

Aus der Neurochirurgischen Klinik

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. V. Tronnier

Kultivierung und Implantation adulter neuronaler Stammzellen zur  
Wiederherstellung anatomischer und funktioneller  
Projektionssysteme nach 6-OHDA Läsion bei der Ratte

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der  
Universität zu Lübeck

- aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von  
Olaf Backhus

aus  
Hannover

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Tronnier
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christine Klein

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. EINLEITUNG	6
1.1 <i>Stellung und Bedeutung der vorliegenden Arbeit</i>	6
1.2 <i>Die Parkinsonsche Erkrankung</i>	6
1.2.1 Epidemiologie	6
1.2.2 Ätiologie	7
1.2.3 Klinik	9
1.2.4 Diagnose	11
1.2.5 Pathologie	12
1.2.6 Therapie	14
1.2.6.1 medikamentöse Therapie	14
1.2.6.2 operative Therapie	16
1.3 <i>funktionelle Anatomie der Basalganglien</i>	18
1.3.1 Anatomie und Physiologie	18
1.3.2 Pathophysiologie	20
1.4 <i>Das Tiermodell der Parkinson-Erkrankung</i>	21
1.4.1 Die Läsion mit 6-OHDA	21
1.4.2 Molekulare und funktionelle Grundlagen der 6-OHDA-Läsion	22
1.5 <i>Die Transplantation von neuralem Gewebe</i>	23
1.5.1 Transplantation in das Striatum und in die Substantia nigra	24
1.6 <i>Fragestellungen der vorliegenden Arbeit</i>	28
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 <i>Experimentelles Design</i>	29
2.2 <i>Die Läsion mit 6-Hydroxydopamin</i>	30
2.2.1 Narkose	30
2.2.2 Stereotaktische Operation	31
2.2.3 Applikation des Toxins 6-OHDA	31
2.3 <i>Transplantation des adulten neuralen Progenitorzellen</i>	33
2.3.1 Entnahme und Dissektion des Gewebes	33
2.3.2 Aufbereitung der Zellsuspension	33
2.3.3 Mikrotransplantation der Zellsuspension	34
2.4 <i>Analyse des Verhaltens</i>	35
2.4.1 Rotationstest	35
2.4.1.1 Apomorphin-induziert	36
2.4.1.2 Amphetamin-induziert	36
2.4.2 Side Stepping Test	37
2.4.3 Side Falling Test	38
2.4.4 Staircase Test	39

2.5	<i>Histologische Aufbereitung der Gehirne</i>	40
2.5.1	Autoradiographie der Gehirne	40
2.5.2	Immunhistochemische Auswertung des Hirngewebes	41
3.	ERGEBNISSE	43
3.1	<i>Analyse des Verhaltens</i>	43
3.1.1	Rotationsverhalten	43
3.1.2	Side Stepping Test	46
3.1.3	Side Falling Test	50
3.1.4	Staircase Test	54
3.2	<i>Bildanalyse</i>	59
3.2.1	Hellfeldmikroskopie	59
3.2.2	Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie	64
3.2.3	Autoradiographie	67
4.	DISKUSSION	69
4.1	<i>Operationsprotokoll</i>	70
4.1.1	operatives Trauma	70
4.1.2	die Läsion mit 6-OHDA	69
4.1.3	Transplantation der Progenitorzellen	71
4.1.4	Injektionssystem	71
4.1.5	Glaskapillaren	71
4.2	<i>Ist eine Aussage über die Anzahl degenerierter Neurone möglich?</i>	72
4.3	<i>Betrachtung der Implantationslokalisationen</i>	72
4.3.1	intrastriale Transplantation	72
4.3.2	intranigrale Transplantation	76
5.	ZUSAMMENFASSUNG UND BEURTEILUNG	77
6.	LITERATURVERZEICHNIS	79
7.	VERZEICHNIS DER SUBSTANZEN/MATERIALIEN	93
8.	DANKSAGUNG	94
9.	LEBENS LAUF	95

## Abkürzungen und Begriffe

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AP	Anterior-posterior
Apo	Apomorphin
Amph	Amphetamin
β-CIT	β-carboxymethoxy-3-β-(4-iodphenyl)tropan
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BO	Bulbus olfactorius
BrdU	Brom-deoxy-Uridin
Cpu	Caudate-Putamen-unit = Ncl. caudatus und Putamen = Striatum
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DV	Dorso-ventral
EGF	Epithelial growth factor
FB	Fast Blue
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD67	67-kDa Isoform der Glutamatdecarboxylase
GD	Gyrus dentatus
GDNF	Glial derived neurotrophic factor
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GP	Globus pallidus
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
i.p.	Intraperitoneal
KI	Konfidenzintervall
li	Links
ML	Medio-lateral
MFB	Medial forebrain bundle = mediales Vorderhirnbündel
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
Ncl.	Nucleus
OR	Odds Ratio
PD	Parkinson disease
PFA	Paraformaldehyd
Post-Lx	Post laesionem
Post-Tx	Post tranplantationem
Prä-Lx	Prae laesionem
re	Rechts
RMS	Rostral migratory stream
s.c.	Subkutan
SF	Sidfalling (Test)
SMR	Standardisierte Mortalitäts Ratio
SN	Substantia nigra
SNc	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
SS	Sidestepping (Test)
STN	Nucleus subthalamicus
TH	Thyrosinhydroxylase
UPDRS	United Parkinson disease rating scale
VM	Ventrales Mesencephalon
VTA	Ventrales tegmentales Areal

