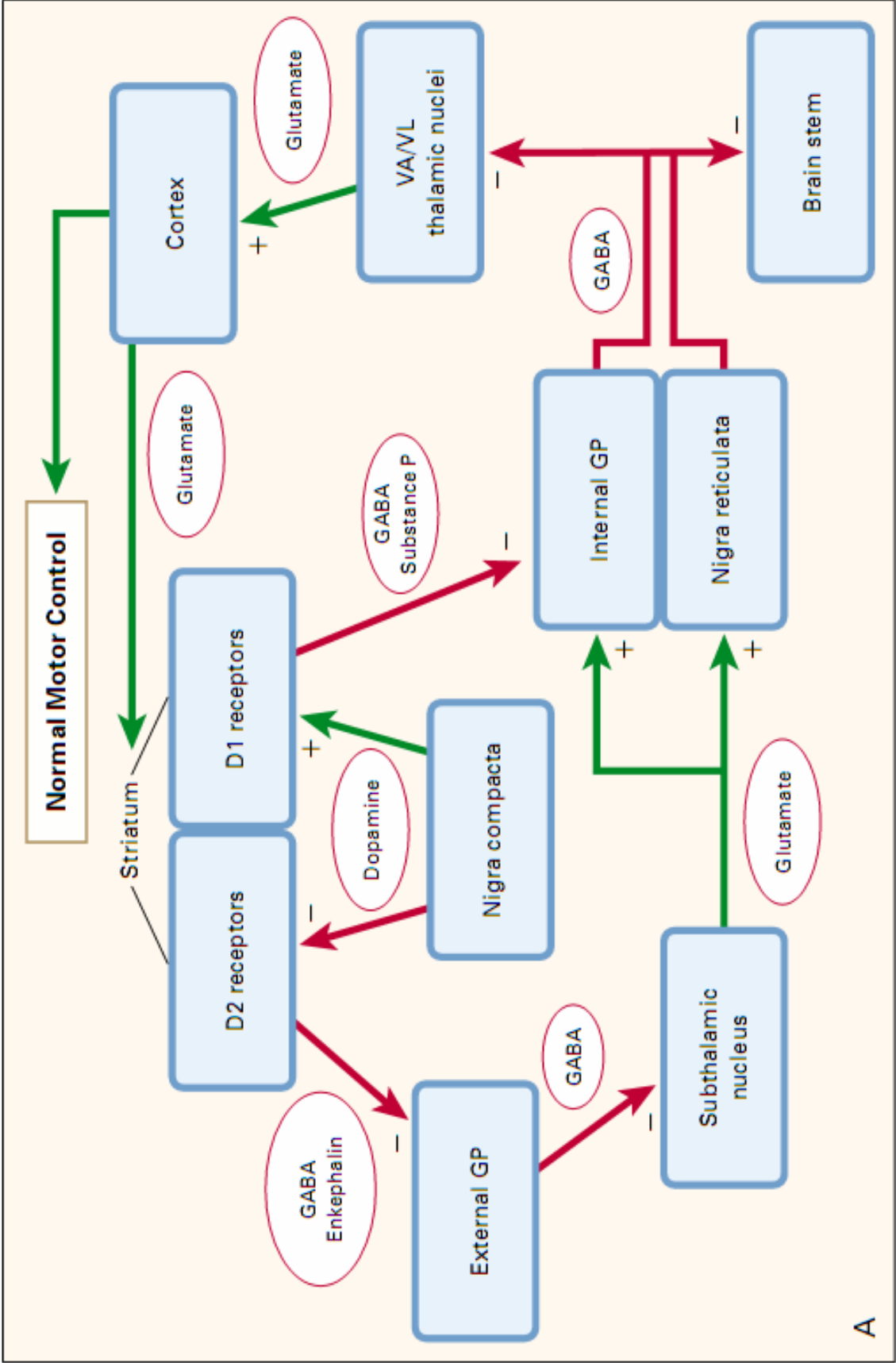
Einen Überblick über den normalen Fluss motorischer Informationen zeigt die Abbildung 1. Die Abbildung 2 dagegen zeigt schematisch die gestörte Verarbeitung von motorischen Impulsen beim Morbus Parkinson.

Impulse vom motorischen Kortex werden zunächst vom Striatum aufgenommen. Dieses lässt sich dank Untersuchungen an Primaten und Nagetieren in zwei Kompartimente unterteilen. Die vom Kortex eingegangenen Informationen laufen getrennt über einen direkten oder einen zweiten indirekten Weg (Alexander et al. 1990; DeLong 1990). Informationen die das Striatum verlassen, sammeln sich in dem ventrolateral/- anterioren Thalamus. Von hier erreichen die verarbeiteten Informationen die übergeordneten motorischen Gehirnregionen, wozu unter anderem der supplementäre motorische Assoziationskortex zählt (Albin et al. 1989).

Das Striatum setzt sich aus cholinergen Interneuronen und GABAergen Projektionsneuronen zusammen. Die Neurone mit Substanz P und GABA innervieren die Pars compacta und reticulata der Substantia nigra, sowie den medialen Globus pallidus. Die letzten beiden Zentren versorgen schließlich den Thalamus direkt mit inhibierend wirkendem GABA. Neurone mit Enkephalin und GABA nehmen einen Umweg über den lateralen Globus pallidus und den subthalamischen Kern. Der Nucleus subthalamicus wirkt exzitatorisch auf den medialen Globus pallidus und die Pars reticulata der Substantia nigra. Folglich führt der direkte Weg zur Enthemmung



und der indirekte Weg zur Hemmung des Thalamus, wenn ein exzitatorischer Impuls von dem Kortex ausgeht. Das Dopamin der nigrostriatalen Bahnen nimmt hierbei sowohl inhibitorischen als auch exzitatorischen Einfluss auf das Striatum. Über die dominierenden D1- Rezeptoren des Striatums erfolgt ein exzitatorischer Impuls des direkten Weges, hingegen wirken D2- Rezeptoren bei Stimulation disinhibitorisch auf die thalamische Transmission (Lang und Lozano 1998b). Zusammenfassend nimmt durch Mangel an Dopamin die Nettoaktivität des Thalamus ab. In Folge kommt es zur verminderten Stimulation des Motor- Kortex, worin die Ursache der klinischen Symptome bei der parkinsonschen Erkrankung gesehen wird. Einschränkend sollte aber an dieser Stelle erwähnt werden, dass dieses allgemein gültige Modell eine gute Erklärung für die akinetischen Phänomene bietet, aber bei der Aufklärung der Genese des Rigors und Tremors eher enttäuscht (Lang und Lozano 1998b; Wichmann und DeLong 1993).



A

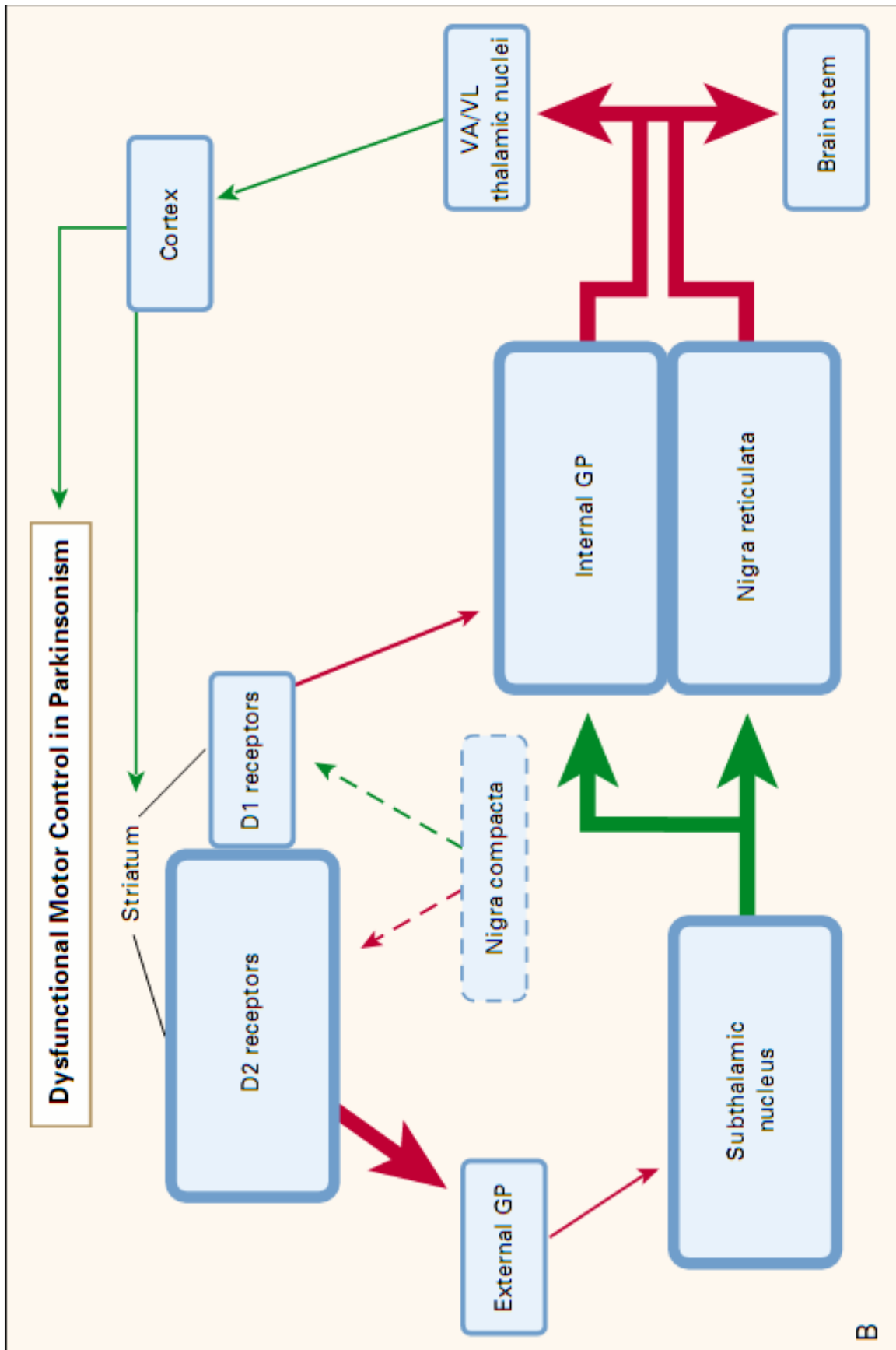


Abbildung 1 und 2: Lang und Lozano 1998b, S. 1133

Die Gültigkeit dieses Modells wird außerdem durch zahlreiche neurochirurgische Interventionen in Frage gestellt. Die Thalamotomie führt zur Milderung der Tremorsymptomatik, anstatt die Parkinsonsyndrome erwartungsgemäß zu verstärken (Jankovic et al. 1995). Paradoxerweise mildert die Pallidotomie des Globus pallidus internus außerdem die Levodopa-induzierte Dyskinesie, obwohl eher deren Zunahme erwartet wird (Lozano et al. 1995). Angesichts dieser paradoxen Beobachtungen wirft man dem Modell vor, zu stark an starren neuronalen Strukturen orientiert zu sein und die dynamischen Entladungsmuster zu vernachlässigen. Man nimmt an, dass neben der Nettoentladung die Feuermuster von größerer Bedeutung sind, was die erfreulich positiven Resultate in der Neurochirurgie bei Parkinsonerkrankten erklärt. Parkinsonerkrankte weisen dahingehend eine erhöhte abnormale Synchronität der aktiven Basalganglien auf (Wichmann und DeLong 1996), der durch neurochirurgische Eingriffe effektiv entgegengewirkt werden kann. Es werden ablativ und stimulative Methoden unterschieden. Da die ablativen Methoden sehr belastend sind, hat sich zunehmend die Tiefenhirnstimulation durchgesetzt. Zielgruppen der invasiven Parkinsontherapie sind Parkinsonpatienten im fortgeschrittenen Stadium und Patienten mit medikamentöser Refraktarität. Die Elektroden werden hier vornehmlich in den subthalamischen Kern oder in das interne Glied des Pallidums platziert. Die Stimulation dieser Regionen reduziert erstaunlich gut die klinischen Symptome und erhöht in vielen Fällen die Lebensqualität der Betroffenen (Pahwa et al. 1997; Krack et al. 1998; Limousin et al. 1998).

Es ist offensichtlich, dass das aktuell gültige pathophysiologische Modell nicht als endgültiges Modell anzusehen ist. So scheinen die dopaminergen Neurone der Substantia nigra nicht nur striatale Projektionen zu bilden, sondern zudem auch den Nucleus subthalamicus und das Pallidum zu innervieren (Parent et al. 2000). Es gibt darüber hinaus Hinweise auf die Existenz von dopaminergen Neuronen innerhalb des Striatums selbst, die in MPTP-induzierten Tiermodellen durch Zunahme ihrer Zahl eine Art Kompensationsmechanismus einleiten könnten (Smith und Kiehl 2000).

Solange die komplexen physiologischen und pathophysiologischen Grundlagen nicht hinreichend aufgeklärt werden, werden auch weiterhin die therapeutischen Möglichkeiten zur Linderung parkinsonspezifischer Bewegungsstörungen begrenzt bleiben.

### **1.2.2. Pathogenese und zelluläre Mechanismen**

Allen Parkinsonpatienten gemeinsam ist der selektive Untergang dopaminergener Neurone der Substantia nigra der Pars compacta (Fahn und Sulzer 2004).

Der Verlust von dopaminergen Neuronen ist im gewissen Rahmen mit zunehmendem Lebensalter physiologisch, übersteigt aber im krankhaften Zustand das physiologische Ausmaß und zeigt ein spezifisches Degenerationsmuster (Lang und Lozano 1998a). Der Zellverlust erstreckt sich aber auch über andere heterogene Systeme. Insbesondere die Neuromelanin-positiven dopaminergen Neurone der Substantia nigra Pars compacta, der olfaktorische Bulbus, die katecholaminergen und serotonergen Systeme des Hirnstamms, der Meynert-Kern, als auch ausgewählte kortikale Regionen sind betroffen (Lang und Lozano 1998a).

Klassisches neuropathologisches Korrelat der Erkrankung ist das Lewy-Körperchen. Es entspricht lichtmikroskopisch einem eosinophilen und hyalinen Einschlusskörperchen, das sowohl in Neuronen des Hirnstamms als auch des Kortex auftritt. Welche Stellung es in der Pathogenese des Parkinsons einnimmt, bleibt bis heute ungeklärt. Die Forschungen, die sich dieser Frage annehmen, sind in vollem Fluss und die bisher abgeleiteten Hypothesen können gar nicht gegensätzlicher sein. Einerseits wird eine toxische Wirkung des Lewy-Körperchens auf das Neuron postuliert, während andere Arbeitsgruppen in dem Lewy-Körperchen eine Art Verteidigungsmechanismus gegen die Degeneration sehen (Betarbet et al. 2005). Der Zeitabstand zwischen Auftreten der pathologischen Charakteristika der Erkrankung und der tatsächlichen klinischen Manifestation variiert je nach Studie zwischen einigen Jahrzehnten (Koller et al. 1991) und wenigen Jahren (Fearnley und Lees 1991; McGeer et al. 1988; Morrish et al. 1996).

Die Frage, aus welchem Grund die ca. 500.000 dopaminergen, nigrostriatalen Neurone des Mittelhirns untergehen, konnte noch nicht im Einzelnen geklärt werden. Aber es gibt eindeutige Hinweise darauf, dass unterschiedliche Angriffspunkte über eine gemeinsame Endstrecke zum neuronalen Zelltod führen. Im Mittelpunkt der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit stehen aktuell subzelluläre Mechanismen, die zu Schädigungen der Zelle, zum Verlust der Zellintegrität und schließlich zum Zelltod führen. Eine große Rolle spielen vermutlich oxidativer Stress, mitochondriale Funktionsstörungen, Exzitotoxine, fehlende neurotrophe Faktoren und immunologische Prozesse (Lang und Lozano 1998b).

Mitochondriale Störungen werden in der Grundlagenforschung als wichtige Ursache der neurodegenerativen Erkrankung angesehen. So führen Störungen der Elektronentransportkette zu Energieverlusten, die ATP- Mangel und Zelltod nach sich ziehen (Lang und Lozano 1998b). Es zeigte sich, dass die Aktivität des Komplex Eins der Elektronenkette in der Substantia nigra Pars compacta annähernd halbiert ist (Mann et al. 1992). Der Komplex Eins bildet in diesem Zusammenhang gleichzeitig auch den Angriffspunkt des Neurotoxins MPTP (Nicklas et al. 1985, Nicklas et al. 1987). Die pathogenetische Rolle der mitochondrialen Dysfunktionen innerhalb des Parkinsons und anderer neurodegenerativer Erkrankungen wird im Allgemeinen wissenschaftlich anerkannt (Dawson und Dawson 2003; Beal 2001). Man nimmt an, dass durch Energieverlust in Form von ATP- Mangel und Zunahme von radikalen Spezies der mitochondriale Apoptoseweg angestoßen wird. Aber der Zellverlust wird teilweise auch durch klassische Zellnekrosen getragen (Tatton und Kish 1997, Tatton et al. 2003; Jenner 1998).

Ein weiterer umstrittener Punkt ist der **oxidative Stress**, der besonders infolge der oben erwähnten mitochondrialen Störung auftritt, und auch als Reaktionsprodukt bei der Dopamin- Synthese die Neurone gefährdet. In der Parkinsonerkrankung wurden zum Beispiel eine Mehrzahl von reaktiven Sauerstoffspezies und erhöhten Eisenwerten festgestellt. Die Sauerstoffspezies sind für ihre aggressive Reaktivität bekannt und können dabei verschiedene Proteine, Lipide und Nukleinsäuren verändern. Interessanterweise gibt es verschiedene Theorien, die in der endogenen

Dopaminsynthese einen möglichen Beitrag zur Degeneration von dopaminergen Neuronen sehen (Jenner 1998). Daraus leitete man Befürchtungen einer beschleunigten Degeneration der nigralen Neurone durch die Therapie mit exogenem L-Dopa ab und plädierte für einen zurückhaltenden Einsatz von L-Dopa zu Gunsten einer direkten Behandlung mit Dopamin-Agonisten (Olanow 1997). Allerdings gibt es keine Hinweise für eine schädigende Wirkung einer L-Dopa-Therapie auf die verbleibenden nigralen Neurone (Rajput et al. 1997). Auch die chronische Administration von L-Dopa scheint nicht toxisch auf verbleibende Neurone der Substantia nigra Pars compacta im 6-Hydroxydopaminmodell der Ratte zu sein (Datla et al. 2001).

**Neurotrophische Faktoren** sind essentiell während der normalen Gehirnentwicklung. Hier sorgen sie für das Überleben der Neurone in einem sich entwickelnden Gehirn. Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Differenzierung von Zellen und nach Gehirnschädigungen. So wird angenommen, dass diese Faktoren auch bei neurodegenerativen Prozessen beteiligt sein können. Es ist bekannt, dass der *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) und der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) protektiv auf dopaminerge Zellen wirken (Beck et al. 1995; Gash et al. 1996). Ein Mangel von Wachstumsfaktoren soll auf diese Weise das Überleben der dopaminergen Neurone der Substantia nigra Pars compacta bedrohen und zum Zelltod führen (Gash et al. 1996).

**Immunologische Vorgänge** scheinen sekundär den neurodegenerativen Prozess der parkinsonschen Erkrankung zu verstärken. Dies wird durch Beobachtungen bestätigt, bei denen Mikroglia, Interleukin-1 und Tumor-Nekrose-Faktor Alpha in der Substantia nigra Pars compacta vermehrt vorgefunden wurden (McGeer und McGeer 1994).

## **1.3. Therapien des Morbus Parkinson**

### **1.3.1. Etablierte symptomorientierte Therapieverfahren**

Bis heute stehen ausschließlich symptomorientierte Behandlungsmethoden zur Verfügung.