# 1. Einleitung

## 1.1 Stellung und Bedeutung der vorliegenden Arbeit

Das idiopathische Parkinson-Syndrom ist eine der häufigsten degenerativen Erkrankungen. Die Therapie erfolgt bislang symptomatisch und wird überwiegend medikamentös durchgeführt. In den Spätstadien ist sie häufig aber unzureichend. Neue therapeutische Ansätze für diese Krankheitsphasen wurden mit der Gewinnung und Implantation von Stammzellen eröffnet. Ziel dieser Behandlung ist die Substitution dopaminergen Gewebes, um den striatalen Transmittermangel zu beheben bzw. eine Regeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra zu erreichen. Da die Nutzung von foetalem bzw. embryonalem Gewebe ethisch und klinisch problematisch ist, stellt der Einsatz adulter neuronaler Vorläuferzellen eine mögliche Alternative dar. In der vorliegenden Arbeit soll in einem Parkinson-Modell der Ratte untersucht werden, inwiefern diese Zellen in die betroffenen Strukturen Striatum und Substantia nigra integriert werden können, inwieweit sie in dopaminproduzierende Regulationsmechanismen einbezogen werden und ob eine Verbesserung der neurologischen Symptomatik erreicht werden kann, die anhand von Verhaltenstests ermittelt werden soll. Im Folgenden sollen die Grundlagen zur Parkinsonschen Erkrankung und das 6-OHDA-Tiermodell erläutert werden, in deren Kontext sich die experimentellen Ansätze und Fragestellungen bewegen.

## 1.2 Die Parkinsonsche Erkrankung

### 1.2.1 Epidemiologie

Die Erkrankung wurde erstmals 1817 durch James Parkinson als „shaking palsy“ (Schüttellähmung) beschrieben (Parkinson, 1817). Ich beziehe mich in dieser Dissertation auf das sog. Idiopathische Parkinson-Syndrom. Über die Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen/Zeiteinheit) des idiopathischen Parkinson-Syndroms liegen keine einheitlichen Zahlen vor. Häufig können nur von einzelnen Regionen oder kleinen Kohorten Zahlen vorgelegt werden.

In einer Studie aus Nordamerika (Olmsted County/ Minnesota) wurden Parkinsonismuskfälle registriert und aufgearbeitet. Dabei zeigte sich bei 364 Erkrankten in 42 % ein idiopathisches Parkinson-Syndrom. Die durchschnittliche Anzahl der Neuerkrankungen pro Jahr lag bei 10,8/100000 Einwohnern. Die Erkrankungen nahmen im höheren Lebensalter zu (Bower et al., 1999).

Eine zweite Studie aus Finnland, die nahezu gleichzeitig veröffentlicht wurde, gibt für Südwestfinnland eine Inzidenzrate von 14,9/100000/Jahr an. In beiden Studien waren mehr Männer als Frauen betroffen (Kuopio et al., 1999)

Laut WHO waren im Jahr 1990 ca. 4 Mio. Menschen weltweit erkrankt. In Europa sind 1,6 Menschen/ 100 Personen ( $\geq 65$ . Lebensjahr) betroffen, in Amerika und Kanada liegt die Rate höher (3,5 Pat./ 100 Personen). Die Prävalenz (Anzahl der Erkrankungen zu einem bestimmten Zeitpunkt) hat in den letzten 30 Jahren nicht zugenommen (Rozov, 1998; Poock und Hacke, 1998; Driver et al., 2008). Die Häufigkeit der Erkrankung variiert je

nach diagnostischen Kriterien, Studienpopulationen und der epidemiologischen Methoden. Unter diesen Gesichtspunkten ist die Prävalenz des Parkinson Syndroms bei ca. 0,3 Prozent in der Allgemeinbevölkerung anzunehmen. Schätzungsweise ein Prozent der über 60-jährigen leidet an dieser Erkrankung. 15 % der Parkinsonpatienten sind unter 50 Jahre, 10 % der Patienten verteilen sich auf die Altersklassen unterhalb des 40. Lebensjahres (Nussbaum und Ellis, 2003; De Lau und Breteler, 2006).

Die Mortalität (Anteil der Personen einer definierten Population, die in einem bestimmten Zeitraum sterben) lag im Beobachtungszeitraum von 10 Jahren bei 38 %, wie aus einer australischen Studie hervorgeht. Dabei wurde die standardisierte Mortalitäts Ratio (SMR) angewendet, um die Mortalität und die Todesursachen mit der Normalbevölkerung zu vergleichen. Die SMR lag bei 1,58 ( $p < 0,001$ ). Driver et al. zeigten in einer Kohortenstudie 2008, daß nach einem medianen Follow-up von 5,8 Jahren 330 von 560 teilnehmenden Patienten verstorben waren. Die Odds ratio für Mortalität lag bei 2,32 (95% KI 1,85-2,92) unter Beachtung von Rauchen und Alter. Das Mortalitätsrisiko erhöhte sich mit zunehmendem Alter, sogar bei sehr Betagten (OR=2,10, 95% KI 1,44-3,00). Bei Rauchern fand sich kein erhöhtes Mortalitätsrisiko im Zusammenhang mit PD. Es zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer lag bei 9,1 Jahren. Dabei zeigte sich interessanterweise, daß die Mortalität trotz des Einsatzes von L-Dopa und Bromocriptin nicht gesunken ist.

Männer sind häufiger betroffen als Frauen (55 %:45 %) und neuere Studien weisen daraufhin, dass Östrogen möglicherweise neuroprotektiv wirkt (Hely et al., 1999; Driver et al., 2008).

### 1.2.2 Ätiologie

Man unterscheidet verschiedene Formen der Parkinsonerkrankung (Deutsche Gesellschaft für Neurologie/Kompetenznetz Parkinson):

- a) primäres oder idiopathisches Parkinson-Syndrom (= Morbus Parkinson, = IPS)
- b) Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen:
  - Progressive Supranukleäre Blickparese (PSP)
  - Multisystem-Atrophie (MSA)
  - Kortikobasale Degeneration (CBD)
- c) Symptomatische Parkinson-Syndrome:
  - Medikamenten-induziert (Neuroleptika, Antiemetika, Antihypertensiva, Ca-Antagonisten, Lithium, Valproat)
  - vaskulär
  - posttraumatisch (z.B. Boxer)
  - hypoxisch
  - metabolisch (M. Wilson, Hypoparathyreoidismus)
  - toxisch (Mangan, Kohlenmonoxid, MPTP)
  - infektiös (viral, bakteriell, fungal, parasitär)
  - andere (Subakut Sklerosierende Panenzephalitis, Creutzfeldt Jakob Krankheit, M. Whipple, ...)

- d) genetisch-hereditär:
- PARK1: Mutation im  $\alpha$ -Synuclein-Gen (Chromosm 4q21)
  - PARK2: Mutation im Parkin-Gen (Chr.6q25)
  - PARK3: Gen unbekannt (Chr.2p13)
  - PARK4: Mutation im  $\alpha$ -Synuclein-Gen (Chr.4p16)
  - PARK5: UCH-L1 (Chr.4p14)
  - PARK6: PINK1 (Chr.1p35-37)
  - PARK7: DJ-1 (Chr.1p36)
  - PARK8: LRRK2 (Chr.12q2)
  - PARK9: ATP13A2 (Chr.1p36)
  - PARK10: Gen unbek. (Chr.1p32)
  - PARK11: Gen unbek. (2q36-q37)
  - PARK12: Gen unbek. (X)
  - PARK13: HTRA2 (2p13)
  - Not assigned: SNCAIP (Synphilin-1) (5q23.1-q23.3)
  - Not assigned: NR4A2 (NURR1) (2q22-q23)
  - Not assigned: POLG (DANN Polymerase Gamma) (15q25)

Wie oben schon erwähnt, bezieht sich die Arbeit auf die primäre Form, wobei die heute bislang bekannten Ursachen für die anderen Formen der Vollständigkeit halber erwähnt werden sollen.

Die Ursachen, die für die Entstehung der Krankheit verantwortlich sind, sind bis heute weitgehend ungeklärt.

Prinzipiell liegt eine Degeneration der neuromelaninhaltigen Neurone der Pars compacta der Substantia nigra vor, woraus ein striatärer Dopaminmangel resultiert. Man geht davon aus, dass trotz in neuester Zeit aufgetretener Zweifel und begrenzter Untersuchungsmethoden apoptotische Mechanismen den Zelluntergang einleiten. Wie diese Vorgänge eingeleitet werden, bleibt zunächst unklar (s. auch Pathologie). Auch stellt sich die Frage, ob das degenerative Geschehen von der Substantia nigra im Mittelhirn ausgeht oder ob nicht ein retrograder Zelltod stattfindet, wie er im Tiermodell induziert werden kann. Desweiteren wird oxidativer Streß diskutiert, nachdem man bei obduzierten Patienten erhöhte Spiegel an Eisen und verminderte Spiegel an Glutathion gefunden hat (Ichitani et al., 1991; Jenner und Olanow, 1998; Schierle et al., 1999; Tatton et al., 2003). Man rechnet damit, dass die Erkrankung am idiopathischen Parkinson-Syndrom ein multifaktorielles Geschehen ist. Wie oben bereits aufgeführt, kann ein Parkinson-Syndrom iatrogen durch bestimmte Medikamente induziert werden. Dazu gehören z.B. die Neuroleptika wie Phenothiazine (z. B. Thioridazin, Fluphenazin, Promazin) und Butyrophenon-Derivate (Haloperidol, Pimozid). MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin), ein Zusatz von Designerdrogen, führte in den 1970er Jahren zu extrapyramidalmotorischen Störungen vom Bild eines Parkinsonismus und wurde Ende des damaligen Jahrzehnts beschrieben (Davis et al., 1979).

Es konnten Erkenntnisse gewonnen werden, die allgemeine Krankheitsgeschehen (z.B. Entzündungen), aber auch ethnische Besonderheiten, bestimmte berufliche Aspekte und die Lebensführung betreffen.

Eine Rolle wird der Infektion mit Influenza A zugeschrieben, die man zuvor bei Patienten beobachtet hat. Neuroinflammatorische Prozesse werden sowohl als Ursache als auch als Folge zuvor aufgetretener Ereignisse wie z.B. der oxidative Streß in Betracht gezogen (Takahashi und Yamada, 2001; Schapira, 2001; Hunot und Hunot, 2003).

In verschiedenen Regionen dieser Erde weisen manche Ethnien vermehrt Parkinson-Syndrome auf: diese treten im Französischen Teil Westindiens vermutlich aufgrund des Konsums von Tee und Früchten aus der Pflanzenfamilie der Annonaceae gehäuft auf (Lannuzel et al., 2002).

Unter Personen afro-karibischer und indischer Abstammung in England hat man vermehrt parkinsonoide Erkrankungsbilder beobachtet. Schon häufiger wurde das Syndrom beschrieben, welches erstmals Elizan und Mitarbeiter bei den Chamorro-Eingeborenen aus Guam, das zur Inselgruppe von Mikronesien gehört, entdeckt haben (Elizan et al., 1966; Chaudhuri, 2000).