Den Goldstandard in der Parkinsonbehandlung stellt immer noch die substituierende L- Dihydroxyphenylalanin (L- Dopa)- Therapie dar. Mit dieser Therapie sind allerdings Nebenwirkungen in Form von Wirkfluktuationen wie L- Dopa- induzierten Dyskinesien (peak- dose- Dyskinesien, biphasische Dyskinesien) und off-Phänomene (wearing-off- oder end- of- dose- Phänomene) verbunden, die nach langjähriger Anwendung im fortgeschrittenen Stadium auftreten. Mehr als 50 % der Patienten entwickeln innerhalb einer fünfjährigen L- Dopa- Therapie Dyskinesien, die eine Fortführung der Therapie häufig erschweren oder sogar, ohne Inkaufnahme von schweren Nebenwirkungen, unmöglich machen können (Obeso et al. 2000). Diese unwillkürliche Muskelaktivität wird auf den progredienten nigralen Zellverlust und den zunehmenden schwankenden Dopaminspiegel zurückgeführt. Als Konsequenz wird die L- Dopa- Therapie Patienten mit hohem Manifestationsalter empfohlen, während jüngere Patienten zunächst eine Therapie mit direkten Dopamin- Agonisten erhalten sollten, die bei nicht ausreichender Wirksamkeit um L- Dopa dann ergänzt wird (Olanow 1997, Olanow und Obeso 2000).

Bereits in der klinischen Anwendung verbreitet ist eine invasive Tiefenhirnstimulation, die mit Erfolg bei Patienten fortgeschrittener Stadien zum Einsatz kommt (Volkman 2004).



### **1.3.2. Zellersatzstrategien als alternative Therapieverfahren**

Die derzeitig angewendeten Behandlungen werden im Laufe der Erkrankung zunehmend durch Medikamenten- induzierte Nebenwirkungen stark behindert. Diese Medikamenten- abhängigen, aber auch nicht medikamentöse Komplikationen, die im Verlauf der Parkinsonschen Erkrankung auftreten, weckten das Interesse für alternative Behandlungsmethoden, die eine effektive und nachhaltige Wirkung versprechen.

Ein vielversprechender Ansatz ist die Zellersatztherapie. Bei diesem kausalen Lösungsansatz wurden bereits verschiedene Gewebe auf ihre Eignung als Transplantate geprüft.

### **1.3.3. Dopaminerges Gewebe vom fetalen ventralen Mesenzephalon**

Mit Erfolg konnte gezeigt werden, dass fetales Gewebe aus der ventralen Mesenzephalonregion nach Transplantation ins Gehirn sowohl im Tiermodell als auch bei Patienten überleben und eine Verbesserung der motorischen Symptome erreichen konnte (Brundin et al. 1988, Widner et al. 199,; Frodl et al. 1994, Lindvall et al. 1994, Nakao et al. 1994, Haque et al. 1997, Björklund A und Lindvall 2000). Obwohl die Ergebnisse sehr vielversprechend waren, bringt der Einsatz von humanem fetalem Gewebe Probleme mit sich. Insbesondere wird eine große Anzahl von fetalem Gewebe benötigt, um einen symptomverbessernden Effekt zu erzielen, da der Anteil an dopaminergen Neuronen in diesen Transplantaten 20 % kaum übersteigt (Björklund A und Lindvall 2000, Haque et al. 1997). Aber auch die mangelnde Möglichkeit der technischen Standardisierung und die ethischen Konflikte scheinen unüberwindbar (Björklund LM et al. 2002). Eine Lösung der zahlreichen Probleme sieht man daher in der Verwendung von alternativen Spenderzellen.

### 1.3.4. Embryonale Stammzellen

Mit embryonalen Stammzellen schienen die o.g. Probleme zunächst gut angebar. Dank Ihren zahlreichen Eigenschaften wurden sie als geeignete Kandidaten in der Zellersatztherapie betrachtet. Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen werden und theoretisch unendlich teilungsfähig sind (Deacon et al. 1998, Gage 2000), wodurch das Problem der mangelnden Verfügbarkeit gelöst werden könnte. Die Eigenschaften der embryonalen Stammzellen und ihr therapeutischer Einsatz werden intensiv beforscht. Die wenigen erfolgreichen Tierstudien vergangener Zeit erlauben noch keine Einführung der Stammzelltherapie in klinische Phasen (Kim JH et al. 2002). Besondere Bedenken hat man zurzeit bezüglich der Bildung von Teratomen, die nach Transplantation von nicht differenzierten Stammzellen in Tiermodellen beobachtet wurden (Björklund LM et al. 2002). Die momentane Anstrengung der Stammzellforschung zielt auf die Generierung von differenzierten Zellen aus ausgewählten Stammzellpopulationen, die möglichst frei von undifferenzierten Zellen sind, um so der Gefahr der Teratombildung zu begegnen.

Die Generierung von transplantablen dopaminergen Neuronen in hoher Zelldichte wurde von mehreren Arbeitsgruppen in den letzten 10 Jahren gezeigt. Hierbei unterscheidet man verschiedene Methoden. Man weiß, dass mit Hilfe einer aus Stromazellen bestehenden Begleitkultur murine embryonale Stammzellen dopaminerge Neurone bilden können, die positiv auf Tyrosinhydroxylase sind (Kawasaki et al. 2000). Tyrosinhydroxylase ist hierbei das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in dem Synthesevorgang des Neurotransmitters Dopamin und ein Indikatorenzym der katecholaminergen Neurone (Nagatsu et al. 2000). Dopaminerges Gewebe, welches auf diese Weise gewonnen wurde, erlaubte Verbesserungen von Verhaltensstörungen in einem immunkompetenten Parkinsonmodell der Ratte ohne den Nachweis von Tumorformationen. Es zeigten sich histologische Hinweise auf immunologische Abstoßungsprozesse. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang eine Integration der Zellverbände (Axonwachstum und Zellmigration) in den ersten 5 Wochen nach Transplantation nicht beobachtet werden, so dass unmittelbare

Rückschlüsse vom morphologischen Integrationserfolg auf funktionelle Effekte und umgekehrt nicht möglich sind (Baier et al. 2004).

Die Arbeitsgruppe von Lee et al. (2000) berichtete über ein 5- Stufen- Protokoll, das die Generierung von dopaminergen Neuronen aus murinen pluripotenten Stammzellen ermöglichte. Die Besonderheit dieser Methode bestand in der Formation von „Embroid bodies“ (Lee et al. 2000) und der Expansion von Nestin-positiven Zellen. Nestin wird gewöhnlich als Marker auf unreife neurale Vorläuferzellen verwendet. (Zietlow et al. 2005, Lendahl et al. 1990) Durch die Verwendung von Sonic Hedgehog und FGF8 konnte der Anteil an dopaminergen Zellen in der Kultur von ca. 7 auf 15 % gesteigert werden (Lee et al. 2000). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Anteil an dopaminergen Zellen auf fast 80% gesteigert werden kann, wenn die embryonalen Zellen entsprechend gentechnisch manipuliert werden (Kim JH et al. 2002) Die Arbeitsgruppe um Inden präsentierte ein Protokoll, wodurch mit Hilfe von Nicotinamid ebenfalls erfolgreich dopaminerge Zellen generiert werden können (Inden et al. 2004). Eine weitere als therapeutisches Klonen bekannte Methode ermöglicht eine erfolgreiche Stammzelltransplantation ohne eine problematische reaktive Immunantwort (Wakayama et al. 2001, Hwang WS et al. 2004). Auch die Anreicherung von dopaminergen Neuronen aus humanen embryonalen Stammzellen scheint aussichtsreich (Park CH et al. 2005)

### **1.3.5. Neurale multipotente Vorläuferzellen**

Embryonale Stammzellen haben gegenüber fetalen mesenzephalen Zellen Vorteile, aber auch Nachteile, die vor allem die Tumorigenität von undifferenzierten Stammzellen betreffen. Mit der Verwendung von neuronalen Vorläuferzellen versprach man sich die Teratomegefahr eindämmen zu können. Embryonale neurale Stammzellen sind multipotente, neurale Stammzellen, die aus dem Neuroepithel eines Embryos gewonnen werden. Diese können aus jeder Region des embryonalen Gehirns freipräpariert werden und zeigen eine starke aber begrenzte Teilungsfähigkeit (Gage 2000), die unter verschiedene Wachstumsfaktoren, wie EGF oder FGF2 potenziert werden kann (Reynolds et al. 1992; Tropepe et al. 1999; Hitoshi et al. 2002; Hayflick 1997). Vergleichbar mit den embryonalen Stammzellen

kann die Differenzierung dieser Zellen durch intrinsische und extrinsische Faktoren beeinflusst werden (Caldwell et al. 2001). Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Eigenschaften der später differenzierten Zelle von der Gehirnregion abhängen, der sie entnommen wurden. Diese zeigten Migrationverhalten und waren aber nicht in der Lage, die Symptome im Parkinsonmodell der Ratte zu mildern (Mukhida et al. 2008). Obwohl es gelungen war, dopaminerge Neuronen aus neuralen Stammzellen zu erzeugen (Matsuura et al. 2001), waren die erreichbaren Mengen an dopaminergen Zellen noch zu gering, um einen funktionellen Gewinn zu erwarten (Svendsen und Caldwell 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die zielgerichteten Differenzierungsprotokolle zur Generierung von dopaminergen Zellen durch genetische Interventionen verbessert werden können (Wagner et al. 1999). Im Parkinsonmodell der Ratte war das Überleben der dopaminergen Zellen nach Transplantation gering und ein funktioneller Gewinn war in den Verhaltensversuchen nicht zu beobachten (Kim JY et al. 2003). Weitere genetische Manipulationen konnten die Eigenschaften der differenzierten Zellen in vitro und in vivo verbessern (Park CH et al. 2006).

### **1.3.6. Adulte neurale Stammzellen**

Stammzellen finden sich auch in erwachsenen Organismen. Adulte neurale Stammzellen sind teilungsfähige Zellen, aus denen neue Neurone hervorgehen können. Diese befinden sich überwiegend in der subependymalen Schicht der ventrikulären Zone und im Gyrus dentatus des Hippokampus (Gage 2002; Gould et al. 1999). Eine Verwendung dieser Zellen erlaubt ein autologes Vorgehen. Palmer et al. war es bereits gelungen, humane adulte Stammzellen zu kultivieren (Palmer et al. 2001). Die Verwendung von autologem Spendermaterial setzt allerdings voraus, dass die Neurogenese selbst nicht in den neurodegenerativen Prozess einbezogen wird (Armstrong und Barker 2001).

### **1.3.7. Knochenmarkstammzellen**

Eine weitere Quelle autologer Stammzellen sind nicht neuronale Stammzellen, wie hämatopoetische Stammzellen (Dezawa 2008), die unter bestimmten Umständen in Neurone differenzieren können (Mezey und Chandross 2000; Woodbury et al. 2000; Jiang Y et al. 2002) oder über Transduktion von Genen zu Dopamin- produzierenden Zellen werden (Schwarz et al. 1999). Der Vorteil dieser Zellen liegt in der vergleichbar einfachen Gewinnung der Zellen aus dem Knochenmark und in der unkomplizierten in- vitro- Expansion dieser Zellen (Dezawa 2008). Bisher konnten multipotente hämatopoetische Stammzellen vom Menschen und Tier effektiv zu dopaminergen Neuronen transdifferenziert werden, die nach Transplantation in ein Parkinsonmodell der Ratte sogar zu einer Verbesserung von Verhaltensdefiziten führten (Dezawa et al. 2004). Nach Transplantation waren in den histologischen Untersuchungen zudem keine tumorartigen Formationen zu erkennen. Bis zur Einführung dieser Zellen in den klinischen Gebrauch müssen aber weiterführende Sicherheitsstudien am Tiermodell unter besonderer Beachtung der Tumorbildung und der Langzeitwirkung noch abgewartet werden.

### **1.4. Vom Mensch zum Tier: Tiermodelle des Parkinsonsyndroms**

Der Durchbruch in der Erforschung der pathogenetischen Rolle des Mitochondriums bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen öffnete zahlreichen experimentellen Tiermodellen die Tür (Dauer und Przedborski 2003).

Auf der Grundlage von mitochondrialen Toxinen wurden Tiermodelle anhand von Nagetieren und Primaten etabliert, die sowohl anatomisch/pathologisch als auch bezüglich des Verhaltens Parallelitäten zum menschlichen Korrelat zeigen (Di Filippo et al. 2006).

In den letzten Jahren wurden darüber hinaus neue genetische Tiermodelle vorgestellt, die einen grundlegenden Einblick in die pathogenetischen Vorgänge der Parkinsonerkrankung versprechen (Dauer und Przedborski 2003).

Grundsätzlich unterscheidet man neurotoxische von genetischen Parkinsonmodellen.

#### **1.4.1. Neurotoxische Tiermodelle**

Bevorzugt werden Toxine verwendet, wie MPTP, Rotenone, Paraquat und 6-Hydroxydopamin. Allen gemeinsam ist, dass sie die mitochondriale Funktion stören und auf diesem Weg zur Bildung von radikalen Sauerstoffspezies führen. Das Hauptangriffsziel von MPTP und Rotenon ist der Komplex 1 der Atmungskette, der durch die Toxine inhibiert wird. (Dauer und Przedborski 2003).

#### **1.4.2. 6- Hydroxydopamin (6-OHDA)**

Dieses Tiermodell wurde an der Ratte erstmals von Ungerstedt im Jahre 1968 vorgestellt und wird aktuell häufig als Parkinsonmodell verwendet (Ungerstedt 1968). Es stellt ein gutes validiertes Modell dar, bei dem durch intrazerebrale Applikationen von 6- OHDA die dopaminergen Neurone im Mittelhirn, insbesondere der Substantia nigra (A9) und des ventralen tegmentalaren Areals (A10) eliminiert werden (Schwartz und Huston 1996). Im Gegensatz zu Rotenon ist das Molekül polar und nicht in der Lage, die Blut- Hirn- Schranke zu überwinden, weshalb die Substanz stereotaktisch in das Gehirn injiziert werden muss. Erfolgreiche Applikationsorte stellen die Substantia nigra direkt, aber auch das MFB (medial forebrain bundle) und das Striatum dar (Javoy et al. 1976; Jonsson 1983). Dabei wirkt die Substanz selektiv. Dies wird durch die restriktive Aufnahme in die Zelle über Dopamin- und Noradrenalin- Transporter gewährleistet (Luthmann et al. 1989). Im Anschluss an die stereotaktischen Applikation beginnt die Degeneration der ersten dopaminergen Neurone nach 24 Stunden, insofern das Toxin intranigral oder in die MFB injiziert wurde (Jeon et al. 1995). Bei einer Injektion des Toxins in das Striatum des Tieres erfolgt demgegenüber ein protrahierter retrograder Zellverlust, der hauptsächlich über 1 bis 3 Wochen stattfindet. Es lassen sich dadurch partielle Läsionen mit progredientem Charakter ähnlich dem idiopathischem Parkinson erzielen. (Ichitani et al. 1991, Kirik et al. 1998, Sauer und Oertel 1994; Przedborski et al. 1995). Die retrograde Degeneration betrifft bei striataler Injektion ausschließlich die Zellen der

Substantia Nigra, da die Neurone in der VTA überwiegend ins limbische System projizieren. Als Folge der striatalen Entfaserung kommt es zu einer Abnahme von Dopamin und seinen Abbauprodukten (Espino et al. 1995). Normalerweise wird eine unilaterale Läsion des nigrostriatalen Systems durchgeführt, wodurch ein induzierbares Rotationsverhalten und andere motorische Zeichen ausgelöst werden (Schwartz und Huston 1996). Die kontralaterale Seite dient hierbei als Kontrolle gegenüber der behandelten Seite (Ungerstedt 1971). Der Vorteil dieses Modells gegenüber den anderen Methoden ist offensichtlich. Eine Bestimmung des dopaminergen Defizits ist durch motorische Verhaltenstests möglich, ein gewisser positiver Effekt einer medikamentösen, zellersetzenden oder genetischen Therapie kann gut quantifiziert werden (Jiang H et al. 1993; Bjorklund LM et al. 2002; Mandel et al. 1998). Der Grad der striatalen Denervierung des Tieres korreliert hierbei gut mit dem motorischem Defizit oder dem resultierendem Rotationsverhalten, wodurch restaurative Therapien mit genetischen, pharmakologischen oder auch zellersetzenden Paradigmen wirksam erfasst werden können (Schwartz und Huston 1996). Die Wirkungsweise des 6-OHDA lässt sich anhand seiner oxidativen Eigenschaft und seiner toxischen Produkte erklären (Kumar et al. 1995, Sachs und Jonsson 1975). Nach Aufnahme zeigen die dopaminergen Neurone degenerative Erscheinungen bis sie schließlich nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip unwiderruflich untergehen (Cohen und Heikkila 1974; Jonsson 1980).

#### **1.4.3. Paraquat, Rotenon und MPTP (MPPP)**

Paraquat zählt zu den Herbiziden und wird in diversen epidemiologischen Studien als Risikofaktor des sporadischen Parkinsons gehandelt (Liou et al. 1997). Ähnlich wie 6-Hydroxydopamin wirkt Paraquat über die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies zelltoxisch (Day et al. 1999). Im Mausmodell kann Paraquat insbesondere dopaminerge Neurone der Substantia nigra Pars compacta schädigen. Hierbei kommt es typischerweise zur Bildung von Lewy-Körperchen (Manning- Bog et al. 2002; McCormack et al. 2002).

Rotenone wird weltweit als Pestizid und Fischgift verwendet. Das lipophile Toxin überwindet nach intravenöser Applikation leicht die Blut- Hirn- Schranke und die Zellmembran. Rotenone bindet ähnlich wie MPTP an den Komplex 1 der Elektronentransportkette und entfaltet seine zelltoxische Wirkung durch die Bildung von radikalen Sauerstoffspezies (Talpade et al. 2000). Rotenone zeigt in der Ratte eine gewisse Selektivität bezüglich der dopaminergen Zellen der Substantia nigra. Ein Behandlungserfolg zeigt sich in einer Verlangsamung der Spontanbewegungen.

MPTP entstand erstmals unbeabsichtigt bei der Herstellung des Meperidinderivats MPPP als ein Nebenprodukt (Langston et al. 1983; Langston et al. 1999). Es wirkt nach intravenöser Applikation neurotoxisch und ist sehr effektiv bei Primaten und Mäusen. Behandelte Tiere weisen ein schweres und irreversibles Parkinsonsyndrom auf. MPTP ist strukturverwandt mit Paraquat und hat entsprechende lipophile Eigenschaften (Markey et al. 1984). Die zelltoxische Wirkung entfaltet MPTP über sein Metabolit MPPP. MPPP führt über eine Inhibition des Komplex 1 der Elektronenkette (Nicklas et al. 1985) zu einem Verlust von ATP. Zusätzlich werden verschiedene radikale Sauerstoffspezies wie Superoxide gebildet (Hasegawa et al. 1990; Hasegawa et al. 1997). Das Striatum und die VTA sind dabei Hauptangriffspunkte (Chan et al. 1991; Fabre et al. 1999).

#### **1.4.4. Genetische Tiermodelle**

Abgesehen von neurotoxischen Parkinsonmodellen wurden diverse Tiermodelle mithilfe genetischer Veränderungen etabliert, die zu mehr Einblick in die neurodegenerativen Vorgänge verhelfen sollten. In der Vergangenheit wurden einige mit Parkinson assoziierte Gene identifiziert. Zu diesen zählen Alpha- Synuclein (Polymeropoulos et al. 1997), Parkin (Kitada et al. 1998), UCH-L1 (Betarbet et al. 2005) und das DJ-1 Protein (Bonifati et al. 2003). Alpha- Synuclein scheint hier ein präsynaptisches Regulatorprotein mit neuromodulativer Funktion zu sein (Abeliovich et al. 2000). Mutationen der betreffenden Gene oder deren Überexpression führen zu falscher Proteinfaltung und einen gestörten Proteasomkomplex (Dauer und Przedborski 2003). Transgene Mäuse mit Überexpression eines humanen Alpha-



Synucleins zeigen weiter eine nigrostriatale Degeneration mit typischen zytoplasmatischen Einschlüssen. Die Einschlüsse des transgenen Mausmodells unterscheiden sich aber von den Lewy- Körperchen, die in pathologischen Geweben von Patienten zu finden sind (Masliah et al. 2000; Betarbet et al. 2002; Van der Putten et al. 2000). Neuerdings wurde ein genetisches Modell entwickelt, das den pathologischen, pathophysiologischen und klinischen Aspekten der humanen Parkinsonerkrankung erstaunlich ähnelt. Die sogenannte Mitomaus kennzeichnet sich durch einen progressiven Verlust von dopaminergen Zellen der Substantia nigra und der ventralen tegmentalen Region aus. Klinisch zeigen die Mäuse ein spät einsetzendes Parkinsonsyndrom (Ekstrand et al. 2007).

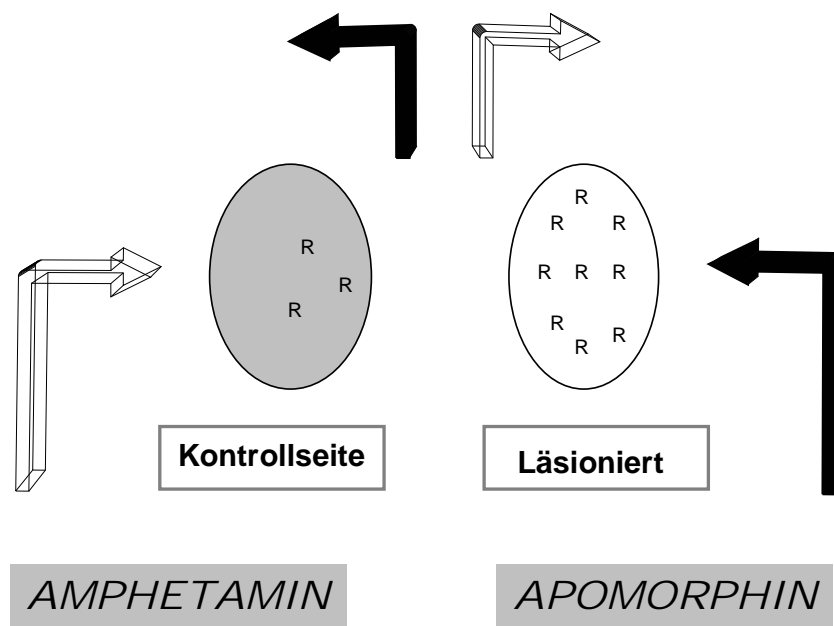
## **1.5. Einführung in die Verhaltenstests**

### **1.5.1. Rotametrie**

Die **quantitative Rotametrie** beim Parkinsonmodell stützt sich auf die Beobachtung von spontanem und induzierbarem Rotationsverhalten, welches als zuverlässiges Maß für den Ausfall dopaminergener Neurone gelten kann. Das Rotationsverhalten der unilateral läsierten Ratte wurden von Andén et al. (1966) erstmals durch eine elektrische Läsionsmethode als spontane Rotation zur gesunden Seite beobachtet. Im Falle des neurotoxischen Parkinsonmodells war es Ungerstedt, der erstmals zeigen konnte, dass das Rotationsverhalten nicht nur spontan auftrat sondern auch durch Amphetamin und Apomorphin induzierbar war (Ungerstedt 1968; Ungerstedt 1971). Das Ausmaß der Rotation steht in einem graduellen Zusammenhang mit der Größe der nigrostriatalen Degeneration. Ähnlich wie bei Parkinsonpatienten, bei dem erst ab einem Zellverlust von 70 % im SNc Symptome auftreten (Fearnley und Lees 1991; Halliday et al. 1996), muss ein Schwellenwert im 6- OHDA- Modell überschritten werden, um rotatorische Abnormalitäten überhaupt beobachten zu können. Erst ein 70 % iger Verlust der nigralen dopaminergen Neurone und eine 80 %- ige Abnahme des striatalen Dopaminspiegels führt zu signifikanten kontralateralen Rotationen nach Applikation von Apomorphin (Henderson et al. 2003). Nach anderen Autoren muss der striatale Dopaminverlust 90 % (Hudson et al. 1993) sein, um nach Applikation von Apomorphin ein klares Rotationsverhalten

beobachten zu können. Im Falle des Amphetamins scheint schon ein Zellverlust von mindestens 50 % auszureichen, um mit Amphetamin ein Rotationsverhalten zu induzieren (Hefti et al. 1980). Die Ursache des Rotationsverhaltens wird in dem unbalancierten Neurotransmitterhaushalt des nigrostriatalen Systems gesehen (Henderson et al. 2003). Das Rotationsverhalten wird anscheinend mehr über mesenzephalische Gebiete und weniger durch thalamokortikale oder pyramidale Bahnen hervorgerufen (Dewar et al. 1983). Nach Denervierung der striatalen Neurone durch den protrahierten irreversiblen Untergang der dopaminergen Neurone (Sotelo et al. 1973) kommt es zur Supersensitivität der striatalen Neurone durch verstärkte Expression der Dopamin-Rezeptoren (Schwartz und Huston 1996; Creese et al. 1977). Apomorphin, ein Dopaminagonist, führt so bei subkutaner Injektion zu einer Rotation kontralateral zur Läsion, da die Überexpression der Dopaminrezeptoren im läsierten Gebiet zu einem Überwiegen der Aktivität gegenüber der nicht behandelten Seite führt (Creese et al. 1977). Im Versuch zeigen die Tiere einen hochgradig gewinkelten Rumpf und eine gerichtete Rotation.

Amphetamin wirkt dem gegenüber durch Freisetzung des restlichen, in den Nervenendigungen verbleibenden Dopamins und hat deshalb den gegenteiligen Effekt. Denn auf der gesunden Seite ist die Anzahl der Neurone höher als auf der läsierten Seite. Bei Applikation von Amphetamin kommt es zu einem Dopaminüberschuss im Bereich des gesunden Striatums. Die Folge ist eine Rotation zur kranken Seite (s. Abbildung 3).



**Abbildung 3:**

Schematische Darstellung der Auswirkung von einem indirekten und direkten Dopaminagonisten bei der mit 6-

### 1.5.2. Verhaltensversuche im Rotarod

Im Gegensatz zu den Medikamenten- induzierten Rotationsversuchen wird im sogenannten **Rotarodversuch** (Rozas et al. 1997) das spontane motorische Leistungsvermögen der Ratte auf einer sich drehenden Walze auf die Probe gestellt. Dieser Test erlaubt eine grobe Aussage über die motorische Beeinträchtigung eines läsierten Tieres.

### 1.5.3. Der Zylindertest

Der **Zylindertest** zählt wie der Rotarodtest zu den Medikamenten- unabhängigen Verhaltensversuchen. Der Vorteil dieses Versuches besteht in seiner einfachen, kostensparenden und schnellen Durchführbarkeit. Schallert und Tillerson (2000) und Kirik (2000) beschrieben dieses Testverfahren als gute Methode, Akinesien im unilateralen 6- OHDA- Parkinsonmodell über eine abnehmende Vorderpfotenaktivität zu erfassen. Schallert (2000) konnte zeigen, dass nachdem die Ratten in einen Zylinder gesetzt wurden, die Versuchstiere ein normales und physiologisches Erkundungsverhalten aufwiesen, indem sie sich auf die Hinterpfoten stellten und sich dabei mit den Vorderpfoten an der Zylinderwand abstützten.

### 1.6. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene aus embryonalen Stammzellen gewonnene Zellen auf die Funktion und Tumorigenität in einem Parkinsonmodell der Ratte untersucht. Hierzu wurden klinische Verhaltensversuche durchgeführt, die den gängigen Versuchsaufbauten in vorangegangenen Arbeiten (Baier et al. 2004, Thinyane et al. 2005) entsprachen. Im Gegensatz dazu erfolgte eine Immunsuppression mit Cyclosporin A. Zur Klärung der Tumorigenität und der zellulären Differenzierung unter diesen immunmodulatorischen Bedingungen wurden Gehirnschnitte mit histoimmunologischen und histochemischen Färbungen angefertigt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

#### **A:**

Es wird histologisch untersucht, ob und in wie fern eine genetische Manipulation und die Differenzierung von Stammzellen die Tumorigenität einer Stammzelllinie beeinflusst.

## **B:**

Die Transplantationsprotokolle werden geprüft, ob die embryonalen bzw. differenzierten Stammzellen zur Transplantation geeignet sind und ob dopaminerge Neurone produziert werden, die in den verschiedenen klinischen Tests zu einer funktionellen Verbesserung führen können. Weiter wird versucht, einen Einfluss der Tumorigenität auf die funktionellen Ergebnisse festzustellen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Tiere und Haltung**

Im Rahmen der Arbeit standen männliche Wistarratten zur Verfügung. Das Durchschnittsgewicht der Tiere betrug bei Studienbeginn 300 g. Die Tiere wurden in standardisierten Einzelkäfigen in der Zentralen Tierabteilung der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen gehalten. Es wurde ein 12- Stunden- Nacht und 12- Stunden- Tag- Rhythmus eingehalten. Der Raum wurde konstant auf 21 +/- 1 °C temperiert. Wasser und Futter waren den Tieren ad libitum zugänglich.

### **2.2. Vorbereitung und Durchführung der stereotaktischen Läsionierung und Transplantation von Spenderzellen**

#### **2.2.1. Stereotaktische Läsion des nigrostriatalen Systems mit 6-Hydroxydopamin**

Zur intrakraniellen Injektion des 6- Hydroxydopamins wurden ein Kopf- und ein TSE- Stereotakt (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland; David Kopf Instruments, Tujunga, USA) als Befestigungsvorrichtungen verwendet.

Die intraperitoneale Anästhesie wurde mit einem Gemisch aus Ketamin (Ketanest) und Rompun (Xylazin) (40 mg/kg KG, 5 mg/ kg KG) durchgeführt. Zum Schutz der

nicht- dopaminergen, katecholaminergen Neurone wurde jedem Tier vor Narkose und der 6- OHDA- Injektion Desipramin (25 mg/kg, i.p; 12.5 mg/ml; 0.2 ml/100 g Körpergewicht) intraperitoneal injiziert Die Dosis wurde an das tagesaktuelle Gewicht der Tiere angepasst.

Nachdem die Wirkung der Narkose eintrat, wurden die Tiere mit einem handelsüblichen Schergerät vom Kopfhaut befreit. Der Kopf wurde stereotaktisch fixiert. Zwei als „Earbars“ bezeichnete Metallstäbe garantierten zusammen mit einem „Toothbar“ eine exakt horizontale Lage des Tierkopfes, wodurch millimetergenaue Injektionen ermöglicht wurden.

Zu Beginn der Operation erfolgte ein Schnitt durch die Kopfhaut. Der Schnitt führte an einer medianen Linie entlang. Die Wundränder wurden mit sogenannten „Bullfrog“- Wundklammern versehen und die Schädelkalotte hierdurch freigelegt. Anschließend wurde die Schädelkalotte mit Wattetupfern von Blut und Flüssigkeiten befreit, bis die Schädelnähte erkennbar wurden. Die Schädelnähte (Bregma und Lambda) dienten als definierte Landmarken zur Orientierungshilfe für die stereotaktische Trepanation und Injektion. Die stereotaktischen Koordinaten für die Operation wurden dem Gehirnatlas nach Paxinos und Watson (1986) entnommen. Mit einem elektrischen Bohrer wurde ein Loch in das Neurokranium bei den Koordinaten 2,8 mm anterior und 2.0 mm lateral relativ zum Bregma gebohrt. Die Dura wurde anschließend mit einer Injektionskanüle durchstoßen und auftretende Blutungen wurden gestillt. Zur Injektion des 6- OHDA wurde eine Hamilton-Mikroliterspritze des Typs CR 400-20 (Hamilton Company, Reno, USA; Durchmesser der Nadel: 0.47 mm) verwendet. Das 6- OHDA (4µl von 3.75 mg/ml 6-OHDA, Sigma, gelöst in 0.1% Ascorbinsäure) wurde in 8,6 mm Tiefe relativ zur Dura appliziert. Die Injektionsgeschwindigkeit der Infusionspumpe wurde auf 0,5 µl pro Minute festgelegt. Eine Injektion dauerte insgesamt 8 Minuten. Nach abgeschlossener Injektion wurde die Nadel um einen Millimeter zurückgezogen, wodurch ein kleines Depot im Hirngewebe erzeugt wurde. Nachdem die Nadel für weitere 4 Minuten in dem Gewebe verblieben war, wurde sie vollständig aus dem Situs entfernt. Durch dieses Vorgehen wurde die Diffusion des Neurotoxins in das umgebende Gewebe gefördert und es wurde gleichzeitig vermieden, dass die applizierte Substanz in den Stichkanal zurückdiffundiert. Das Loch in der Schädelkalotte wurde anschließend mit Knochenwachs verschlossen und die Wundränder mit Einzelkopfnähten adaptiert. In

der postoperativen Phase wurden die Tiere in die Käfige zurück auf eine Wärmedecke gelegt, wodurch eine Auskühlung der Tiere verhindert wurde. Bei der Lagerung der narkotisierten Tiere wurde auf eine Freigängigkeit der Atemwege geachtet.

## **2.2.2. Charakterisierung und Vorbereitung der Spenderzellen**

### **MPI Stammzellen**

Hierbei handelt es sich um undifferenzierte murine embryonale Stammzellen.

### **OS25 Stammzellen (murin)**

Bei diesen embryonalen Stammzellen wird ein Suizid- Gen unter der Kontrolle des Oct4- Gens gebracht. Prinzipiell sollen dadurch pluripotente Zellen mit Oct4- Phänotyp eliminiert werden, die u.a. als Ursprungszellen für die Tumorbildung gelten. Als Suizidgen wurde ein Thymidinkinase- Gen des Herpes- simplex- Virus (TK) eingesetzt. Der Zelltod wird durch Ganciclovir induziert.

### **Eras Stammzellen (murin)**

Eras ist ein Gen welches ausschließlich in pluripotenten Stammzellen exprimiert wird und daher ebenfalls als Merkmal für eine erhöhte Tumorigenität der transplantierten Zellen gilt. Murine Stammzellen mit einem defizientem Eras- Gen zeigen eine geringere Tumorraten, nachdem sie subkutan in einem Mausmodell injiziert wurden (Takahashi et al. 2003).

## **HT2 Stammzellen**

Die transplantierten Zellen wurden kurz vor der OP des jeweiligen Tieres in den Versuchsraum transportiert. Hierdurch wurde eine vergleichbare Vitalität und Qualität der Zellen gewährleistet. Der Transport der proteolytisch getrennten Zellen erfolgte in Eppendorfpipetten. Eine Aluminiumfolie schützte beim Transport vor Einwirkung von UV-Strahlen. Die Zellen wurden anschließend mit Medium verdünnt, resuspendiert und im Folgenden transplantiert.

### **2.2.3. Striatale Transplantation und Immunsuppression**

Das operative Vorgehen der Transplantation entspricht im Wesentlichen der stereotaktischen Läsion. Im Unterschied zur Läsion waren die Koordinaten für die Bohrungen bei 0,6 mm posterior und 3 mm lateral in Bezug auf das Bregma zu finden. Die Transplantate wurden direkt in das Striatum in zwei Tiefen (6,0 mm und 5 mm) injiziert. Die Injektion wurde mit einer Hamilton-Mikrospritze und einer Edelstahlkanüle (Durchmesser 0.47 mm) durchgeführt. Die Spritze wurde mit Hilfe einer Pump-Sauganlage mit dem Zell-Medium-Gemisch gefüllt.

Im Anschluss an die Transplantation wurde die Wunde mit wenigen Nähten adaptiert und die Tiere in die Käfige zurückgelegt. Die Tiere wurden postoperativ bis zum Erwachen engmaschig kontrolliert. Wie bei der Läsionierung wurden Vorkehrungen getroffen, die eine Auskühlung oder eine Verlegung der Atemwege sicher verhinderten.

Die Tiere wurden bis 5 Wochen nach Transplantation täglich mit Cyclosporin A (10 mg/kg KG, Sandimmun, Novartis Pharma, Nürnberg) behandelt. Das Immunsuppressivum wurde mit einer Insulinspritze intraperitoneal injiziert. Wegen der Immunsuppression war es notwendig, beim Umgang mit den Tieren auf eine strenge Hygiene zu achten. Strengste hygienische Verhältnisse sollten das Risiko einer Infektion der immungeschwächten Tiere möglichst reduzieren. So wurden bei jedem Kontakt mit den Tieren sterile Handschuhe und Masken verwendet.



## **2.3. Methodische Durchführung der Verhaltensversuche**

### **2.3.1. Medikamenten- induzierter Rotationstest**

Im folgenden Versuchsaufbau wurde das zu beobachtende Tier mit einem direkten (Apomorphin) und indirekten (Amphetamin) Dopaminagonisten behandelt. Nach erfolgter Läsion wurden die Versuchstiere mithilfe eines Computer- assistierten Rotametersystems auf ihr Rotationsverhalten geprüft. Die Ratte wurde in einen zylindrischen Behälter mit einem Durchmesser von 30 cm und einer Höhe von 25 cm gesetzt. Jeder Ratte wurde 15 Minuten Zeit zur Gewöhnung gegeben. Der Versuchsaufbau ermöglichte, dass pro Versuchsdurchlauf die Daten von fünf Tieren zeitgleich erfasst werden konnten. Es erfolgte für jede Substanz jeweils zwei Versuchsdurchläufe. Das erste Experiment wurde 3 Wochen nach Läsionierung, das zweite 5 Wochen nach intrastriateller Transplantation durchgeführt.

Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe des TSE- Systems elektronisch aufgezeichnet und zur statistischen Weiterverarbeitung gespeichert. Das zu beobachtende Tier wurde mit einem Bauchgurt versehen, welches seinerseits über eine Polyesterschnur mit dem Detektor verbunden war. Der Detektor war am Behälter über ein Brückensystem befestigt. Der Detektor gab die Anzahl der Rotationen in der dorso-ventralen Körperachse in Winkelgraden über ein Standard- RJ45- Kabel an das System weiter.

Zur Vermeidung visueller, olfaktorischer und akustischer Reize wurde der Versuchsraum von etwaigen Störfaktoren frei gehalten. Nach jedem Versuchsdurchlauf wurden die Behälter mit einem Desinfektionsmittel von Verunreinigungen befreit.

Nach intraperitonealer Applikation von Amphetamin (0,2 ml/100 g KG, Sigma 2 mg/kg i.p.) wurden die Rotationen eines Tieres für 90 Minuten aufgezeichnet. Für die statistische Auswertung wurden die Rotationen der ersten 30 Minuten verworfen, da gezeigt wurde, dass diese wegen der Wirklatenz des Amphetamins nicht ergebnisrelevant sind.

Im Falle des Apomorphins (0.25 mg/kg KG, s.c., 1 ml/kg KG) betrug die Versuchszeit 60 Minuten. Lediglich die Anzahl der Rotationen während der letzten 40 Minuten war hier ergebnisrelevant.

Das System erfasste die ipsi- und kontraversiven Rotationen und bestimmte die Nettorotationen pro Minute, indem die Differenz aus ipsi- und kontraversiven Rotationen pro Zeitintervall berechnet wurde. 3 Rotationen pro Minute sprachen für eine mittelgradige Läsion. 5 Rotationen pro Minute waren hingegen charakteristisch für eine hochgradige Läsion.

Das Ziel dieses Versuchsaufbaus war es, eine Symptomverbesserung durch die zelleretzende Therapie aufzudecken, die sich in einer verminderten Nettorotation in beiden Fällen ausdrücken sollte.

### **2.3.2. Nicht- Medikamenten-abhängiger Verhaltensversuch im Rotarod**

Das Rotarodsystem besteht aus einem Zylinder, in dem waagrecht eine rotierende Walze in 20 cm Höhe installiert ist. Die Walze hatte einen Umfang von 7 cm und konnte im Versuch auf verschiedene Geschwindigkeiten zwischen 1 und 40 Umdrehungen pro Minute eingestellt werden. Im Zylinder konnten pro Versuchsdurchlauf 4 Tiere parallel untersucht werden. Hierzu wurden die Tiere durch Trennwände visuell voneinander getrennt, um eine Beeinflussung der Tiere untereinander möglichst zu vermeiden. Der Boden war mit taktischen Sensoren ausgestattet. Die Sensoren registrierten separat, wenn eines der vier Tiere auf den Boden fiel. Dadurch konnte exakt die Zeit erfasst werden, bis ein Tier von der Walze fällt. Der Erfolg dieses Versuchsaufbaus ist im Gegensatz zu den Rotationsversuchen abhängig von motorischen Lernvorgängen. Deshalb mussten die Tiere vor der versuchsrelevanten Messung an die drehende Walze gewöhnt werden, um vergleichbare Ausgangswerte zu erhalten. Der Sturz von der Walze war die einzige Motivation des Versuches. Ein zusätzlicher elektrischer Schock zur Motivationverstärkung (Rozas et al. 1997) wurde nicht verwendet. An einem Übungstag mit ansteigenden Geschwindigkeiten wurden die Tiere wiederholt auf die Walze gesetzt, bis jedes Tier möglichst lange oder über die volle Distanz (180 Sekunden) auf der Walze laufen konnte. Insgesamt wurden in der vorliegenden

Arbeit 5 Geschwindigkeitsstufen (1 Umdrehungen/min, 3 Umdrehungen/min, 5 Umdrehungen/min, 7 Umdrehungen/min und 9 Umdrehungen/min, 11 Umdrehungen/min) verwendet. Zwischen jeder Geschwindigkeitsstufe wurde eine Pause von 5 Minuten eingehalten. Für die Auswertung war die von einem Computersystem ermittelte Zeit relevant, in der die entsprechende Ratte auf der rotierenden Walze bei der jeweiligen Geschwindigkeitsstufe lief. Falls die Ratte über die volle Distanz von 180 Sekunden nicht von der Walze gefallen war, wurde die Zeit gestoppt und die nächst höherer Geschwindigkeitsstufe gewählt. Die Ergebnisse aus dem ersten Versuch nach Läsion wurden den Ergebnissen aus dem zweiten Versuch 5 Wochen nach Transplantation gegenübergestellt. Zur statistischen Datenanalyse wurde die Summe aus den Produkten von der erreichten Zeit und der jeweiligen Rotationsstufe gebildet, die wir als *Area under the curve* (AUC) bezeichnen:  $AUC = 1 \times t(1 \text{ Umdrehungen/min}) + 3 \times t(3 \text{ Umdrehungen/min}) + 5 \times t(5 \text{ Umdrehungen/min}) + 7 \times t(7 \text{ Umdrehungen/min}) + 9 \times t(9 \text{ Umdrehungen/min}) + 11 \times t(11 \text{ Umdrehungen/min})$ .