Bestimmte Berufsgruppen wie Farmer/ Landwirte scheinen einem höheren Erkrankungsrisiko ausgesetzt zu sein, wenn sie in Kontakt mit Pesti- und Herbiziden in Kontakt kommen, weiterhin beinhaltet der Umgang mit gewissen Metallen (Mangan, Kupfer, Blei, Quecksilber, Zink, Aluminium) und Chemikalien ein zunehmendes Erkrankungspotential (Gorell et al., 1999; Tanner und Aston, 2000).

### *1.2.3 Klinik*

Ein am Parkinson-Syndrom Erkrankter zeigt schon beim Eintreten in den Raum ein charakteristisches Bild. Schon dieser erste Eindruck kann wichtige Hinweise auf die Erkrankung geben. Das klinische Syndrom ist charakterisiert durch die Kardinalsymptome:

1. Brady-/Akinesie
2. Rigor
3. (Ruhe-) Tremor

Brady-/Akinesie bedeutet die Verlangsamung bzw. völliges Fehlen willkürlicher und unwillkürlicher Motorik. Es ist das Symptom, welches das Vorliegen eines Parkinsonsyndroms überhaupt möglich erscheinen läßt (s. Diagnose). Unter diesem Begriff werden das fehlende Mitschwingen der Arme beim Gehen, reduziertes Blinzeln, verminderte Mimik und Gestik und eine monotone Sprache zusammengefaßt. Der Intellekt ist erst im weiteren Verlauf der Erkrankung betroffen.

Desweiteren treten eine Mikrographie (Verkleinerung des Schriftbildes) und ein bradykinetisches Gangbild hinzu. Die Patienten haben Probleme, Bewegungen zu initiieren und zu stoppen, sie zeigen einen kleinschrittigen Gang und dadurch eine erhöhte Fallneigung. Paradoxe Weise treten auch Bewegungen auf, die eine erhöhte Frequenz und Amplitude zeigen, z.B. kann ein Patient viele Silben bei einem sehr leisen Tonfall äußern.

Die Ursache von Brady-/Akinesie ist noch nicht geklärt. Man vermutet sowohl Probleme beim Initiieren als auch beim Ausführen von Bewegungen. Viele Patienten leiden darunter, Bewegungen nicht sofort willkürlich ausführen zu können, was sich auch elektromyographisch darstellen läßt. Im EMG zeigt sich, daß bei einem regulär triphasisch ablaufenden Bereitschaftspotential der erste Burst vermindert ist. Das allein scheint die Pathophysiologie aber noch nicht zu erklären, denn der Burst kann ansteigen, wenn der Patient eine Bewegung mit höherer Amplitude durchführt. Das Entscheidende ist, daß es eine unangemessene Skalierung der dynamischen Muskelkraft an die Bewegungsparameter gibt. Zusätzlich erschwert wird die Bradykinesie durch Ausführen von gleichzeitigen Bewegungen, durch aufeinanderfolgende Bewegungen oder Wiederholung von Aktionen. Hierbei ist die Rolle des Ncl. pedunculopontinus (PPN) zu erwähnen. Diese Struktur im ponto-mesencephalen Tegmentum enthält einerseits cholinerge und andererseits

anticholinerge Neurone, die eine Signalweiterleitung über GABA und Glutamat steuern. Der PPN steht in enger Verbindung mit den Basalganglien, vornehmlich Gl. pallidus, Substantia nigra pars reticulata und dem Ncl. subthalamicus. Diese Struktur scheint eine wichtige Rolle in der Initiation, Ak- und Dezeleration sowie Terminierung von Bewegungen zu spielen (Lee et al., 2000). Die Struktur erhält GABAerge Fasern aus dem Pallidum sowie hemmende nigrale Fasern, die beim Parkinson-Syndrom zu einer Unteraktivität führen. Als Folge hiervon kommt es zu einem verminderten exzitatorischen Feedback an die Substantia nigra und eine Aggravierung des striatalen Dopamindefizits. Erfolgt eine bilaterale niederfrequente Stimulation z.B. mit 25 Hz, kann eine deutliche Verminderung der motorischen Defizite verzeichnet werden, die sich mit einem erhöhten UPDR-Score stratifizieren läßt (s. auch Operative Therapie) (Schwab et al., 1954; Hallett und Khoshbin, 1980; Evarts et al., 1981; Berardelli et al., 1986; Brown et al., 1993; Agostino et al., 1998).

Das zweite Kardinalsymptom, der Rigor, ist definiert als Steifigkeit der Muskulatur bei passiven Bewegungen durch Erhöhung des Muskeltonus. Der Rigor hat zu dem Begriff des „Zahnrad-Phänomens“ geführt, da im Gegensatz zur Spastik ein kontinuierlicher Widerstand vorliegt, der sich im Lauf der passiven Bewegung nicht verringert und ein ruckartiges Muster vorweist. Auch hier ist die Pathologie noch nicht eindeutig geklärt: man nimmt an, daß Störungen sowohl in spinalen als auch in supraspinalen Reflexbögen vorliegen, in die auch die Basalganglien integriert sind. Erschwerend kommt hinzu, daß eine gestörte Interaktion zwischen der agonistischen und antagonistischen Muskulatur zu der Steifigkeit beiträgt (Johnson et al., 1991; Rotwell et al., 1983; Lee und Tatton, 1975; Tatton und Lee, 1975).