### **2.3.3. Zylindertest**

Bei der Durchführung des Versuches wurde die betreffende Ratte in einen Zylinder (ca. 20 cm Durchmesser, 35 cm Höhe) gesetzt und für 3 Minuten beobachtet. Die Berührungen der Zylinderwand mit der Vorderpfote der zu beobachtenden Ratte wurden getrennt für links und rechts festgehalten. Nur die Berührungen, die zur Unterstützung des Körpers beim Aufrichten zu beobachten waren, wurden als positives Ereignis gewertet. Die Anzahl der Wandberührungen mit der zur Läsion kontralateralen Pfote wurde ins Verhältnis mit den Berührungen mit der ipsilateralen Pfote (Quotient= links/rechts) gesetzt. Eine erfolgreiche Läsion drückt sich in einer zunehmenden Vorderpfotenpräferenz für die kontralateral der Läsion gelegenen Pfote aus. Der Test wurde sowohl vor Läsion als Basistest, vor Transplantation und 5 Wochen nach Transplantation durchgeführt.

## **2.4. Transkardiale Perfusion**

Nach den letzten Verhaltensuntersuchungen wurden die Tiere mit einer letalen Dosis Ketamin und Xylazin bis zum Sistieren der spontanen Atmung narkotisiert. Daraufhin wurde der Brustkorb eröffnet und der Apex des linken Ventrikels aufgesucht und inzidiert. Eine Perfusionskanüle aus Edelstahl wurde bis in die Aorta ascendens vorgeschoben und danach der rechte Vorhof eröffnet. Eine Klemme an der Aorta descendens knapp oberhalb der Bifurkation begrenzte die Perfusion der unteren Extremitäten und verbesserte die Perfusion des Gehirns. Anschließend wurden 100 ml körperwarme Pufferlösung PBS infundiert. Die Pufferlösung ersetzte das Blut, das über den rechten Vorhof abfließen konnte. Nachdem der Blutkreislauf fast komplett durch Pufferlösung ersetzt war, erfolgte die Infusion einer 4%-igen, kalten Lösung des Fixationsmittels Paraformaldehyd. Nach der Perfusion wurden die Tiere dekapitiert und die Köpfe über Nacht in Paraformaldehyd gelagert.

## **2.5. Histochemische und immunhistologische Verfahren**

Die perfundierten Gehirne wurden zunächst in Paraffin stabilisiert. Mit einem Mikrotom wurden 100 µm starke Gewebsschnitte in Höhe des striatalen Transplantationsgebiets angefertigt. Als Positivkontrolle auf Tyrosinhydroxylase und als Negativkontrolle auf Zytokeratin wurden ebenfalls histologische Schnitte von einer Nebenniere erstellt. Zu Übersichtszwecken wurden von allen transplantierten Gehirnen eine histochemische Färbung mit Hämatoxylin und Eosin angefertigt. In den folgenden Arbeitsgängen wurden diverse immunhistologische Markierungen der nachstehenden Antigene vorgenommen.

### **2.5.1. Tyrosinhydroxylase**

Tyrosinhydroxylase ist das initiale und geschwindigkeitsbestimmende Enzym der katecholaminergen Zellen (Nagatsu et al. 1964)

### **2.5.2. Lu- 5 (Anti- Zytokeratin)**

Lu- 5 ist ein Antikörperklon, der die meisten Subtypen der Zytokeratinfamilie erkennt. Dadurch wird er gerne zum Screening auf epitheliale Zellen eingesetzt, wodurch eine Unterscheidung zwischen epithelialen und mesenchymalen Zellen möglich wird. Lu- 5 wurde schon ausgiebig auf seine Sensitivität und Spezifität auf neoplastische und nicht- neoplastische Zellen mit epithelialer Herkunft getestet (Von Overbeck et al. 1985). Zur Zeit wird es bevorzugt zur Unterscheidung von epithelialen und mesothelialen Tumoren von mesenchymalen Tumoren eingesetzt. Hierdurch ist eine Abgrenzung zu neuronalen Tumoren möglich.

### **2.5.3. Oct 3/4**

Zur Beurteilung des Differenzierungsgrades der transplantierten Zellen wurden immunologische Färbungen mit Antikörpern gegen den Transkriptionsfaktor Oct-3/4 durchgeführt. Oct- 3/4 scheint nach einschlägiger Literatur für die Pluripotenz von undifferenzierten Stammzellen, dosisabhängig verantwortlich zu sein, da differenzierte Zellen die Expression dieses Faktors herunter regulieren (Niwa et al. 2000). So konnte gezeigt werden, dass Oct- 3/4 in einer dosisabhängigen Art und Weise für die Aufrechterhaltung der Stammzelllinien als auch für deren Differenzierung von entscheidender Bedeutung ist. So entwickelten Zellen mit verminderter Expression von Oct-3/4 trophoblastische Eigenschaften, während Stammzellen bei Überexpression desselben Faktors mesenchymale oder endodermale Charakteristika annahmen (Niwa 2001).

#### **2.5.4. Ki 67**

Ki 67 ist ein Kernantigen, das über einen spezifischen Primärantikörper nachgewiesen werden kann. Seine Expression erfolgt während der Mitose sowie der G1-, S- und G2-Phase. In der Ruhephase kann es nicht nachgewiesen werden (Scholzen und Gerdes 2000, Gerdes et al. 1991).

#### **2.6. Methodik der histologischen Untersuchungen**

Zusammengefasst wurden hierzu wie bei der histochemischen Färbung mit Hämatoxylin und Eosin die Paraffinschnitte in einer Straße mit 2 Xylolstationen und mit einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 90%, 70%, 50%) bei jeweils 5 Minuten Verweilzeit entparaffiniert. Danach wurde die intrinsische Peroxidase- Aktivität geblockt, indem die Schnitte für 20 Minuten in einer Phosphat- gepufferten Kochsalzlösung (PBS) mit 5 %iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert wurden. Anschließend wurde eine unspezifische Antikörperreaktion durch Behandlung mit einer 10%igen fetalem bovinem Serum enthaltener PBS- Lösung inhibiert. Die entparaffinierten Gehirnschnitte wurden nun im Rahmen der immunologischen Weiterverarbeitung mit den Antikörpern in der jeweils zugehörigen Verdünnung über Nacht bei Kühlschranktemperatur (4°C) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Auswaschen der Objektträger mit fetalem bovinem Serum und PBS um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Primärantikörpermarkierten Gewebeproben mit sekundären, biotinylierten Schaf- oder Ziegen- Antikörpern behandelt und mit einem Avidin- Biotin- assoziierten Peroxidase- Komplex entwickelt. Diese histochemische Färbemethode nutzt die hohe Affinität zwischen Avidin und Biotin aus, wodurch die Sensitivität eines mit biotin- verbundenem Antikörpers um ein vielfaches erhöht wird. Die eigentliche Färbereaktion wird durch die enzymatische Umsetzung von DAB (Diaminobenzidin) hervorgerufen. Die Peroxidasereaktion wurde hierzu durch Zusatz von Wasserstoffperoxid (33 %) gestartet. Das farblose DAB polymerisiert dabei zu einem braunen Polymerprodukt.

Zur Vermeidung einer zu starken Hintergrundfärbung wurde unter regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle darauf geachtet, dass die Wasserstoffperoxidreaktion zum richtigen Zeitpunkt unterbrochen wurde. Als Gegenfärbung wurde die histochemische HE- Färbung gewählt. Nach abgeschlossener histochemischer und immunologischer Färbung wurden die Gehirnschnitte in aufsteigender Alkoholreihe und in Xylol dehydriert und mit einem Einschlussmittel (DePex) eingedeckelt.

Die histologischen Schnitte wurden manuell unter dem Lichtmikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg ) unter verschiedenen Vergrößerungen (10 fach, 20 fach, 40 fach, 100 fach) beurteilt. Zur Dokumentation wurden Bilder mit einem Videosystem (12,5 Megapixel CCD- Kamera Typ DP71 (Olympus Deutschland GmbH) aufgenommen.

Die Beurteilung konzentrierte sich primär auf die Suche nach Tumorformationen und dem Nachweis des Transplantats. Weiter wurde untersucht, ob das Transplantat dopaminerge Neurone aufwies oder der Tumor epitheliale Strukturen in der histochemischen Färbung aufwies oder in der histoimmunologischen Färbung auf Zytokeratin positiv war. Die Proliferationsaktivität der Zellen innerhalb der Tumore und innerhalb der Transplantate wurde anhand der Proliferationsmarker Ki67 untersucht. Das Vorliegen von pluripotenten Zellen wurde durch den Nachweis von Oct-3/4 bestimmt.

## **2.7. Statistische Methoden**

### **2.7.1. Zylindertest**

Die gesammelten Daten aus den 3 sequentiellen Experimenten wurden schließlich gegenübergestellt und mit einem Student- t- Test auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft. Im intraindividuellen Vergleich fand der gepaarte Student- t- Test Anwendung. Im interindividuellen Vergleich wurde der ungepaarte Student- t- Test verwendet. Ein  $p$ - Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

### **2.7.2. Rotametrie**

Die Nettorotationen der läsierten Tiere vor und nach Transplantation wurden mit einem Student- t- Test geprüft. Im intraindividuellen Vergleich fand der gepaarte Student- t- Test Anwendung. Im interindividuellen Vergleich wurde der ungepaarte Student- t- Test verwendet. Eine Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.

### **2.7.3. Verhaltenstest im Rotarod**

Das Ergebnis des Rotarodversuches vor der Transplantation wurde im Rahmen eines Student- t- Tests mit Ergebnis nach Transplantation auf einen signifikanten Unterschied hin untersucht. Im intraindividuellen Vergleich fand der gepaarte Student- t- Test Anwendung. Im interindividuellen Vergleich wurde der ungepaarte Student- t- Test verwendet. Eine Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.

## **3. Tierzahlen und Einschlusskriterien:**

Zu Studienbeginn wurden insgesamt 175 Tiere eingeschlossen. 54 der transplantierten Tiere konnten aus technischen Gründen einer histologischen Auswertung nicht zugeführt werden und wurden von den statistischen Verhaltensanalysen ausgeschlossen. 91 Tiere erhielten embryonale bzw. vordifferenzierte Stammzellen und wurden in die statistischen und histologischen Untersuchungen eingeschlossen. Als Kontrolle erhielten 30 Tiere als Ersatz eine Zellmediumlösung. Diese Gruppe wird im Weiteren als Sham- Gruppe bezeichnet.

Für die Verhaltenstests wurden Tiere berücksichtigt, die mindestens drei Rotationen pro Minute in dem Amphetamin- induzierten Rotationstest nach der Läsionierung zeigten. Dieser Cut- off- Wert zeigte eine ausreichende Läsionierung an. Ergebnisse von insgesamt 91 transplantierten Ratten und von 14 Sham- transplantierten Ratten wurden berücksichtigt



## 4. Resultate

### 4.1 Ergebnisse der histologischen Untersuchungen

Die histologische Untersuchung erfolgte an allen 91 transplantierten Tieren. Jeweils 18 Tiere erhielten Zellen aus der ERAS- und MPI1- Zellpopulation. 20 Tiere wurden OS25- Zellen injiziert. 35 Tiere wurden HT2-Zellen implantiert. Die restlichen 30 Tiere gehörten der Kontrollgruppe an.

Eras	18	19,78
MPI1	18	19,78
OS25	20	21,98
HT2	35	38,46
<b>Summe (absolut/prozentual)</b>	<b>91</b>	<b>100,00</b>

<b>TU = TU+/TU-</b>	<b>47</b>	<b>51,65</b>
<b>TH-</b>	<b>28</b>	<b>30,77</b>
<b>TH+</b>	<b>16</b>	<b>17,58</b>
<b>Summe(absolut/prozentual)</b>	<b>91</b>	<b>100,00</b>

**Abbildung 4 und 5:** Absolute und prozentuale Aufteilung der transplantierten Tiere.

TU = alle tumortragende Transplantate

TU+ = tumortragende Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen

TU- = tumortragende Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

TH+ = tumorfreie Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen

TH- = tumorfreie Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

Der Anteil an Tieren mit tumorverdächtigen Formationen mit oder ohne immunhistologische Färbungen auf Zytokeratin betrug für alle Zellpopulationen 52 %. Fast 31 % hatten tumorfreie Transplantate, in denen histologisch keine

Tyrosinhydroxylaseaktivität nachzuweisen war. In 17,5 % der Fälle war eine immunhistologische Färbung auf Tyrosinhydroxylase zu erkennen und somit der Nachweis von dopaminergen Zellen gegeben.

Im weiteren Verlauf wurde innerhalb der Tumorgruppe der Anteil an Tumoren mit oder ohne Nachweis von Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen bestimmt.

<b>TU+</b>	42	46,15
<b>TU-</b>	5	5,49
<b>TH-</b>	28	30,77
<b>TH+</b>	16	17,58
<b>Summe(absolut/prozentual)</b>	91	100,00

**Abbildung 6:** Absolute und prozentuale Aufteilung der transplantierten Tiere

TU+ = tumortragende Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen

TU- = tumortragende Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

TH+ = tumorfreie Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen

TH- = tumorfreie Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

Ungefähr 46 % der gesamten histologisch ausgewerteten Gehirnschnitte wiesen Tumore auf, die dopaminerge Zellen enthielten. Dagegen wiesen 5,5 % der gesamten Gehirnschnitte Tumore ohne dopaminerge Zellen auf. Der Anteil an Tumoren mit dopaminergen Zellen entspricht in etwa dem dreifachen Anteil von tumorfreien Gehirnproben, die dopaminerge Zellen im Transplantat enthielten.

Innerhalb der Tumorgruppe konnten in 89% der Fälle überlebende dopaminerge Zellen mit Tyrosinhydroxylaseaktivität beobachtet werden. Der restliche Anteil wies keine dopaminergen Zellen nach.

<b>TU+</b>	42	89,36
<b>TU-</b>	5	10,64
<b>Summe(absolut/prozentual)</b>	47	100,00

**Abbildung 7:** Absolute und prozentuale Aufteilung der tumortragenden Tiere.

TU = alle tumortragende Transplantate

TU+ = tumortragende Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen

TU- = tumortragende Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

Im Gegensatz dazu waren innerhalb der tumorfreien Gehirnschnitte weniger häufig dopaminerge Zellen in den Transplantaten als in der Tumorguppe nachzuweisen. Hier erreichten die Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen einen prozentualen Anteil von 36 %.

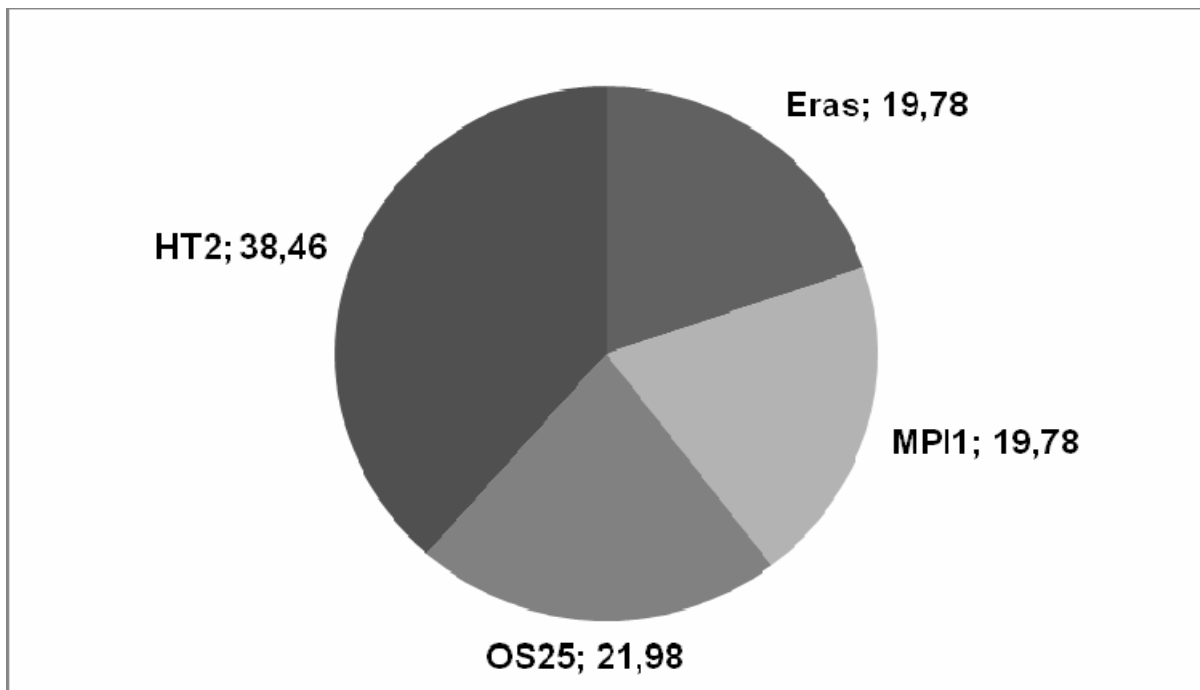
<b>TH+</b>	16	36,36
<b>TH-</b>	28	63,64
<b>Summe(absolut/prozentual)</b>	44	100,00

**Abbildung 8:** Absolute und prozentuale Aufteilung der tumorfreien Tiere.

TH+ = tumorfreie Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen

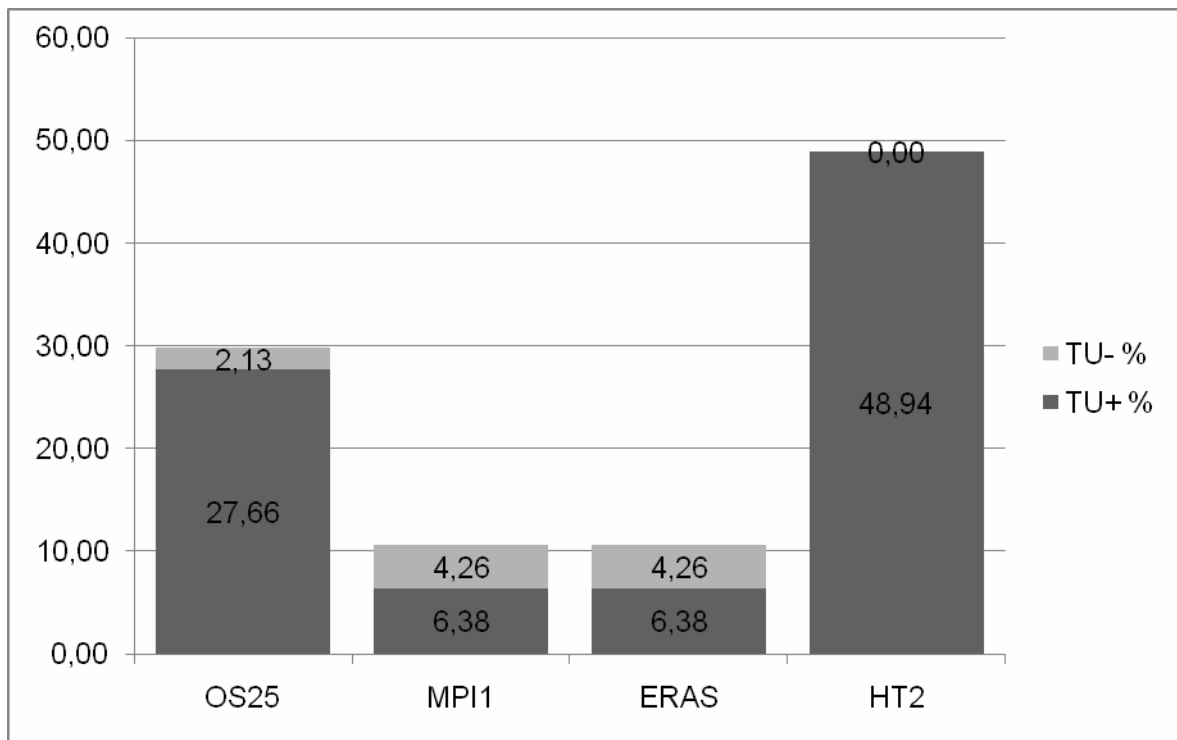
TH- = tumorfreie Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

Es war von Interesse, wie sich das Potenzial zur Tumorbildung innerhalb der einzelnen Zellgruppen verhält. Zum Überblick dient das folgende Kuchendiagramm:



**Abbildung 9:** Prozentuale Verteilung der tumortragenden Tiere hinsichtlich des transplantierten Zelltyps.

Die höchste Rate an Tumorformationen in den Gehirnschnitten war bei den Tiergruppen zu beobachten, die HT2- Zellen erhalten hatten. Fast 40 % aller Tumore wurden durch die HT2 – Zellen getragen. Etwa 22 % der Tumor- positiven Gehirne erhielten Zellen aus der OS25- Zellreihe. Die Zellen aus der ERAS- und MPI1- Population trugen jeweils mit 20 % zu dem gesamten Tumoraufkommen bei.