Der Tremor als drittes Charakteristikum ist ein sehr offensichtliches Symptom und neben der Akinesie die zweite Komponente, die zur ursprünglichen Namensgebung der Schüttellähmung beigetragen hatte. Beim idiopathischen Parkinson-Syndrom tritt v.a. der Ruhetremor mit einer Frequenz von 4-6 Hz auf. Weitere Formen wie der posturale oder der Aktionstremor werden aber ebenfalls beobachtet. Die Pathophysiologie ist noch nicht exakt beschrieben. Neuere Studien verweisen darauf, daß abnormale Oszillationen innerhalb der Basalganglienschleifen und Projektionswegen vorliegen. Daß die Ursache auf einer zentralen Störung beruht, wird auch dadurch gestützt, daß neurochirurgische Verfahren in diese Schleifen eingreifen können und durch Tiefenhirnstimulation des Nucleus ventralis intermedius des Thalamus, des Nucleus subthalamicus und des Globus pallidus internus der Tremor deutlich gemindert werden kann (Parkinson, 1817; Koller et al., 1989; Benabid et al. 1991 und 1994, Volkmann et al., 1998; Plenz und Kital, 1999).

Diese als motorische Manifestationen (Brady-/Akinesie, Rigor, Tremor) bezeichneten Kardinalsymptome zeigen sich beim idiopathischen Parkinson-Syndrom in unterschiedlicher Ausprägung. Man differenziert zwischen einem akinetisch-rigiden Typ und einer Tremor-dominanten Form. Diese Kategorisierung ist insofern notwendig, als daß sie sich in ihren Prognosen und Pathologien unterscheiden. Patienten mit dem Tremor-dominanten Typ haben eine bessere Prognose bezüglich der Progredienz als an dem akinetisch-rigiden Typ erkrankte Patienten (Jankovic et al., 1990; Paulus und Jellinger, 1991; Hirsch et al., 1992; Louis et al., 1999; Schrag et al., 2007).

Neben diesen motorischen Charakteristika des idiopathischen Parkinson-Syndroms zeigen sich nichtmotorische Einschränkungen, die im Verlauf der Erkrankung oder als Prodrom auftreten. Dazu zählen Sprachstörungen, Demenz, Depressionen, olfaktorische Störungen (sehr häufig als Frühsymptom), vegetative Störungen wie Obstipation, Harnverhalt oder orthostatische Dysregulationen (Singer et al., 1992; Ponsen et al., 2004; Magerkurth et al., 2005; Henderson et al., 2003).

#### 1.2.4 Diagnose

Die Diagnose „Idiopathisches Parkinson-Syndrom“ (IPS) wird klinisch gestellt. Da die Symptome in den Prodromal- und Frühphasen unspezifisch sein können, muß ein großes Spektrum an Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden.

Durch die Entwicklung bildgebender Verfahren wie Positronenemissions-Tomographie (PET) und Einzelphotonenemissions-Tomographie (SPECT) wurde ein wichtiger Schritt in Richtung Frühdiagnostik bzw. zum Ausschluß anderer Erkrankungen gemacht.

Verschiedene Studien zeigen, daß die richtige Diagnosestellung des IPS zwischen 75 und ca. 90% schwanken kann. Hughes et al. haben 1992 eine Studie mit 100 Erkrankten veröffentlicht, bei der bei 76 % der Patienten die Diagnose IPS korrekt gestellt wurde. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichte die Arbeitsgruppe um C.D. Ward. 2002 haben Hughes et al. eine weitere Studie über die Exaktheit der Diagnosestellung herausgebracht. Dabei hatten von 143 Patienten 73 ein IPS, der positive prädiktive Wert lag bei 98,6 % Prozent und die Sensitivität bei 91,1% (Ward und Gibb, 1990; Rajput et al., 1991; Hughes et al., 1992a,b).

Die häufigsten Differentialdiagnosen, die stattdessen in Betracht gezogen werden mußten, waren der Komplex der Multisystematrophien (MSA), die supranukleäre Blickparese (Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom), die Kortikobasale Degeneration und M. Alzheimer (Colosimo et al., 1995; Albanese et al., 1995; Litvan et al., 1996). Da diese Erkrankungen aber einen anderen Verlauf und vornehmlich andere Therapiemodi haben, ist die genaue Abgrenzung des Idiopathischen Parkinson-Syndroms von den atypischen Formen essentiell. Daher wird die Diagnose anhand von Kategorien und Scores erhoben, in die unterschiedliche Subkategorien integriert sind und auch zur Verlaufskontrolle und zum Staging herangezogen werden können (UPDRS, 5-Punkte-Skala nach Hoehn & Yahr, Hoehn u. Yahr 1967). 1988 wurden daher aufgrund der o.g. Studien, basierend auf der UK Parkinson's Disease Society Brain Bank, Kriterien für die Diagnose Morbus Parkinson formuliert. Einschränkend muß gesagt werden, daß nur der spätere post mortem Nachweis von Lewy Körpern in der Substantia nigra pars compacta die Diagnose verifizieren kann. Die Richtlinien bestimmen auch heute noch das diagnostische Vorgehen und werden heutzutage in drei Sicherheitsstufen eingeteilt:

1. klinisch möglicher M. Parkinson: Vorhandensein von Bradykinesie mit Rigor oder Ruhetremor und keine „atypischen Symptome“ (z.B. fehlende L-Dopa-Responsivität, frühes Auftreten von autonomen Störungen)
2. klinisch wahrscheinlicher M. Parkinson: Symptomatik zusätzlich asymmetrisch ausgeprägt, eine L-Dopa-Gabe führt zu klinischer Verbesserung und im Verlauf von fünf Jahren treten Fluktuationen und Dyskinesien unter L-Dopa auf
3. sicherer M. Parkinson: Kriterien wie bei 2. und autoptische Verifizierung

Desweiteren können einzelne Laboruntersuchungen durchgeführt werden, wie z. B. die Coeruloplasminbestimmung zum Ausschluß eines M. Wilson oder die Neuroleptikaspiegel zum Ausschluß eines medikamententoxischen Parkinsonsyndroms. Ein indikativer biologischer Laborparameter für das IPS existiert nicht (DGN, 2003).