**Abbildung 10:** Verteilung der tumortragenden Tiere hinsichtlich des transplantierten Zelltyps und des Nachweises von dopaminergen Zellen im Transplantat.

TU+ = tumortragende Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen

TU- = tumortragende Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

Abbildung 10 zeigt die Verteilung der dopaminergen Zellen innerhalb der Tumorgruppen in Beziehung zu den Ursprungszellen, von denen diese Zellen abstammen. Die HT2- Zellen waren in 50 % der Fälle für Tumore mit dopaminergen Zellen in der histologischen Untersuchung verantwortlich, während 28 % aller tumorartigen Läsionen mit dopaminergen Zellenachweis nach einer Transplantation von OS25- Zellen entstanden.

Histologie	TU+		TU-	
	(absolut)	(relativ %)	(absolut)	(relativ %)
<b>OS25</b>	13	30,95	1	20,00
<b>MPI1</b>	3	7,14	2	40,00
<b>ERAS</b>	3	7,14	2	40,00
<b>HT2</b>	23	54,76	0	0,00
<b>Summe</b>	<b>42</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>100</b>

**Abbildung 11:** Verteilung der tumortragenden Tiere mit und ohne dopaminerge Zellen im Transplantat nach Stammzellart sortiert.

TU+ = tumortragende Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen

TU- = tumortragende Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

Betrachtet man die Tumorgruppen mit oder ohne dopaminerge Zellen in der Histologie, so sind fast 31 % der Tumore mit dopaminergen Zellen in den Gehirnschnitten zu finden, die OS25- Zellen erhalten hatten. Im Gegensatz dazu standen 55 % der Tumore mit Nachweis von dopaminergen Zellen im Zusammenhang mit transplantierten HT2- Zellen.

Die bisherigen Aufteilungen erlauben keineswegs eine Aussage zur Tumorigenität der einzelnen Zellpopulationen. Die Ursache liegt an den unterschiedlichen Zahlen von transplantierten und histologisch, untersuchten Tieren für die verschiedenen Zellreihen. Dadurch variiert auch die statistische Wahrscheinlichkeit, dass eine Tumorbildung durch die jeweilige Zellreihe überhaupt entdeckt werden kann. Aus diesem Grund wurde die Tumorbildung innerhalb der einzelnen Zellreihe bewertet.

13 von insgesamt 20 transplantierten Tieren, die OS25- Zellen erhalten hatten, wiesen bei der lichtmikroskopischen Untersuchung eine Tumorbildung und dopaminerge Zellen auf. Ein Tier entwickelte einen Tumor ohne Nachweis von Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen. Mit einem Tumoranteil von 70 % hatten die Zellen aus der OS25- Population die höchste Neigung zur Entwicklung von Tumoren. 65 % der tumortragenden Tiere enthielten zudem dopaminerge Zellen. 20 % der Gehirnschnitte waren tumorfrei. Diese zeigten aber keine dopaminergen Zellen in

den Transplantaten. Dopaminerge Zellen waren in 10 % der tumorfreien Tiere zu finden.

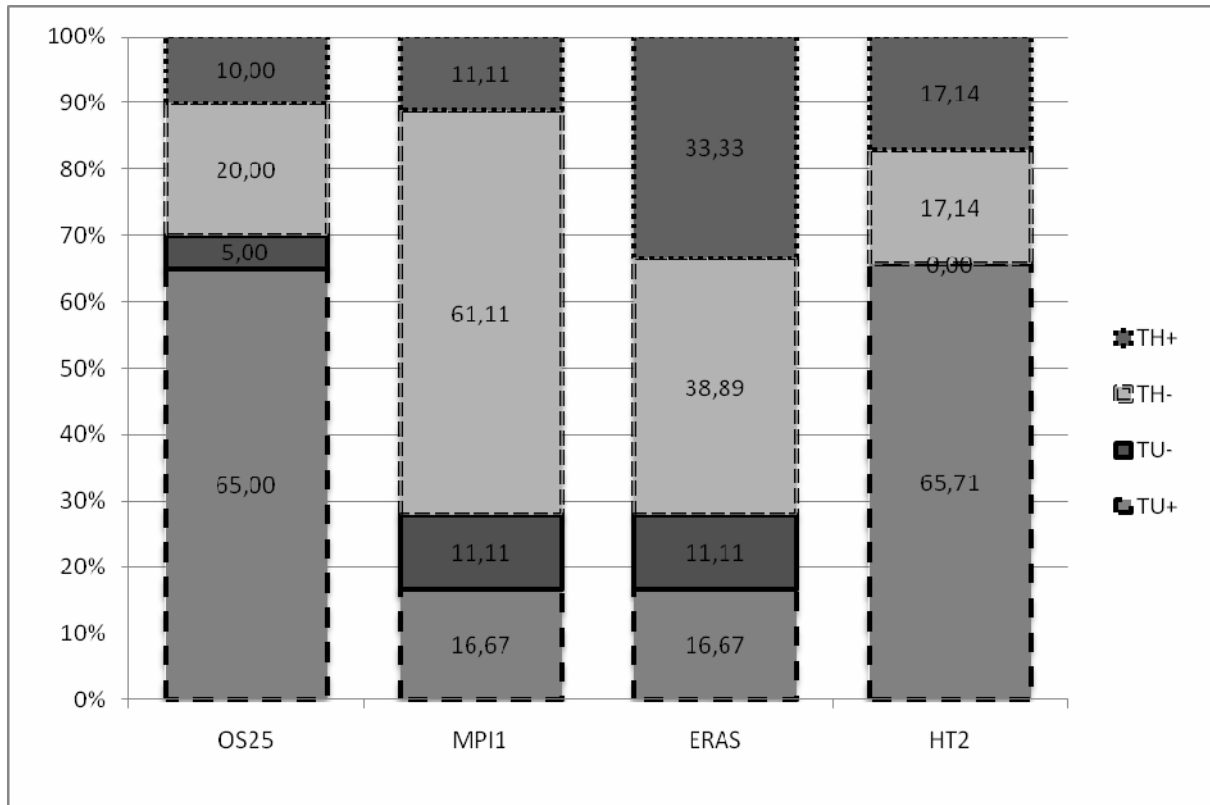


Histologie	TH+		TH-		TU+		TU-		Summe	
	(absolut)	(relativ)	(absolut)	(relativ)	(absolut)	(relativ)	(absolut)	(relativ)	(absolut)	(relativ)
<b>OS25</b>	2	10,00	4	20,00	13	65,00	1	5,00	20	100
<b>MPI1</b>	2	11,11	11	61,11	3	16,67	2	11,11	18	100
<b>ERAS</b>	6	33,33	7	38,89	3	16,67	2	11,11	18	100
<b>HT2</b>	6	17,14	6	17,14	23	65,71	0	0,00	35	100
<b>Summe</b>	<b>16</b>		<b>28</b>		<b>42</b>		<b>5</b>		<b>91</b>	

**Abbildung 12:** Tumorigenität nach Stammzellart sortiert (Tabellarisch).

TU+ = tumortragende Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen; TU- = tumortragende Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen; TH+ = tumorfreie Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen; TH- = tumorfreie Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

In der Tiergruppe mit transplantierten HT2- Zellen waren in den Gehirnschnitten von 23 Tieren (66 %) Tumore mit dopaminergen Zellen nachzuweisen. Jeweils 17 % der Tiere zeigten in der Histologie tumorfreie Transplantate mit und ohne dopaminerge Zellen.



**Abbildung 13:** Tumorigenität nach Stammzellart sortiert (Graphisch).

TU+ = tumortragende Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen; TU- = tumortragende Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen; TH+ = tumorfreie Transplantate mit Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen; TH- = tumorfreie Transplantate ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen

Die Tumorigenität der ERAS- und der MPI- Zellen waren vergleichbar groß. Der Unterschied beider Zellpopulationen liegt in der Fähigkeit zur Bildung von Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen. Die ERAS- Zellen produzierten nach Transplantation in 33 % der Fälle Tyrosinhydroxylase, während der Anteil der Transplantate mit dopaminergen Zellen im Fall der MPI- Zellen nur 11% beträgt. ERAS- Zellen zeigten demnach ein dreifach höheres Potenzial zur Generierung von dopaminergen Zellen als vergleichbare MPI- Zellen.

#### 4.2 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen: Anti- Oct-3/4, Ki-67, Tec-3 und Anti- Zytokeratin (Lu5)

Im Rahmen der histologischen Auswertung wurde einerseits überprüft, ob dopaminerge Zellen nach 5 Wochen die Transplantation überlebt hatten und ob andererseits Anzeichen für eine Tumorbildung zu sehen waren. Die dopaminergen Neurone wurden morphologisch und immunhistochemisch auf Tyrosinhydroxylase untersucht. Die Einschätzung zur Tumorbildung erfolgte anhand der morphologischen Begutachtung der HE- gefärbten Schnitte, sowie nach Färbung mit Antikörpern gegen Zytokeratin, OCT-3/4 und dem Proliferationsmarker Ki- 67 bzw. Tec-3.

Von den 91 untersuchten Tieren wiesen 47 Tiere in den histologischen Schnitten mit oder ohne immunhistochemischen Methoden Formationen im Sinne eines Teratoms auf.

Tumor / HE+	Tumor / HE -	LU5	Oct-3/4	Ki-67	Tec- 3
43	4	41	27	23	2
91,5 %	8,5 %	87,2 %	57,4 %	48,9 %	4,3 %

**Abbildung 14:** Immunhistochemische und histochemische Färbungen. HE+ = Tumormorphologie nach HE- Färbung; HE- = keine Tumormorphologie nach HE- Färbung

Von den 47 Tieren zeigten bereits die HE- gefärbten Gewebsschnitte in 43 Fällen eine Tumorbildung. In 4 Fällen konnte die immunhistochemische Methode eine Tumorbildung aufdecken. Alle 4 tumorhaltigen Gehirnschnitte ohne offensichtliche Tumorformation in den HE- gefärbten Schnitten zeigten insbesondere eine hohe Proliferationsaktivität, die durch den Antikörper gegen Ki-67 nachgewiesen wurde, weshalb hier von hoch mitotisch aktiven Zellen ausgegangen wurde. In dieser Gruppe konnte zusätzlich in einem Fall Zytokeratin als Hinweis auf eine epitheliale Differenzierung nachgewiesen werden. In diesem sowie in einem weiteren Gehirnschnitt eines anderen Tieres zeigte die immunhistochemische Untersuchung

Oct-3/4 nach. Dies spricht für die Existenz von pluripotenten und undifferenzierten Zellen in dem Transplantat.

Nahezu 90 % der tumorhaltigen Gehirnschnitte waren positiv für Zytokeratin. Absolut zeigten 41 histologische Proben immunologisch oder bereits morphologisch epitheliale Strukturen, die für eine Tumorbildung im Sinne eines Teratoms sprechen. In zwei weiteren Fällen war ein Transplantat in den tieferen Schnitten nicht mehr nachweisbar und somit eine immunhistochemische Färbung nicht mehr möglich. Diese beiden wiesen aber schon morphologisch drüsenförmige Epithelstrukturen in den HE- gefärbten Schnitten auf. In einem Fall war die histologische Probe positiv auf Zytokeratin, ohne dass sich eine Tumorbildung in den HE- Schnitten zeigte. Ungefähr die Hälfte der tumorhaltigen Gehirnschnitte wiesen den Pou- Faktor Oct- 3 auf. Zwei Tiere konnten auf Oct-3/4 wegen fehlendem Transplantatnachweis in den tieferen Schnitten nicht untersucht werden. Von den insgesamt 27 Oct-3/4- positiven Schnitten waren in 25 Fällen einerseits bereits morphologisch in den HE- gefärbten Schnitten Tumorstrukturen und andererseits immunhistochemisch, epitheliale Strukturen nachweisbar. Etwa 53 % der tumorhaltigen Strukturen waren somit neben der morphologischen Epithelstruktur positiv auf Zytokeratin und dem Pluripotenzmarker Oct-3/4.

Als weiteren Hinweis auf einen onkogenetischen Prozess wurde die Mitoseaktivität der transplantierten Zellen betrachtet. Hierzu erfolgte die immunhistochemische Färbung auf Ki-67, der als Proliferationsmarker Verwendung findet. Von den 47 Tumortieren wurden 23 Tiere auf Ki-67 untersucht und waren für KI-67 positiv (100 % der auf Ki67 unteruchten Präparate). Bei einem Teil der Präparate, die nicht auf Ki-67 untersucht wurden, wurde eine Färbung auf Tec-3 durchgeführt. Tec-3 stellt spezifisch die Mitoseaktivität von murinen Zellen dar. 17 von den restlichen 24 Tumorschnitten wurden in dieser Weise untersucht. 2 Gehirnschnitte mit morphologisch und immunhistochemisch nachweisbaren, drüsenförmigen Tumoren waren positiv auf Tec-3. Die folgende tabellarische Übersicht fasst die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen der tumortragenden Tiergruppe synoptisch zusammen.

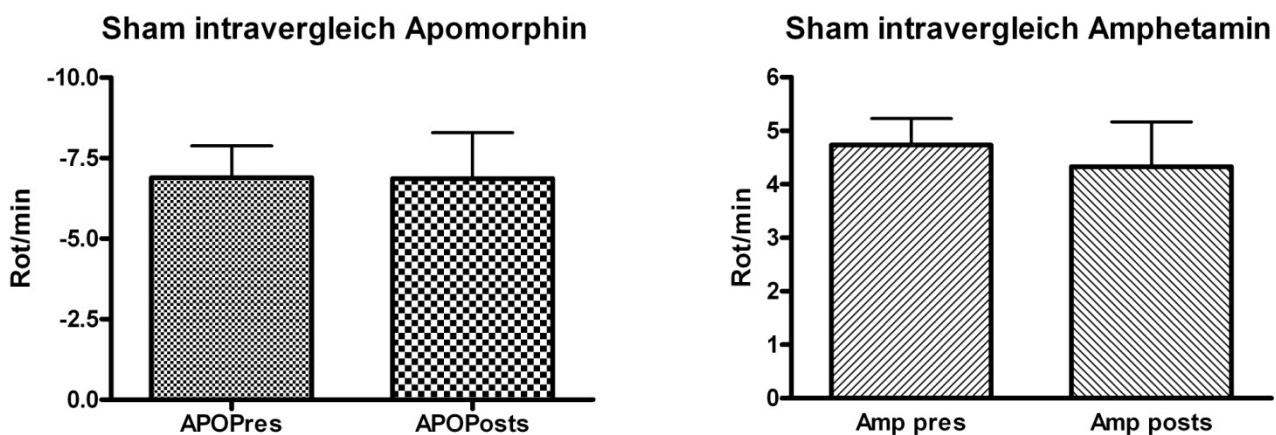
**Abbildung 15:** Tabellarische Übersicht über die histologischen Analysen der tumortragenden Gehirnschnitte.



### 4.3 Ergebnisse der Verhaltensversuche

#### 4.3.1. Analyse der Rotametrie der Kontrollgruppe und Synopsis

Die Gruppe der Kontrolltiere setzte sich aus 30 Tieren zusammen und wurde nach der Läsionierung in gleicher Weise operiert. Im Gegensatz zu den anderen Tieren erhielten die Kontrolltiere eine Injektion einer Zellmediumlösung. 14 der Tiere zeigten ein ausreichendes Rotationsverhalten als Hinweis für eine erfolgreiche Läsion. Wie erwartet zeigen die Kontrolltiere im Falle einer erfolgreichen Läsionierung eine deutliche Rotation nach Amphetamin (Mittelwert: 4,736 +/-1,861) und nach Apomorphin (Mittelwert: -6,891 +/-3,669).



**Abbildung 16 und 17:** Rotametrie nach Apomorphin und Amphetamin in der Sham- transplantierten Tiergruppe (AOPres = Rotametrie vor Sham- OP; AOPosts = Rotametrie nach Sham- OP; Rot/min = Ganze Rotationen pro Minute).

Es war kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe nach Sham- Operation zu erkennen (Amphetamin: 0,4071 CI95% -1.118 to 1.933p= 0,5741 ; Apomorphin - 0,02790 CI95% -2.066 to 2.011; p=0,9769).

Die folgende Synopsis zeigt die Ergebnisse aus den Verhaltensversuchen. Die ersten fünf Spalten der Tabelle beziehen sich auf intraindividuelle Verhaltensveränderungen nach einer Intervention (Transplantation bzw. Sham-Transplantation). Weiter werden funktionelle Unterschiede aufgeführt, die durch eine interindividuelle Analyse der transplantierten Ratten erhoben wurden.

	SHAM	TH -	TH +	TU -	TU +	TH + vs. TU +	TU + vs. TH -	TH + vs. TH -
Rotametrie/Amphetamin	∅	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	∅
Rotametrie/Apomorphin	∅	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	+
Rotarodtest	n.a.	(-)	+	n.a.	(-)	(+)	(-)	(+)
Zylindertest	n.a.	(-)	(+)	n.a.	(-)	(+)	(+)	(+)

#### Abbildung 18: Synopsis

- n. a. = nicht angewendet
- ( ) = nicht signifikant
- + = Besserung
- = Verschlechterung
- ∅ = unverändert

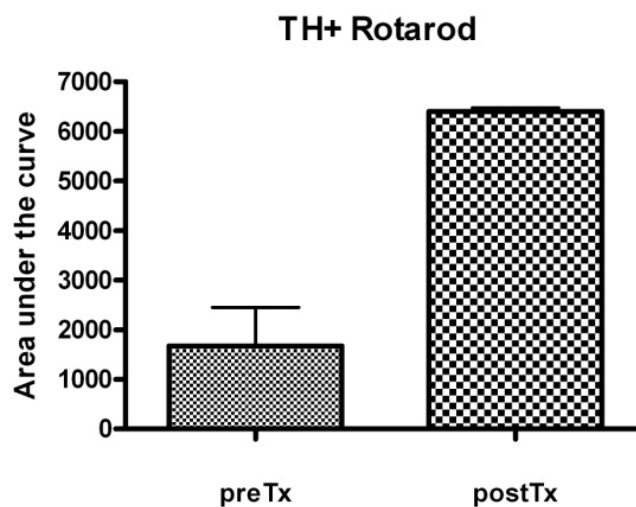
#### 4.3.2. Analyse der tumorfreien Tiergruppe

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse aus den Verhaltenstests mit den tumorfreien Tieren unter Berücksichtigung der histologischen Untersuchung dargestellt. Wie eingangs erwähnt, wurde als Einschlusskriterium eine Rotationanzahl von 3 pro Minute nach Läsionierung im Amphetamintest gefordert. Aus diesem Grund wurden letztendlich von den insgesamt 16 Tieren mit Tyrosinhydroxylase-positiven Transplantaten die Datensätze von 11 Tieren ausgewertet. Die statistische Auswertung der Rotarod- und Zylinderversuche basiert auf Datensätzen von 4 transplantierten Tieren, für die vollständige Daten vorlagen. Von den 28 Tieren mit Tyrosinhydroxylase-negativen Transplantaten wurden nach obigen Kriterien 20 Tiere statistisch weiter ausgewertet. Die Ergebnisse der Rotarod-

und Zylinderversuche basieren innerhalb der Tiergruppe mit Tyrosinhydroxylase-negativen Transplantaten auf Daten von 3 Tieren. Beide Tiergruppen wurden im Rotationstest, Zylindertest und Rotarodtest gegenübergestellt.