Die konventionelle Computertomographie (CT) und die konventionelle Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen morphologisch und funktionell keine signifikanten Veränderungen, die zur Differentialdiagnose zwischen typischen und atypischen Parkinson-Syndromen beitragen könnten. Sie dienen vielmehr zum Ausschluß eines symptomatischen bzw. atypischen Parkinson-Syndroms. Bei den Multisystematrophien zeigt sich in der CT im fortgeschrittenen Stadium meist nur eine Erweiterung der äußeren Liquorräume, oder es lassen sich Differentialdiagnosen wie ein

Hydrocephalus oder eine Raumforderung ausschließen. In der MRT zeigt sich bei den Multisystematrophien in der T2-Wichtung ein hyperintenser Randsaum und eine Hypointensität im restlichen Putamen (Schrag et al., 1998).

Fortschritte in der Früherkennung erhofft man sich durch weiterentwickelte bildgebende Verfahren wie PET und SPECT oder die Ultraschalluntersuchung des Hirnstamms. Das PET ist der Goldstandard in der Beurteilung, ob die nigrostriatalen Projektionswege und Innervation intakt sind. Es zeigt eine höhere Sensitivität, ist aber teurer und seltener vorhanden als SPECT/MRT. Es zeigt eine Sensitivität in der Detektion von frühen Parkinsonstadien von ca. 85 %. Beim idiopathischen Parkinson-Syndrom zeigt sich eine verminderte Akkumulation des Tracers (18-Fluoro-Dopa) v.a. im kaudalen Putamen und im Ncl. caudatus und es zeigt sich eine negative Korrelation zwischen der Traceraufnahme im Putamen und dem UPDRS (Otsuka et al., 1996; Morrish et al., 1996; Piccini et al., 1997). Die Spezifität des PET liegt bei ca. 70 %: bei den atypischen Parkinsonsyndromen wie MSA oder progressiver supranukleärer Blickparese scheint die Traceranreicherung im Ncl. caudatus stärker beeinträchtigt zu sein als beim IPS. Weiterhin kann man bei den atypischen Syndromen einen signifikanten Dopamin-D2-Rezeptor Verlust visuell darstellen, wohingegen die Rezeptordichte beim idiopathischen Parkinson normal bis hochreguliert erscheint, was als mögliche Antwort auf den fehlenden Transmittermangel zu deuten ist (Leenders et al., 1986; Brooks et al., 1990; Otsuka et al., 1991 und 1992; Landwehrmeyer u. Palacios, 1994; Burn et al., 1994; Antonini et al., 1994; Vogels et al., 2000).

Den häufigsten Tracer, den man bei der SPECT verwendet, ist das 123-I-β-CIT, ein Molekül, welches an den präsynaptischen Dopamin-Transporter bindet. Die SPECT zeigt eine relativ hohe Sensitivität, aber eine relativ geringe Spezifität. Beim IPS und beim Steele-Richardson-Olszewski-Syndrom (supranukleäre Blickparese) können eine Verminderung der präsynaptischen Dopamin-D2-Rezeptoren registriert werden, wohingegen die Dichte der postsynaptischen Dopamin-D2-Rezeptoren zunimmt. Ergänzend dazu kann eine Korrelation zwischen dem putaminalen Tracer-Uptake und dem Schweregrad der Erkrankung hergestellt werden: anhand der 5-Punkte-Skala von Hoehn und Yahr und dem UPDRS scheinen diese beiden Kriterien negativ zueinander korreliert zu sein (Lee et al., 1978; Guttman u. Seeman, 1985; Joyce, 1993; Seibyl et al., 1995; Marek et al., 1996; Schwarz et al., 2000; P.S. Group, 2002).

Eine neue Rolle kommt der transkraniellen Ultraschalldiagnostik zu. Durch den intakten Schädel können Strukturveränderungen durch die Einlagerung echogener Komplexe, vornehmlich Eisen, in die Neurone der Substantia nigra detektiert werden. Für das idiopathische Parkinson Syndrom scheint die Ultraschalldiagnostik spezifischer zu sein, als für genetisch bedingte Formen. In einer prospektiven Studie aus 2008 zeigte sich eine Sensitivität von 90,7% und eine Spezifität von 82,4%. Der positive prädiktive Wert lag bei 92,9%. Somit ergibt sich hieraus eine günstige, nichtinvasive Methode, die in der Frühdiagnostik eine größere Rolle spielen könnte, um so eine gezielte weitere Diagnostik und frühere Therapie einleiten zu können (Berg, 2006; Gaenslen et al., 2008).

### *1.2.5 Pathologie*

Dem idiopathischen Parkinson-Syndrom liegt eine Degeneration der dopaminproduzierenden Neurone in der Substantia nigra pars compacta (SNc) zugrunde. Vermutet hatte das Ende des 19. Jahrhunderts schon der französische Arzt E. Brissaud und betitelte die Erkrankung „maladie de Parkinson“. F.H. Lewy berichtete über intrazytoplasmatische Einschlusskörper, bevor C. Tretiakoff 1919 in seiner Dissertation

diese Strukturen detailliert beschrieb und sie nach ihrem Erstentdecker Lewy-Körper benannte.