Innerhalb der Tiergruppe mit Tyrosinhydroxylase-positiven Transplantaten aber ohne einen lichtmikroskopischen Hinweis auf Tumorformationen konnte im Rotationsversuch nach Amphetamingabe eine Verbesserung nach Transplantation angedeutet werden. Eine signifikante Veränderung des Rotationsverhaltens wurde im intraindividuellen Vergleich aber nicht erreicht (0,1755; CI95%= -1.912 to 2.263;  $p= 0,86$ ).

Passend zeigten die Tiere nach Gabe von Apomorphin eine Abnahme der Rotationen pro Minute. Dieser Unterschied war statistisch aber nicht signifikant (-2,485; CI95%= -5.072 to 0.1008;  $p= 0,0579$ ).



**Abbildung 19:** Rotarodtest in der tumorfreen Tiergruppe mit Nachweis von dopaminergen Zellen (preTx = Rotarodtest vor Transplantation; postTx = Rotarodtest nach Transplantation; TH+ = Tyrosinhydroxylase- positive Transplante)

Der Zylinder – und der Rotarodversuch konnte eine Zunahme der motorischen Leistungsfähigkeit nachweisen. Der Trend im Zylindertest ist nicht signifikant (-0,2300; CI95%= -0.9121 to 0.4521;  $p= 0,36$ ). Dagegen ist im Rotarodversuch (-4735; CI95%= -7183 to -2286;  $p= 0,009$ ) das Ergebnis statistisch hoch signifikant.

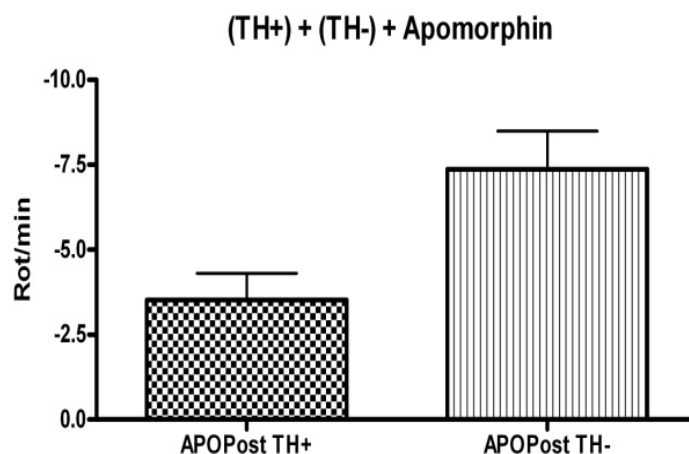


Innerhalb der Tiergruppe ohne dopaminergen Zellen im Transplantat war im Rotationsversuch nach Apomorphin- und Amphetamingabe eine Zunahme des Rotationsverhaltens zu erkennen, die statistisch nicht signifikant war (Amphetamin: -1,642; CI95%= -3.464 to 0.1799; p= 0,075; Apomorphin: 0,7080; CI95%= -0.7726 to 2.189; p= 0,33).

Die tendenzielle Symptomverschlechterung in den Rotationsversuchen innerhalb der Tiergruppe mit Tyrosinhydroxylase- negativen Transplantaten wird von den Ergebnissen aus dem Zylinder- und Rotarodversuch unterstützt. Hier war eine Abnahme der motorischen Leistungsfähigkeit und der spontanen Vorderpfotenaktivität aufgefallen. Die Ergebnisse erreichten keine statistische Signifikanz. (Zylinder: 0,2167; CI95% = -0.1780 to 0.6113; p= 0,14; Rotarod: 429,0; CI95% = -1417 to 2275; p= 0,42).

Im Rotationsversuch nach Amphetamin war kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen mit oder ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen nachzuweisen,

**Abbildung 20:** Rotametrie nach Apomorphin in der tumorfreien Tiergruppe mit und ohne Nachweis von dopaminergen Zellen (APOPost TH+/TH- = Rotametrie nach Transplantation; TH+ = Tyrosinhydroxylase- positive Transplante; TH- = Tyrosinhydroxylase- negative Transplante; Rot/min = Rotationen pro Minute



während nach Gabe von Apomorphin das Rotationsverhalten der Tiere mit dopaminergen Zellen im Transplantat gegenüber den Tieren ohne dopaminerge Zellen signifikant geringer war (Amphetamin:  $-0.03941 \pm 1.816$ ; CI95%= -3.753 to 3.674; p= 0,98; Apomorphin:  $33.843 \pm 1.623$ ; CI95%= 0.5250 to 7.161; p = 0,02).

Die Daten, die aus dem Zylinder- und dem Rotarodversuch gewonnen werden konnten, weisen auf eine Verbesserung der spontanen Vorderpfotenaktivität und der allgemeinen motorischen Leistungsfähigkeit der Tiergruppe mit dopaminergen Zellen im Transplantat im Vergleich zu den Tieren ohne dopaminerge Zellen hin. Diese

Ergebnisse waren allerdings weder im Zylindertest noch im Rotarodversuch signifikant. (Zylinder:  $0.3283 \pm 0.2006$ ; CI95%= -0.1874 to 0.8441;  $p= 0,16$ ; Rotarod:  $359.1 \pm 368.3$ ; CI95%= -587.8 to 1306;  $p= 0,37$ ).

#### **4.3.3. Analyse der tumortragenden Tiergruppe**

Von 47 Tieren, die im histologischen Präparat einen Tumor aufwiesen, zeigten insgesamt 29 Tiere ein ausreichendes Läsionsniveau und wurden in die folgende statistische Auswertung einbezogen. Davon wurden Datensätze aus den Rotarod- und Zylinderversuchen von 13 Tieren berücksichtigt.

In dem Rotametrietest konnte nachgewiesen werden, dass das Rotationsverhalten nach Amphetamin in der Gruppe mit Tyrosinhydroxylase-positiven Transplantaten nicht signifikant zunimmt ( $p=0,75$ ; -0,3200 CI95% -2.385 to 1.745). Das Rotationsverhalten nach Apomorphingabe hatte ebenfalls nicht signifikant nach Transplantation zugenommen ( $0,7272$ ; CI95% -1.406 to 2.861,  $p=0,49$ ).

Die Gruppe der Tiere mit Tumoren aber ohne dopaminerge Zellen im Transplantat zeigten demgegenüber nach Applikation von Amphetamin eine Zunahme der Rotationen pro Minute, während Apomorphin paradoxerweise zu einer Abnahme der Rotationen nach Transplantation führte. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht. (Amphetamin: -3,175 CI95% -9.144 to 2.794;  $p=0,19$ ; Apomorphin: -1,095 CI95% -5.122 to 2.932;  $p=0,45$ ).

Die Ergebnisse aus dem Rotarodversuch zeigten eine tendenzielle Verschlechterung der Tiere mit Tumor und Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen. Auch hier wurde keine Signifikanz erreicht ( $377,1$  CI95% -1026 to 1780;  $p= 0,5688$ ).

Im Zylindertest konnte eine Abnahme der Vorderpfotenaktivität zwischen den läsierten Tieren vor und nach Transplantation gezeigt werden, wenn in dem Transplantat ein Tumor und dopaminerge Zellen nachweisbar waren. Eine Signifikanz wurde nicht erreicht ( $0,1500$ ; CI95%: -0.07700 to 0.3770;  $p= 0,18$ ).

Die Tendenz zur Verschlechterung der motorischen Leistungsfähigkeit im Rotarod- und Zylindertest steht im Einklang mit den Ergebnissen aus den Rotationsversuchen. Der Rotarod- und Zylindertest wurde innerhalb der Tumorgruppe ohne Tyrosinhydroxylase- positive Zellen nicht durchgeführt.

#### 4.3.4. Vergleichende Analyse der tumorfreien und tumortragenden Tiergruppen

Nachfolgend wurden die Ergebnisse der tumorfreien und tumortragenden Gruppen mit dopaminergen Zellen gegenübergestellt.

Nach Transplantation zeigte die Gruppe mit Tumoren ein geringeres Rotationsverhalten nach Amphetamin als die tumorfreie Gruppe, wenn dopaminerge Zellen im Transplantat nachweisbar waren. Dies war nicht signifikant ( $-0.2263 \pm 1.612$ ; CI95%: -3.504 to 3.051;  $p= 0,89$ ). Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe ohne Tumoren nach Apomorphin ein geringeres Rotationsverhalten im Vergleich zu der Gruppe mit Tumoren. Das Ergebnis war nicht signifikant ( $-1.950 \pm 1.482$ ; CI95%: -4.964 to 1.063;  $p= 0,20$ ).

Im Zylindertest war die Gruppe ohne Tumoren der Gruppe mit Tumoren nicht signifikant überlegen ( $-0.2371 \pm 0.1379$ ; CI95%: -0.5294 to 0.05510;  $p= 0,10$ ). Auch im Rotarodversuch deuten die Ergebnisse auf eine bessere Spontanaktivität hin ( $-2112 \pm 1041$ ; CI95%: -4318 to 94.29;  $p= 0,06$ ).

Sowohl im Amphetamin- als auch im Apomorphin- induzierten Rotationstest war das Rotationsverhalten der Gruppe mit Tumoren und dopaminergen Zellen geringer als das Rotationsverhalten der tumorfreien Tiere ohne dopaminerge Zellen. Das Ergebnis war nicht signifikant (Amphetamin:  $-0.2657 \pm 1.230$ ; CI95%: -2.747 to 2.215;  $p= 0,83$ ; Apomorphin:  $1.893 \pm 1.430$ ; CI95%: -0.9928 to 4.779;  $p= 0,19$ ).

Die Gruppe mit Tumoren und dopaminergen Zellen im Transplantat wies im Zylindertest eine höhere Vorderpfotenaktivität auf als die tumorfreien Tiere ohne dopaminerge Zellen. Im Rotarodversuch war allerdings die motorische Leistungsfähigkeit der Gruppe mit Tumoren und dopaminergen Zellen den tumorfreien Tieren ohne dopaminergen Zellen nicht überlegen. In beiden Fällen wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (Zylinder:  $0.1072 \pm 0.1326$ ; CI95%: -0.1773 to 0.3916;  $p= 0,43$ ; Rotarod:  $-1764 \pm 1269$ ; CI95%: -4486 to 956.8;  $p= 0,19$ ).

## **5. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Tumorigenität von ausgewählten murinen Stammzellen und differenzierten murinen Zellen sowie dem funktionellen Effekt der Stammzelltherapie in dem 6-Hydroxydopamin-Parkinsonmodell der Ratte.

### **5.1. Rolle der Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen bei der Frage der Tumorigenität**

Insgesamt zeigten fast 52 % der Transplantate auf den histologischen Gehirnschnitten histochemisch und/oder histoimmunologisch eine unterschiedlich ausgeprägte Tumorbildung. Bei den Tumoren handelte es sich um Teratom-ähnliche Strukturen, die sich von embryonalen Stammzellen ableiten und Ähnlichkeiten mit testikulären und unreifen Teratomen beim Menschen besitzen (Gidekel et al. 2003). Es ist in der einschlägigen Literatur bekannt, dass die Gefahr der Ausbildung von Tumoren nach intrazerebraler Transplantation neben den ethischen Bedenken und dem geringen Wissen über die Anwendung der Stammzellen in verschiedenen Differenzierungsprotokollen einer der Hauptgründe ist, die gegen die klinische Anwendung von differenzierten embryonalen Stammzellen als alternative Therapie bei Patienten mit fortgeschrittenem Parkinson sprechen (Björklund A und Lindvall 2000). Der hohe Anteil an tumorgenerierenden Transplantaten verwunderte insofern, da man von einer Verfeinerung der Differenzierungsmethoden im Vergleich zur Transplantation von reinen undifferenzierten Stammzellen einen gegenteiligen Effekt in Bezug auf die Inzidenz der Tumorbildung sich erhofft hatte. Im Vergleich zeigten Björklund LM et al. (2002), dass reine embryonale Stammzellen ohne vorherige in-vitro-Differenzierung spontan in dopaminerge Neurone differenzieren können, wenn die Stammzellen direkt in das Striatum injiziert werden. Man erklärte sich dieses Phänomen in diesem Fall mit einem inneren Differenzierungsdrang der Stammzellen. Die Arbeitsgruppe beobachtete aber eine Tumorinzidenz von 20 % in der Population, die unter Immunsuppression (Cyclosporin A) standen (Björklund LM et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit war die Tumorinzidenz mehr als doppelt so hoch. Diese Ergebnisse widersprechen der Annahme, dass der Tumorursprung allein in den restlichen undifferenzierten Stammzellen im Transplantat zu sehen ist und dass der Gefahr einer Teratombildung durch in-vitro-Differenzierung effektiv begegnet werden kann. Kim JH et al. postulierten auf Grund ihrer Ergebnisse, dass die Tumorfrequenz unter Immunsuppression durch Vor-Differenzierung der

Stammzellen reduziert werden kann. Die dopaminergen Neurone konnten darüber hinaus im neurotoxischen Parkinsonmodell der Ratte das Amphetamin- induzierte Rotationsverhalten positiv beeinflussen (Kim JH et al. 2002). Ebenfalls zeigte die Gruppe unter Kim JH et al., dass die Transplantation von genetisch manipulierten embryonalen Stammzellen zu keiner Tumorbildung und in den Verhaltenstests zu einer Symptomverbesserung führt (Kim JH et al. 2002). Neurale Vorläuferzellen aus verschiedenen Regionen können durch eine Überexpression von Nurr1 nur einige Eigenschaften von dopaminergen Zellen annehmen. Dabei bleibt allerdings die Tumorbildung nach Transplantation aus. Erkauft wurde diese geringere Tumorigenität mit einer verminderten Funktionalität der Zellen (Kim JY et al. 2003). Zellen aus der SVZ scheinen besser geeignet, die nach Differenzierung eine bessere Funktionalität aufwiesen (Shim et al. 2007). Eine technische Errungenschaft verhalf durch eine Anreicherung von dopaminergen Zellen die Tumorraten entscheidend zu reduzieren (Fukuda et al. 2006; Chung et al. 2006). Hier werden unter Nutzung der FACS- Technologie Zellen aussortiert, die ein grün fluoreszierendes Protein exprimieren. Das entsprechende Gen wird dabei in den Einflussbereich eines Promotors integriert, von dem bekannt ist, von neuronalen Vorläuferzellen exprimiert zu werden. Eine weitere Möglichkeit, die Tumorzinzidenz zu vermindern, besteht in der isolierten Auslösung der Apoptose in nicht- differenzierten Stammzellen, wodurch eine vergleichbare Anreicherung von neuronalen Vorläuferzellen erreicht wird (Bieberich et al. 2004). Somit scheint es wahrscheinlich, dass eine Kontamination der differenzierten Zellpopulation mit „übrigen“ nicht- differenzierten Zellen die Ursache für die Tumorbildung ist. Es soll aber erwähnt werden, dass auch nach Differenzierungen in diesen Fällen durchaus Teratome zu beobachten waren. Eine andere differenzierte Zelllinie bildete intrazerebral ohne Immunsuppression keine Tumore und erzielte eine funktionelle Verbesserung der Ratten. Dagegen wurden Teratom- ähnliche Strukturen bei 2 von 15 Tieren beobachtet, die unter Immunsuppression standen (Baier et al. 2004, Thinyane et al. 2005). Da in der vorliegenden Arbeit die Tiere ohne Unterbrechung nach Transplantation mit Cyclosporin A immunsupprimiert wurden, scheint die Situation hier vergleichbar zu sein und ein Zusammenhang mit der Immunkompetenz der Tiere und der Tumorbildung zu bestehen. Ein Zusammenhang der Tumorzinzidenz mit dem Immunstatus eines Tieres wird durch die Tatsache untermauert, dass eine allogenetische Transplantation höhere Tumorraten als eine xenogenetische

Transplantation aufweist (Erdö et al. 2003). Der Zusammenhang zwischen der Tumorbildung und dem Immunsystem der Wirte wird erst seit kurzem intensiv untersucht. Zurzeit liegen nur wenige Informationen über die Immunantwort des Wirtes nach Transplantation von undifferenzierten und differenzierten Stammzellen vor (Bradley et al. 2002, Drukker und Benvenisty 2004, Grinnemo et al. 2008). Vor kurzem ist es gelungen, im Rahmen von syn-, allo- und xenogenetischen subkutanen Transplantationen erste immunologische Zusammenhänge zwischen der Tumorzinzidenz und einer Immunsuppression zu beschreiben (Dressel et al. 2008). Die Ergebnisse aus den histologischen Untersuchungen an immunkompetenten und immungeschwächten (genetisch und medikamentös) Zellempfängern weisen darauf hin, dass die Teratom- ähnlichen Strukturen ihren Ursprung nicht ausschließlich von den undifferenzierten Zellen nehmen. Es konnte gezeigt werden, dass in den allo- und xenogenetischen Transplantationsversuchen die Teratomzinzidenz insbesondere bei den Tieren signifikant anstieg, die unter einer immunsuppressiven Therapie standen und differenzierte Spenderzellen erhielten. Im Gegensatz dazu war die Tumorzinzidenz unter den Tieren mit undifferenzierten Spenderzellen in etwa vergleichbar zu den immunkompetenten Tieren gewesen. Die Gruppe postulierte als Konsequenz, dass pluripotente Zellen existieren, die zwischen den undifferenzierten und differenzierten neuronalen Zellen stehen. Diese „zwschendifferenzierten“ Zellen besitzen neoplastische Eigenschaften und könnten Ursprung der Teratom- ähnlichen Strukturen sein.

Vor diesem Hintergrund scheint die hohe Tumorzinzidenz in der vorliegenden Arbeit auch erklärbar. Daneben spielen gewiss auch andere Faktoren eine Rolle, die eindeutig Einfluss auf die Tumorigenese nehmen. Dazu zählen die Histokompatibilität und auch die regionalen Einflussfaktoren des Transplantationsortes. So kann die Immunantwort der subkutanen Region nicht mit den immunologischen Gegebenheiten des zentralen Nervensystems verglichen werden, da das Gehirn aufgrund der Blut- Hirn- Schranke immunologische Besonderheiten aufweist. Da aber insbesondere innerhalb der Tiergruppe mit differenzierten Zellen die Tumorigenität am größten war, während die Tumorzinzidenz der undifferenzierten MPI-Zellen eine geringere Tendenz zur Tumorbildung aufwies, kann die Existenz einer hypothetischen pluripotenten, fehdifferenzierten Zelle bekräftigt werden.

Die Tumorigenität der embryonalen Stammzellen (MPI1) war vergleichbar mit den Daten aus der Arbeit von Björklund LM et al. (2002). Etwa ein Drittel aller transplantierten Tiere zeigte tumorartige Läsionen in den Gehirnschnitten. Es konnte keine Reduktion der Tumorigenität der Transplantate nach in- vitro- Differenzierung gezeigt werden. Lediglich die Zellen aus der Eras- Zelllinie haben eine den undifferenzierten embryonalen Zellen vergleichbare Tumorigenität. Überraschend war die hohe Tumorrage innerhalb der Tiergruppe, die differenzierte Zellen von Stammzellen mit einem integrierten, durch Ganciclovir induzierbaren Suizidgen erhielten. Diese erreichten 70 % aller mit diesem Zelltyp transplantierten Tiere, so dass eine zuverlässige Selektion pluripotenter Zellen hierdurch nicht möglich erscheint. Dagegen schienen die Ergebnisse einer in- vitro- Studie von Hara et al. (2008) darauf hinzuweisen, dass undifferenzierte und proliferative Zellen mit dieser Methode eliminiert werden könnten. Im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen war aber die Effizienz, dopaminerge Zellen zu bilden, größer. Von allen transplantierten OS25- Zellen zeigten 75% Tyrosinhydroxylase- positive Zellen. Auch Hara et al. (2008) zeigten, dass ihre Zellen einige robuste neuronale Marker exprimierten. Eine Untersuchung auf Tyrosinhydroxylase erfolgte allerdings nicht, so dass eine Aussage zu dem möglichen Vorliegen von dopaminergen Zellen nicht gemacht werden konnte. Im Vergleich bildeten nur 11 % der Tiere, die undifferenzierte Zellen erhielten, dopaminerge Zellen ohne tumorartige Läsionen im Transplantat aus. Björklund et al. fanden in ihrer Studie bei 56% der transplantierten Tiere überlebende dopaminerge Zellen ohne tumorartige Läsionen in den histologischen Schnitten (Björklund LM et al. 2002).