Noch ist die Ursache der neuronalen Degeneration ungeklärt. Neueste Erkenntnisse weisen daraufhin, dass die Zellen durch Apoptose untergehen, die vermutlich über das FAS-FADD-Caspasen-BAX-System oder p53-GADPH-BAX-Signalweg eingeleitet wird. Apoptose kann auf zwei unterschiedlichen Wegen induziert werden: dabei initiieren sog. FAS-Liganden den sog. extrinsischen und Proteine aus der bcl-2-Familie den sog. intrinsischen Mechanismus. Der extrinsische Weg führt über Caspasenaktivierung zur Spaltung von Proteinen, wohingegen der intrinsische Pfad die mitochondriale Atmungskette affiziert, indem Cytochrom C aus der Membran in das Cytosol gelangt und dort apoptotische Prozesse induziert (Mochizuki et al., 1996; Anglade et al., 1997a,b; Hirsch et al., 1999).

Noch sind die Zusammenhänge nicht deutlich, aber oxidativer Streß und Schädigung der Mitochondrien in Neuronen werden als weitere Ursachen in Betracht gezogen, verantwortlich für die Degeneration der dopaminergen Zellen zu sein. Überhaupt scheinen die neuronalen Mitochondrien eine Schlüsselrolle einzunehmen: Sauerstoffradikale, die im Rahmen der ATP-Erzeugung zu einem geringen Teil entstehen, führen zu Schädigungen der DNA und damit zu einer Schädigung der Mitochondrien selber. Bei Parkinson-Patienten wurden erhöhte Aktivitätslevel von Superoxid-Dismutase (SOD) und Glutathion-Peroxidase (GPX) nachgewiesen, was als mögliche Reaktion auf vermehrte Sauerstoffradikalen-Produktion zu deuten ist. Diese Enzyme dienen dazu, in Mitochondrien Radikale zu beseitigen (Saggu et al., 1989; Kalra et al., 1992; Damier et al., 1993).

Desweiteren scheint der Komplex I (NADH:Ubiquinon Oxidoreduktase) der mitochondrialen Atmungskette durch genetische und biopathologische Ursachen geschädigt zu werden. Dabei ist zu berücksichtigen, daß diese Veränderungen auch bei den late onset Syndromen auftreten, und somit sporadisch sind und nicht vererbt werden. Dennoch scheint die Elektronentransportkette geschädigt zu sein, was zur Folge hat, dass vermindert Energiesubstrate zur Verfügung stehen und vermehrt Sauerstoffradikale anfallen. Dies kann auch durch Komplex I Inhibitoren wie z. B. Rotenon experimentell veranschaulicht werden. Gleichzeitig können diese Erkenntnisse aber auch Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten sein, wie z. B. die Applikation protektiver Medikamente (Mann et al., 1992; Beal et al., 1993; Blin et al., 1993; Swerdlow et al., 1996; Moon et al., 2005; Testa et al., 2005).

Morphologisch zeigen sich Lewy-Körper als eosinophile Einschlusskörper mit einem Durchmesser von ca. 8-30 µm. Sie befinden sich im Zytoplasma der neuromelaninhaltigen Zellen der SNc, kommen aber auch in anderen Strukturen des zentralen Nervensystems vor, wie z.B. im Locus coeruleus (Forno et al., 1993). Deswegen sind sie nicht pathognomonisch für das Parkinson-Syndrom, weil sie auch beim Morbus Alzheimer, beim Down-Syndrom und bei subakut sklerosierender Panencephalitis nachgewiesen wurden (Gibb et al., 1990; Raghavan et al., 1993; Giasson et al., 2000). Sie enthalten unterschiedliche Proteine wie Neurofilamente, Ubiquitin,  $\alpha$ -Synuclein,  $\alpha$ -Synuclein bindendes Protein Synphilin I und TorsinA. Da Lewy-Körper viele neuronentypische Proteine (Synaptophysin,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein, tau-Protein) nicht enthalten, bleibt ihre Entstehung weiterhin unklar (Lennox et al., 1989; Schmidt et al., 1991; Spillantini et al., 1998).

Neue Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, daß Lewy-Körper Aggresom-ähnliche Strukturen darstellen. Aggresomen entstehen aus Centrosomen, die normalerweise für die Bereitstellung und Organisation der Mikrotubuli während der Zellteilung zuständig sind. Möglicherweise nehmen sie aber auch eine Rolle in der Entsorgung falsch produzierter Proteine ein. Aggresomen enthalten falsch gefaltete und modifizierte Eiweiße, die zum

weiteren Prozessieren vorbereitet wurden. Da Lewy-Körper ebenfalls Heat-Shock-Proteine, Ubiquitin und Ubiquitin-Proteasomen-Systeme enthalten, die bei der Proteolyse involviert sind, sind sie möglicherweise die Folge von gestörter Proteolyse oder einer übermäßigen Produktion von abnormen Proteinen (Lennox et al., 1998; McNaught, 2002 und 2003; Tofaris et al., 2003).

Die menschliche Substantia nigra enthält ca. 550.000 dopaminproduzierende Zellen. Physiologischerweise sterben im Laufe einer Lebensdekade ca. 5% ab. Beim M. Parkinson ist die Degeneration massiv beschleunigt: verschiedene Angaben und Messungen schwanken zwischen 8% und 12,5%/Jahr, d.h. die Todesrate der Zellen ist um das 16-25-fache erhöht (Pakkenberg et al., 1991; Fearnley et al., 1991).