## **5.2. Der funktionelle Effekt der dopaminergen Transplantate steht unter Einfluss der Tumorigenität**

Maßgeblich für den Erfolg einer Zellersatztherapie scheint, die Fähigkeit der generierten Zellen zu sein, sich in den Zellverband des subkortikalen Netzwerkes einzufügen (Schwartz und Huston 1996; Mine et al. 2009). Histologisch wurden verschiedene morphologische und molekulare Merkmale definiert, die für eine erfolgreiche Integration der Zellen im Situs sprechen. So wurden in der Vergangenheit eine ausgeprägte Faserprojektion der transplantierten Zellen und die Bildung von Synapsen genannt. In den Verhaltenstests zeigten diejenigen Ratten mit qualitativ guter Integration nicht zwingend bessere Ergebnisse als diejenigen, die

weniger Fortsätze in der histologischen Untersuchung aufwiesen. Es scheinen demnach weitere bekannte und unbekannte Faktoren für den Ausgang der Verhaltenstests von Bedeutung zu sein (Baier et al. 2004). Erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse der Verhaltenstests haben intrakranielle Tumore, die nicht zuletzt aufgrund ihres verdrängenden Wachstums und auch anderer nicht bekannter Mechanismen die Funktion und Vitalität der transplantierten Zellen beeinträchtigen könnten. Es ist demnach nicht verwunderlich, dass die Tiere, die intrakranielle Tumore aufwiesen, nicht von der Intervention profitierten. In einigen Verhaltenstests waren höchstens tendenzielle Verbesserungen zu erkennen. Die tumorfreen Tiere zeigten im Vergleich eine Verbesserung im klinischen Verlauf, wenn in den histologischen Schnitten Tyrosinhydroxylase- positive Zellen nachweisbar waren. Im Rotarodtest erreichten die Ergebnisse das Signifikanzniveau. Der Zylindertest und die Rotametrie konnten einen positiven funktionellen Effekt nur andeuten.

### **5.3. Verhalten der tumorfreen Tiergruppe ist abhängig vom Nachweis dopaminerger Zellen**

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Allgemeinmotorik der tumorfreen Tiere mit dopaminerger Zellen im Transplantat im Rotarodtest intraindividuell signifikant zunahm. Der Medikamenten- unabhängige Zylindertest zeigte eine Verbesserung der motorischen Funktion, wenn in der tumorfreen Gruppe dopaminerge Neurone nachweisbar waren. Allerdings waren die Ergebnisse nicht signifikant. In der rotametrischen Testung (Apomorphin und Amphetamin) zeigte sich andeutungsweise eine Abnahme der Rotation.

In der tumorfreen Gruppe ohne dopaminerge Zellen im Transplantat war weder in den Medikamenten- abhängigen noch in den Medikamenten- unabhängigen Verhaltensversuchen ein funktioneller Zugewinn zu sehen.

Im direkten Vergleich der tumorfreen Tiergruppen zeigte sich, dass die Tiere mit dopaminerger Zellen im Transplantat ein signifikant geringeres Rotationsverhalten nach Apomorphin als die Tiere ohne dopaminerge Zellen im Transplantat haben. Passend dazu war die Tiergruppe mit dopaminerger Zellen im Transplantat den Tieren ohne dopaminerge Zellen auch im Rotarod- und Zylindertest überlegen, so dass von einem funktionellen Effekt der dopaminerger Neurone ausgegangen werden kann. Dass im Amphetamin- induzierten Rotametrietest kein Unterschied



zwischen den tumorfreien Tiergruppen gezeigt werden konnte, steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus den Versuchen mit Apomorphin. Hier wurde eigentlich erwartet, dass ebenfalls eine deutliche Abnahme der Rotationen eintritt, da der Amphetamin-induzierte Rotametrietest in der Sensitivität dem Apomorphin-induzierten Rotametrietest überlegen ist (Schwartz und Huston 1996). In Anbetracht der Wirkungsweise der Pharmaka ist aber denkbar, dass die transplantierten Zellen auf das Amphetamin nicht sensibel sind. So muss das Amphetamin unter anderem in der Lage sein, den Neurotransmitter-Wiederaufnahmemechanismus der Zellen zu blockieren und die Dopaminfreisetzung zu stimulieren, um auf indirektem Weg einen Überschuss an Dopamin im Striatum zu bewirken (Kahlig et al. 2005). Ein sich von den nigralen Zellen unterscheidender Wiederaufnahmemechanismus, der andere molekulare Strukturen beinhaltet, wäre auf Amphetamin nicht sensibel. Der Wirkungsmechanismus des Apomorphins basiert dagegen auf die Supersensitivität der striatalen GABA-freisetzenden Neurone und ist nicht von den Wiederaufnahmemechanismen der transplantierten Zellen abhängig. Eine Abnahme der Supersensitivität spricht direkt für einen Ausgleich des Dopamindefizits. Die Zellen waren demnach in der Lage, ausreichend Dopamin freizusetzen, so dass die Supersensitivität der striatalen Neurone abnahm.

#### **5.4. Tumortragende Tiere profitieren funktionell vom Nachweis dopaminergere Zellen**

Wenn es in den histologischen Untersuchungen Hinweise für Tumorbildung und eine Dopaminproduktion gab, so blieb intraindividuell ein funktioneller Effekt aus. Auch im Zylinder- und Rotarodversuch zeigte sich eine Verschlechterung der allgemeinen Motorik.

Des Weiteren wurde gesehen, dass die funktionellen Effekte der dopaminergen Zellen durch eine Tumorbildung negativ beeinflusst wurden. Die tumorfreie Tiergruppe wies im Vergleich zu der tumortragenden Tiergruppe eine geringere Anzahl von Rotationen pro Minute nach Apomorphin auf. Im Falle des Zylindertests war die motorische Allgemeinleistung der tumorfreien Tiere größer als die der tumortragenden Tiere. Gleiches galt im Falle des Rotarodversuches, obwohl hier die Ergebnisse nicht signifikant waren.

Im Vergleich zu den tumorfreien Tieren ohne dopaminerge Zellen war im Apomorphin- induzierten Rotametrietest ein funktioneller Effekt der dopaminergen Zellen in der tumortragenden Tiergruppe zu erkennen. Auch im Zylinder- und Rotarodversuch war die Gesamtperformance der tumortragenden Tiere größer als die Gesamtperformance der Tiere, die im Transplantat weder Tumore noch Dopamin produzierende Zellen aufwiesen.

Zusammenfassend ist ein funktioneller Effekt der dopaminergen Zellen plausibel im Apomorphin- induzierten Rotations-, Zylinder- und Rotarodtest nachzuvollziehen, der durch eine Tumorbildung beeinträchtigt wird. Der funktionelle Zugewinn durch einen Dopaminüberschuss von produzierenden Neuronen wird allerdings nicht vollständig aufgehoben, wenn ein Tumor im Transplantat nachweisbar wird.

### **5.5. Schlussfolgerung und Ausblick**

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Stammzellen sind aufgrund der inakzeptablen Tumorinzidenz hinsichtlich der Etablierung einer sicheren Zellersatztherapie nicht geeignet, auch wenn das Differenzierungspotenzial zu Tyrosinhydroxylase- positiven Zellen zum Teil erfreulich größer ist. Die Ergebnisse der Verhaltensversuche zeigten sich sehr variabel und die Tumorbildung nach Transplantation ließ sich nicht endgültig unterbinden, so dass weitere Anstrengungen zur Verfeinerung der Differenzierungsverfahren und eine Ausweitung der Suche nach geeigneteren Spenderzellen erforderlich werden.

In diesem Sinne konzentrieren sich aktuelle Forschungen auf die Entwicklung von Reprogrammierungsmethoden, die die Umdifferenzierung von adulten Zellen in pluripotenten Stammzellen zum Ziel haben. Diese als induzierte pluripotente Stammzellen bezeichneten Zellen können aus Mausfibroblasten durch retrovirale Überexpression von bestimmten Transkriptionsfaktoren (Takahashi et al. 2006) hergestellt werden. Sie zeigen Potenzial zur Ausbildung von funktionsfähigen und vitalen dopaminergen Zellen, die einen funktionellen Effekt nach Transplantation in einem Parkinsonmodell der Ratte zeigten. Andererseits fand sich ein gewisses Tumorpotenzial (Wernig et al. 2008). Pluripotente Zellen konnten bereits auf diese Weise von Parkinsonpatienten generiert werden (Park IH et al. 2008), die als autologe Stammzellen Probleme der immunologischen Abstoßung und ethische Bedenken überwinden könnten. Erste Transplantationsstudien dahingehend zeigten,

dass prinzipiell dopaminerge Neurone aus induzierten pluripotenten Zellen von Parkinsonpatienten hergestellt werden können und dass sich diese nach Transplantation in einem Parkinsonmodell der Ratte funktionell und morphologisch integrieren können (Hargus et al. 2010).

## **6. Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem Themengebiet der Zellersatztherapie in einem neurotoxischen Parkinsonmodell der Ratte, wobei der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Tumorigenität und der funktionellen Integration der verwendeten Zellen lag. Gentechnisch manipulierte Stammzellen (OS25, Eras) und undifferenzierte Stammzellen zeigten nach striataler Transplantation eine von der Zelllinie abhängige Tumorigenität zwischen 17 und 70 %, welche für eine Suizid-Gen-vermittelte Strategie wider Erwarten am höchsten war, während undifferenzierte Stammzellen eher geringere Tumorraten aufwiesen. Keine der verwendeten Spenderzellen vermochte eine Tumorbildung sicher zu eliminieren. Die Differenzierung in Tyrosinhydroxylase-positive Zellen, was das Vorhandensein von dopaminergen Zellen implizierte, war dagegen trotz hoher Tumorigenität für die gentechnisch manipulierten Stammzellen am stärksten ausgeprägt. Verhaltenstechnische Untersuchungen zeigten einen funktionellen Effekt der dopaminergen Zellen tumorfreier Tiere im Vergleich zu tumorfreien, aber Dopamin-negativen Tieren durch eine signifikante Reduktion der Rotationen im Apomorphin-induzierten Rotationstest nach Transplantation. Tumorfremie Tiere mit dem Nachweis von dopaminergen Zellen wiesen eine signifikante Zunahme der motorischen Leistung im Rotarodversuch nach Transplantation auf.

Die Tumorbildung bei der Zellersatztherapie lässt sich im Parkinsonmodell der Ratte nicht mit den verwendeten Methoden zufriedenstellend reduzieren. Vielmehr lässt der Anstieg der Tumorraten nach Differenzierung der Zellen die weitere Existenz von pluripotenten Zellen vermuten, die im Unterschied zu undifferenzierten Stammzellen eine erhöhte Tumorigenität aufweisen (Dressel et al. 2008). Die Identifizierung dieser neoplastischen Zellen und die weiteren Untersuchungen immunologischer Zusammenhänge müssen Gegenstand zukünftiger Studien sein, um eine sichere Zellersatztherapie mit Stammzellen zu entwickeln, die im klinischen Alltag Anwendung finden kann.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A (2000): Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25, 239- 252
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989): The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12(10), 366-75
- Alexander GE, Crutcher ME (1990): Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13, 281-285
- Alexander GE, Crutcher ME, De long MR (1990): Basal ganglia – thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and limbic functions. *Prog Brain Res* 85, 119- 14
- Andén NE, Dahlström A, Fuxe K, Larsson K (1966): Functional role of the nigro-neostriatal dopamine neurons. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 24(2), 263-74
- Armstrong RJ, Barker RA (2001): Neurodegeneration: a failure of neuroregeneration? *Lancet*, 358(9288), 1174-6
- Baier PC, Schindehütte J, Thinyane K, Flügge G, Fuchs E, Mansouri A, Paulus W, Gruss P, Trenkwalder C (2004): Behavioral changes in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats after transplantation of differentiated mouse embryonic stem cells without morphological integration. *Stem Cells* 22(3), 396-404
- Beal MF (2001): Experimental Models of Parkinson's disease. *Nat Rev* 2, 325-332
- Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F (1995): Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature*, 373(6512), 289-290

- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2002): Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 24, 308- 318
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2005): Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Exp Neurol* 191 Suppl. 1, 17-27
- Bieberich E, Silva J, Wang G, Krishnamurthy K, Condie BG (2004): Selective apoptosis of pluripotent mouse and human stem cells by novel ceramide analogues prevents teratoma formation and enriches for neural precursors in ES cell-derived neural transplants. *J Cell Biol* 167(4), 723-34
- Björklund A, Lindvall O (2000): Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 3(6), 537-44
- Bjorklund LM, Sánchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O (2002): Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci* 99, 2344-2349
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003): Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299(5604), 256-9
- Bradley JA, Bolton EM, Pedersen RA (2002): Stem cell medicine encounters the immune system. *Nat Rev Immunol* 2(11), 859-71
- Brundin P, Strecker RE, Widner H, Clarke DJ, Nilsson OG, Astedt B, Lindvall O, Björklund A (1988): Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Exp Brain Res* 70(1), 192-208
- Caldwell MA, He X, Wilkie N, Pollack S, Marshall G, Wafford KA, Svendsen CN (2001): Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 19(5), 475-9

- Ceballos-Baumann AO: Idiopathisches Parkinsonsyndrom (IPS); in: Berlit Klinische Neurologie. 2. Auflage Springer Medizin Verlag Heidelberg 2006, 852-853
- Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW, Di Monte D (1991): Rapid ATP loss caused by 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J Neurochem* 57, 348- 351
- Chung S, Shin BS, Hedlund E, Pruszek J, Ferree A, Kang UJ, Isacson O, Kim KS (2006): Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation. *J Neurochem* 97(5), 1467-80
- Cohen G, Heikkila RE (1974): The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 249(8), 2447-52
- Comella CL (2003): Sleep disturbances in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 3(2),173-80
- Creese I, Burt DR, Snyder SH (1977): Dopamine receptor binding enhancement accompanies lesion-induced behavioral supersensitivity. *Science* 197(4303), 596-8
- Datla KP, Blunt SB, Dexter DT (2001): Chronic L-DOPA administration is not toxic to the remaining dopaminergic nigrostriatal neurons, but instead may promote their functional recovery, in rats with partial 6-OHDA or FeCl(3) nigrostriatal lesions. *Mov Disord* 16(3), 424-34
- Dauer W, Przedborski S (2003): Parkinson's disease: mechanism and models. *Neuron* 39, 889- 909
- Dawson TM, Dawson VL (2003): Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302, 819- 822
- Day BJ, Patel M, Calavetta L, Chang LY, Stamler JS (1999): A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 12760- 12765

- Deacon T, Dinsmore J, Costantini LC, Ratliff J, Isacson O (1998): Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol* 149(1), 28-41
- DeLong MR (1990): Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 12, 366- 375
- Dewar D, Jenner P, Marsden CD (1983): Lesions of the globus pallidus, entopeduncular nucleus and substantia nigra alter dopamine mediated circling behaviour. *Exp Brain Res* 52, 281-292
- Dezawa M (2008): Systematic neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells: the potential for tissue reconstruction in neurodegenerative and muscle degenerative diseases. *Med Mol Morphol* 41(1), 14-9
- Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C (2004): Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113, 1701–1710
- Di Filippo M, Picconi B, Costa C, Bagetta V, Tantucci M, Parnetti L, Calabresi P (2006): Pathways of neurodegeneration and experimental models of basal ganglia disorders: downstream effects of mitochondrial inhibition. *Eur J Pharmacol* 545(1), 65-72
- Dressel R, Schindehütte J, Kuhlmann T, Elsner L, Novota P, Baier PC, Schillert A, Bickeböller H, Herrmann T, Trenkwalder C, Paulus W, Mansouri A (2008): The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response. *PLoS One* 3(7), e2633
- Drukker M, Benvenisty N (2004): The immunogenicity of human embryonic stem-derived cells. *Trends Biotechnol* 22(3), 136-41
- Ekstrand MI, Terzioglu M, Galter D, Zhu S, Hofstetter C, Lindqvist E, Thams S, Bergstrand A, Hansson FS, Trifunovic A, Hoffer B, Cullheim S, Mohammed AH, Olson L, Larsson NG (2007): Progressive parkinsonism in mice with

respiratory-chain-deficient dopamine neurons. Proc Natl Acad Sci USA 104(4), 1325-30

- Erdö F, Bührle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Föcking M, Küstermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T (2003): Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. J Cereb Blood Flow Metab 23(7), 780-5
- Espino A, Cutillas B, Tortosa A, Ferrer I, Bartrons R, Ambrosio S (1995): Chronic effects of single intrastriatal injections of 6-hydroxydopamine or 1-methyl-4-phenylpyridinium studied by microdialysis in freely moving rats. Brain Res 695(2), 151-7
- Fabre E, Monserrat J, Herrero A, Barja G, Leret ML (1999): Effect of MPTP on brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ATP production and on dopamine and DOPAC in the striatum. J Physiol Biochem 55, 325- 331
- Fahn S, Sulzer D (2004): Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. NeuroRx 1(1), 139-54
- Fearnley JM, Lees AJ (1991): Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. Brain 114, 2283-301
- Findley LJ, Gresty MA: Tremor and rhythmical involuntary movements in Parkinson's disease; in: Capildeo R, Findley LJ: Movement Disorders: Tremors. Oxford University Press New York 1984, 295-304
- Frodl EM, Duan WM, Sauer H, Kupsch A, Brundin P (1994): Human embryonic dopamine neurons xenografted to the rat: effects of cryopreservation and varying regional source of donor cells on transplant survival, morphology and function. Brain Res 647(2), 286-98
- Fukuda H, Takahashi J, Watanabe K, Hayashi H, Morizane A, Koyanagi M, Sasai Y, Hashimoto N (2006): Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. Stem Cells 24(3), 763-71
- Gage FH (2000): Neurogenesis in the adult brain. J Neurosci 22(3), 612-3
- Gage FH (2002): Mammalian neural stem cells. Science 287(5457), 1433-8



- Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F (1996): Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380, 252-5
- Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Klad HD (1991): Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki67. *Am J Pathol* 138(4), 867-73
- Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E (2003): Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 4(5), 361-70
- Giladi N (2001): Gait disturbances in advanced stages of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86, 273-8
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG (1999): Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science* 286(5439), 548-52
- Grinnemo KH, Sylvén C, Hovatta O, Dellgren G, Corbascio M (2008): Immunogenicity of human embryonic stem cells. *Cell Tissue Res* 331(1), 67-78
- Hallett M (2003): Parkinson revisited: pathophysiology of motor signs. *Adv Neurol* 91, 19-28
- Halliday GM, McRitchie DA, Cartwright H, Pamphlett R, Hely MA, Morris JG (1996): Midbrain neuropathology in idiopathic Parkinson's disease and diffuse Lewy body disease. *J Clin Neurosci* 3(1), 52-60
- Haque NS, LeBlanc CJ, Isacson O (1997): Differential dissection of the ratE16 ventral mesencephalon and survival and reinnervation of the 6-OHDA-lesioned striatum by a subset of aldehyde dehydrogenase- positive TH neurons. *Cell Transplant* 6, 239–248
- Hara K, Yasuhara T, Maki M, Matsukawa N, Masuda T, Yu SJ, Ali M, Yu G, Xu L, Kim SU, Hess DC, Borlongan CV (2008): Neural progenitor NT2N cell lines from teratocarcinoma for transplantation therapy in stroke. *Prog Neurobiol* 85(3), 318-34

- Hargus G, Cooper O, Deleidi M, Levy A, Lee K, Marlow E, Yow A, Soldner F, Hockemeyer D, Hallett PJ, Osborn T, Jaenisch R, Isacson O (2010): Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 36, 15921-6
- Hasegawa E, Takeshige K, Oishi T, Murai Y, Minakami S (1990): 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH- dependent superoxide formation and enhances NDH- dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 1049- 1055
- Hasegawa E, Kang D, Sakamoto K, Mitsumoto A, Nagano T, Minakami S, Takeshige K (1997): A dual effect of 1-methyl-4-phenyltetrahydropyridinium (MPP+)- analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 337, 69-74
- Hayflick L (1997): Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62(11), 1180-90
- Hefti F, Melamed E, Sahakian BJ, Wurtman RJ (1980): Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine and DOPA. *Pharmacol Biochem Behav* 12, 185-188
- Henderson JM, Watson S, Halliday GM, Heinemann T, Gerlach M (2003): Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. *Behav Brain Res* 139(1-2), 105-13
- Hitoshi S, Tropepe V, Ekker M, van der Kooy D (2002): Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development* 129(1), 233-44
- Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1993): Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626, 167-174
- Hughes AJ, Daniel SE, Blankson S, Lees AJ (1993): A clinicopathologic study of 100 cases of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 50, 140–8

- Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY (2004): Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 303(5664), 1669-74
- Ichitani Y, Okamura H, Matsumoto Y, Nagatsu I, Iyata Y (1991): Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. *Brain Res* 549(2), 350-3
- Inden M, Kim D, Gu Y, Kitamura Y, Kondo J, Tsuchiya D, Taniguchi T, Shimohama S, Akaike A, Sumi S, Inoue K (2004): Pharmacological characteristics of rotational behavior in hemiparkinsonian rats transplanted with mouse embryonic stem cell-derived neurons. *J Pharmacol Sci* 96(1), 53-64
- Jankovic J: Pathophysiology and clinical assessment of parkinsonian symptoms and signs; in: R Pahwa, KE Lyons, WC Koller: *Handbook of Parkinson's Disease*. Third edition Marcel Dekker New York 2003 71- 106
- Jankovic J (2008): Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79, 368-76
- Jankovic J, Cardoso F, Grossman RG, Hamilton WJ (1995): Outcome after stereotactic thalamotomy for parkinsonian, essential, and other types of tremor. *Neurosurgery* 37(4), 680-7
- Javoy F, Sotelo C, Herbet A, Agid Y (1976): Specificity of dopaminergic neuronal degeneration induced by intracerebral injection of 6 OHDA in the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 102, 210- 215
- Jenner P (1998): Oxidative mechanism in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 13, 24- 34
- Jenner P, Olanow CW (1998): Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44, 72- 84
- Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE (1995): 6- hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: Time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration* 4, 131- 137

- Jiang H, Jackson-Lewis V, Muthane U, Dollison A, Ferreira M, Espinosa A, Parsons B, Przedborski S (1993): Adenosine receptor antagonists potentiate dopamine receptor agonist-induced rotational behaviour in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res* 613, 347-351
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49
- Jonsson G (1980): Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Annu Rev Neurosci* 3, 169-87
- Jonsson G: Chemical lesioning techniques: Monoamine neurotoxins; In: Björklund A, Hökfelt T: *Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol 1. Methods in chemical neuroanatomy*. Elsevier Amsterdam 1983, 463-507
- Kahlig KM, Binda F, Khoshbouei H (2005): Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel". *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (9), 3495–500
- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y (2000): Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28(1), 31-40
- Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R (2002): Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 418(6893), 50-6
- Kim JY, Koh HC, Lee JY, Chang MY, Kim YC, Chung HY, Son H, Lee YS, Studer L, McKay R, Lee SH (2003): Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neural precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* 85(6), 1443-54.
- Kirik D, Rosenblad C, Björklund A (1998): Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Exp Neurol* 152(2), 259-77

- Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. (2000): Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *Eur J Neurosci* 12, 3871–82
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392(6676), 605-8
- Koller WC, Langston JW, Hubble JP, Irwin I, Zack M, Golbe L, Forno L, Ellenberg J, Kurland L, Rutenber AJ (1991): Does a long preclinical period occur in Parkinson's disease? *Neurology* 41 Suppl 2, 8-13
- Krack P, Benazzouz A, Pollak P, Limousin P, Piallat B, Hoffmann D, Xie J, Benabid AL (1998): Treatment of tremor in Parkinson's disease by subthalamic nucleus stimulation. *Mov Disord* 13(6), 907-14
- Kumar R, Agarwal AK, Seth PK (1995): Free radical- generated neurotoxicity of 6- hydroxydopamine. *J Neurochem* 64, 1703- 1707
- Lang AE, Lozano AM. (1998a): Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339(15), 1044-53
- Lang AE, Lozano AM (1998b): Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339(16), 1130-43
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I (1983): Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine- analog synthesis. *Science* 219, 979-980
- Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D (1999): Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after the N-methyl-4-phenyl,1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann Neurol* 46, 598- 605
- Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD (2000): Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18(6), 675-9
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD (1990): CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4), 585-95

- Limousin P, Krack P, Pollak P, Benazzouz A, Ardouin C, Hoffmann D, Benabid AL (1998): Electrical stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 339(16), 1105-11
- Lindvall O, Sawle G, Widner H, Rothwell JC, Björklund A, Brooks D, Brundin P, Frackowiak R, Marsden CD, Odin P (1994): Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol* 35(2), 172-80
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC (1997): Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 48(6), 1583-8
- Lozano AM, Lang AE, Galvez-Jimenez N, Miyasaki J, Duff J, Hutchinson WD, Dostrovsky JO (1995): Effect of GPI pallidotomy on motor function in Parkinson's disease. *Lancet* 346, 1383- 1387
- Luthman J, Fredriksson A, Sundström E, Jonsson G, Archer T (1989): Selective lesion of dopamine or noradrenaline neuron system in the neonatal rat: motor behaviour and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* 33, 267- 277
- Mandel RJ, Rendahl KG, Spratt SK, Snyder RO, Cohen LK, Leff SE (1998): Characterization of intrastriatal recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer of human tyrosine hydroxylase and human GTP-cyclohydrolase I in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 18(11), 4271-84
- Mann VM, Cooper JM, Krige D, Daniel SE, Schapira AH, Marsden CD (1992): Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115, 33-42
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA (2002): The herbicide paraquat causes upregulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha- synuclein. *J Biol Chem* 277, 1641-1644
- Markey SP, Johannessen JN, Chiueh CC, Burns RS, Herkenham MA (1984): Intraneural generation of a pyridinium metabolite may cause drug- induced parkinsonism. *Nature* 311, 464- 467

- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L (2000): Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha- synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 404, 1265- 1269
- Matsuura N, Lie DC, Hoshimaru M, Asahi M, Hojo M, Ishizaki R, Hashimoto N, Noji S, Ohuchi H, Yoshioka H, Gage FH (2001): Sonic hedgehog facilitates dopamine differentiation in the presence of a mesencephalic glial cell line. *J Neurosci* 21(12), 4326-35
- McAuley JH (2003): The physiological basis of clinical deficits in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 69(1), 27-48
- McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA (2002): Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiol Dis* 10, 119- 127
- McGeer EG, McGeer PL: Neurodegeneration and the immune system; in: Calne DB: Neurodegenerative diseases. Saunders Philadelphia 1994, 277-99
- McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG (1988): Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann Neurol* 24, 574-6
- Mezey E, Chandross KJ (2000): Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 405(1-3), 297-302
- Mine Y, Hayashi T, Yamada M, Okano H, Kawase T (2009): Environmental cue-dependent dopaminergic neuronal differentiation and functional effect of grafted neuroepithelial stem cells in parkinsonian brain. *Neurosurg.* 65(4), 741-53
- Morrish PK, Sawle GV, Brooks DJ (1996): An [18F]dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain* 119, 585-91
- Mueller PB (1971): Parkinson's disease: motor-speech behavior in a selected group of patients. *Folia Phoniatr (Basel)* 23(5), 333-46
- Mukhida K, Baghbaderani BA, Hong M, Lewington M, Phillips T, McLeod M, Sen A, Behie LA, Mendez I (2008): Survival, differentiation, and migration of

bioreactor-expanded human neural precursor cells in a model of Parkinson disease in rats. *Neurosurg Focus* 24(3-4), E8

- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964): Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step In Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 239, 2910-7
- Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A (2000): Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 60, 277-90
- Nakao N, Frodl EM, Duan WM, Widner H, Brundin P (1994): Lazaroids improve the survival of grafted rat embryonic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(26), 12408-12
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE (1985): Inhibition of NADH- linked oxidation in brain mitochondria by 1-Methyl-4-phenyl pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl,1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36, 25003-2508
- Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE (1987): MPTP, MPP+ and mitochondrial function. *Life Sci* 40, 721- 729
- Niwa H (2001): Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 26(3), 137-48
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24(4), 372-6
- Obeso JA, Olanow CW, Nutt JG (2000): Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23(10 Suppl.), 2-7
- Olanow CW: A rationale for using dopamine agonists as a primary symptomatic therapy in Parkinson's disease; in: Olanow CW, Obeso JA: Dopamine agonists in early Parkinson's disease. Royal Tunbridge Wells: Wells Medical England 1997, 37-48
- Olanow CW, Obeso JA (2000): Pulsatile stimulation of dopamine receptors and levodopa-induced motor complications in Parkinson's disease: implications for the early use of COMT inhibitors. *Neurology* 55 (11 Suppl. 4), 72-7



- Pahwa R, Wilkinson S, Smith D, Lyons K, Miyawaki E, Koller WC (1997): High-frequency stimulation of the globus pallidus for the treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 49(1), 249-53
- Pal Pramod Kr., Samii Ali, Calne Donald B.: Chapter 6: Cardinal Features of Early Parkinson's Disease in *Parkinson's Disease: Diagnosis and Clinical Management*. Factor SA, Weiner WJ, New York, 2002. Demos Medical Publishing, 41-56
- Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH (2001) Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature* 411(6833), 42-3
- Parent A (2000): Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization *Trends. Neuroscience* 23, 20-27
- Parent A, Sato F, Wu Y, Gauthier J, Lévesque M, Parent M (2000): Organization of the basal ganglia: the importance of axonal collateralization. *Trends Neurosci* 23(10 Suppl), 20-7
- Park CH, Minn YK, Lee JY, Choi DH, Chang MY, Shim JW, Ko JY, Koh HC, Kang MJ, Kang JS, Rhie DJ, Lee YS, Son H, Moon SY, Kim KS, Lee SH (2005): In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *J Neurochem* 92(5), 1265-76
- Park CH, Kang JS, Shin YH, Chang MY, Chung S, Koh HC, Zhu MH, Oh SB, Lee YS, Panagiotakos G, Tabar V, Studer L, Lee SH (2006): Acquisition of in vitro and in vivo functionality of Nurr1-induced dopamine neurons. *FASEB J* 20(14), 2553-5
- Park IH, Arora N, Huo H, Maherli N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ (2008): Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5), 877-86
- Paxinos G and Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press New York 1986
- Péchadre JC, Laroche L, Poirier LJ (1976): Parkinsonian akinesia, rigidity and tremor in the monkey. Histopathological and neuropharmacological study. *J Neurol Sci* 28(2), 147-57

- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276(5321), 2045-7
- Przedborski S, Levivier M, Jiang H, Ferreira M, Jackson-Lewis V, Donaldson D, Togasaki DM (1995): Dose- dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6- hydroxydopamine. *Neuroscience* 67, 631- 647
- Rajput AH, Fenton ME, Birdi S, Macaulay R (1997): Is levodopa toxic to human substantia nigra? *Mov Disord* 12, 634-8
- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S (1992): A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12, 4565-4574
- Rozas G, Guerra MJ, Labandeira-García JL (1997): An automated rotarod method for quantitative drug-free evaluation of overall motor deficits in rat models of parkinsonism. *Brain Res Protoc* 2(1), 75-84
- Sachs C, Jonsson G (1975): Mechanism of action of 6- hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol* 24, 1-8
- Sauer H., Oertel WH (1994): Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6 OHDA: A combined retrograde tracing and immunocytochemical study in rat. *Neuroscience* 59, 401- 415
- Schallert T, Tillerson JL: Intervention strategies for degeneration of dopamine neurons in Parkinsonism: optimizing behavioral assessment of outcome; in: Emerich DF, Dean RLa, Sanberg PR: *Central Nervous System Disease: Innovative Models of CNS Diseases from Molecule to Therapy*. Humana Press Totowa NJ 2000, 131–51
- Scholzen T, Gerdes J (2000): The Ki67 protein: from the known to the unknown. *J Cell Physiol* 182(3), 311-22

- Schwarting RK, Huston JP (1996): The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol* 50(2-3), 275-331
- Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, Azizi SA (1999): Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther* 10(15), 2539-49
- Shim JW, Park CH, Bae YC, Bae JY, Chung S, Chang MY, Koh HC, Lee HS, Hwang SJ, Lee KH, Lee YS, Choi CY, Lee SH (2007): Generation of functional dopamine neurons from neural precursor cells isolated from the subventricular zone and white matter of the adult rat brain using Nurr1 overexpression. *Stem Cells* 25(5), 1252-62
- Smith Y, Kieval JZ (2000): Anatomy of the dopamine system in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 23(10 Suppl), 28-33
- Sotelo C, Javoy F, Agid Y, Glowinski J (1973): Injection of 6-hydroxydopamine in the substantia nigra of the rat. I. Morphological study. *Brain Res* 58(2), 269-90
- Svendsen CN, Caldwell MA (2000): Neural stem cells in the developing central nervous system: implications for cell therapy through transplantation. *Prog Brain Res* 127, 13-34
- Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultured by defined factors. *Cell* 126, 663-676
- Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S (2003): Role of Eras in promoting tumor-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* 423, 541-545
- Talpade DJ, Greene JG, Higgins DS Jr, Greenamyre JT (2000): In vivo labelling of mitochondrial complex 1 (NADH: ubiquinone oxidoreduktase) in rat brain using (3) dihydrorotenone. *J Neurochem* 75, 2611-2621
- Tatton NA, Kish SJ (1997): In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methy-4-phenyl, 1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labeling and acridine orange staining. *Neuroscience* 77, 1037- 1048

- Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N (2003): Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 77, 1037-1048
- Thinyane K, Baier PC, Schindehütte J, Mansouri A, Paulus W, Trenkwalder C, Flügge G, Fuchs E (2005): Fate of pre-differentiated mouse embryonic stem cells transplanted in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats: histological characterization of the grafted cells. *Brain Res* 1045(1-2), 80-7
- Tretiakoff C: Contribution a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Paris Thesis 1919
- Tropepe V, Sibilina M, Ciruna BG, Rossant J, Wagner EF, van der Kooy D (1999): Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol* 208, 166-188
- Ungerstedt U (1968): 6 Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J of Pharmacology* 5, 107- 110
- Ungerstedt U (1971): Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol Scand* 367, 49-68
- Van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Ruegg MA (2000): Neuropathology in mice expressing human alpha- synuclein. *J Neurosci* 20, 6021- 6029
- Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ, Przedborski S (2001): Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl,1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2837- 2842
- Volkmann J (2004): Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Neurophysiol* 21(1), 6-17
- Von Overbeck J, Stähli C, Gudat F, Carmann H, Lautenschlager C, Dürmüller Takacs B, Miggiano V, Staehelin T, Heitz PU (1985): Immunohistochemical characterization of an anti-epithelial monoclonal antibody (mAB lu-5). *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 407(1), 1-12

- Wagner J, Akerud P, Castro DS, Holm PC, Canals JM, Snyder EY, Perlmann T, Arenas E (1999): Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* 17(7), 653-9
- Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry AC, Studer L, Mombaerts P (2001): Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292(5517), 740-3
- Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, Broccoli V, Constantine-Paton M, Isacson O, Jaenisch R (2008): Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(15), 5856-61
- Wichmann T, DeLong MR (1993): Pathophysiology of parkinsonian abnormalities. *Adv Neurol* 60, 53- 61
- Wichmann T., DeLong MR. (1996): Functional and pathophysiological models of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol* 6, 751- 758
- Widner H, Brundin P, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, SawG, Rothwell JC, Marsden CD, Björklund A, et al. (1991): Transplanted allogeneic fetal dopamine neurons survive and improve motor function in idiopathic Parkinson's disease. *Transplant Proc* 23(1 Pt 1), 793-5
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000): Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61, 364–370
- Zietlow R, Pekarik V, Armstrong RJ, Tyers P, Dunnett SB, Rosser AE (2005): The survival of neural precursor cell grafts is influenced by in vitro expansion. *J Anat* 207(3), 227-40

## 8. Anhang

### 8.1 Protokolle zu den histochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen

#### Protokoll der HE- Färbung

- |    |  |
|----|--|
| 1. | 3 x 3 min in Xylol   |
| 2. | je 2 min in absteigender Alkoholreihe bis Wasser                                     |
| 3. | 5 min Hämalaun (Mayer´s Hämalaun Merck, Darmstadt)                                   |
| 4. | Differenzierung in HCl- Alkohol  |
| 5. | 10 min in Leitungswasser bläuen  |
| 6. | 5 min in wässriges Eosin (1% Eosin, angesäuert)                                      |
| 7. | aufsteigende Alkoholreihe bis 100% Alkohol (jeweils 1 min und 2 min in 100% Alkohol) |
| 8. | 3 x 3 min in Xylol   |

## Protokoll der immunhistochemischen Färbung

1. Entparaffinieren (3 x 5 min Xylol > je 3 min in der absteigenden Alkoholreihe > Aqua dest. > gründlich spülen)
2. Demaskierung in der Mikrowelle
3. Spülen mit Aqua dest. und PBS
4. Blockierung der endogenen Peroxidase mit 5 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 45 ml PBS für 10 min
5. Spülen 3-4 x mit PBS
6. 10 % FCS für 10 min (120 ml: Blockieren von unspezifischen Antikörperreaktionen der Primär- AK)
7. Primär- AK in 10 % FCS 24 h inkubieren bei 4°C
8. Spülen mit PBS nach 24 h- Inkubation
9. Sekundär- AK in 10% FCS 60 min inkubieren bei Raumtemperatur
10. Spülen mit PBS nach Inkubation
11. Avidin- Peroxidase 120 µl für 50 min bei Raumtemperatur (1:1000 Verdünnung)
12. Spülen mit PBS
13. Entwickeln mit DAB (25mg/50ml PBS + 20µl 33 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) unter mikroskopischer Kontrolle; bei ausreichender Färbung mit Aqua dest. abspülen.
14. 30 Sekunden mit Hämalaun gegenfärben (kurz differenzieren und unter Leitungswasser für 30 min bläuen)
15. Eindeckeln

## 8.2 Primärantikörper

**TH- AB152  
(1:500; 120 ul)**

Demaskierung in der Mikrowelle: in  
Citratpuffer 4 x 4 min

60 min in 10 % FCS bei  
Raumtemperatur

Sekundärantikörper: Donkey- Anti- Rabbit - AK

**Chemicon/Millipore**

**Konzentration 0.08 mg/mL**

**polyklonaler Antikörper**

**Kaninchen**

**Lu- 5 Panzytokerin**

Sekundärantikörper: Anti - Mouse- AK (biot alpha  
mouse)

Diaminobenzid (50 mg/100 ml) and add 33 µL of  
30% H2O2

**Biocare Medical**

**Konzentration: 10  
mg/ml**

**monoklonaler Antikörper**

**Maus**

**Ki67 - Tec 3  
(1:20 )**

Blockierung der endogenen Peroxidase für  
20 min

Demaskierung in der Mikrowelle: Citratpuffer  
20 min

25 min in 10 % FCS bei  
Raumtemperatur

Sekundärantikörper: Rabbit Anti-  
Mouse - AK

**Dako**

**monoklonaler Antikörper**

**Ratte**

**Oct 3/4  
(1:50)**

Sekundärantikörper: Rabbit Anti- Mouse  
- AK

**BD Bioscience**

**monoklonaler Antikörper**

**Maus**



### 8.3. Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
DAB	3,3' – Diaminobenzidin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal calf serum
GABA	Gamma - aminobutyric acid
GDNF	Glial cell - derived neurotrophic factor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin – Eosin
i.p.	intraperitoneale Injektion
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
L- Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
Lsg.	Lösung
MFB	<i>Medial</i> forebrain bundle
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MPPP	1-Methyl-4-phenyl-4-propion-oxy- piperidin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridin
6- OHDA	6- Hydroxydopamin

PBS	Phosphate buffered saline
Primär- AK	Primärantikörper
s.c.	subkutane Injektion
SNc	Substantia nigra Pars compacta
SVZ	Subventrikuläre Zone
VTA	Ventral tegmental area

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Walter Paulus für die Möglichkeit danken, dass ich in seinem Arbeitskreis diese Dissertation anfertigen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Paul Christian Baier für die kompetente Einweisung in die tierexperimentellen Versuche, Hilfsbereitschaft und Geduld, die er mir, trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung, entgegenbrachte.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Ahmed Mansouri für die professionelle Kooperation und Generierung der Zelltransplantate. Zuletzt möchte ich noch Frau Prof. Dr. med. Tanja Kuhlmann aus dem Institut für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen für die freundliche Unterstützung bei den histopathologischen Untersuchungen danken.