Ab einer Verringerung der dopaminproduzierenden Zellmasse von 50-60 % treten die ersten Symptome auf, dies korreliert mit einem striatalen Transmitterverlust von ca. 80 %. Dieses „Missverhältnis“ zwischen der Anzahl untergegangener Zellen in der SNc und dem überproportionalen Dopaminverlust im Striatum hat zu der Theorie geführt, dass die Zelldegeneration möglicherweise im Striatum beginnt und durch einen retrograden Mechanismus die Schädigung der SNc zur Folge hat. Verschiedene Versuche an Tiermodellen haben diesen Ansatz bestätigt (Riederer und Wuketich, 1976; Fearnley et al., 1991; Ichitani et al., 1998; Foley und Riederer, 1999).

Makro- und mikroskopisch zeigt sich eine Depigmentierung v.a. im ventrolateralen Teil der SNc; bei der physiologischen Degeneration ist hingegen der dorsomediale Teil betroffen. Dadurch ist ein ausschließlicher Alterungsprozeß als Krankheitsursache zu negieren. Sein morphologisches Korrelat findet der Untergang im dorsolateralen Teil des Putamens, das Hauptprojektionsgebiet dieser Neurone.



**Abb. 1 Degeneration der dopaminergen Neurone in der SN.** Im makroskopischen Präparat eines verstorbenen Parkinson-Patienten ist eine deutliche Abblässung der neuromelaninhaltigen Zellen zu erkennen (A', schwarze Pfeile). Mikroskopisch (A'') sind die sog. Lewy bodies (schwarze Pfeile) charakteristisch, eosinophile Einschlußkörper unklarer Genese, die als Reaktion auf Toxine entstehen können oder selbst toxisch sind (A: © by PathoPic).

## 1.2.6 Therapie

### 1.2.6.1 Medikamentös

Die medikamentöse Therapie des Morbus Parkinson stellt bis heute die primäre Behandlungsform dar. Folgende Arzneimittelgruppen kommen zu Einsatz:

- a) *L-3,4-Dihydroxyphenylalanin* (L-DOPA) und *Decarboxylasehemmer* (Carbidopa [Nacom®], Benserazid [Madopar®])
- b) *Dopaminagonisten*: Bromocriptin, Pergolid, Cabergolin, Lisurid, Ropinirol, Pramipexol, Apomorphin, Rotigotin
- c) *Glutamat-Rezeptor Antagonisten*: Amantadin
- d) *Anticholinergika*: Biperiden, Trihexphenidyl, Methixen
- e) *MAO-B-Hemmer*: Selegilin, Rasagilin
- f) *COMT-Hemmer*: Entacapon

L-Dopa wurde Ende der 1960er Jahre entdeckt und stellt bzw. stellt bis heute einen Meilenstein in der medikamentösen Therapie dar. Da Dopamin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, muß es in dieser Vorstufe gegeben werden. Dopamindecarboxylasehemmer verhindern die vorzeitige Decarboxylierung in der Peripherie, vermindern den first-pass-effect und erhöhen die biologische Verfügbarkeit und Halbwertszeit des L-DOPA.

L-DOPA wirkt sehr gut auf die Akinese, gut auf den Rigor, aber reduziert kaum den Tremor. Etwa vom dritten Jahr an (nach Einführung der Applikation bei dem Patienten) können Nebenwirkungen auftreten. Zu diesen Nebenwirkungen zählen Hyper- und Dyskinesien und unwillkürliche Bewegungen der Gesichts-, Hals- und Schultermuskulatur. Diese werden vermutlich durch intra- und interindividuelle Differenzen in der Plasmakonzentration verursacht. Eine Langzeitstudie zeigte, daß 58 % der Patienten mit L-Dopa-Therapie nach einer durchschnittlichen Einnahme von 35 Monaten diese Nebenwirkungen entwickelten. Eine weiterer typischer Nachteil sind sog. „On-Off-Phasen“: die Patienten fallen dabei ein- bis mehrmals täglich in einen akinetischen Zustand (Parkinson Study Group, 2000; Nyholm et al., 2002; McColl et al., 2002).

Da die Pharmakokinetik von L-DOPA nicht vollständig geklärt ist, kam auch die Diskussion unter Fachleuten auf, ob es nicht möglicherweise sogar toxische Eigenschaften besitzt. In verschiedenen in vitro Studien konnte gezeigt werden, daß L-DOPA durch Bildung von Sauerstoffradikalen, die auch in der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung eine große Rolle zu spielen scheinen, dopaminerge Neurone schädigen kann. Ob diese Ergebnisse auch auf in vivo Experimente übertragen werden können ist fraglich, denn dort wurde weder in gesunden noch in Hemiparkinsonmodellen bei Tieren eine exzitotoxische Wirkung festgestellt. Einige Studien weisen auf gegenteilige Effekte hin: L-DOPA könnte eher als Antioxidans und Neuroprotektor agieren (Newcomer et al., 1995a,b; Agid et al., 1998; Murer et al., 1998; Camp et al., 2000; Datla et al. 2001).

Dopaminagonisten wie Bromocriptin, Pergolid, Cabergolin, Lisurid, Ropinirol und Pramipexol, Apomorphin oder Rotigotin stimulieren postsynaptische Dopaminrezeptoren. Wurden diese Wirkstoffe zunächst als adjuvante Medikamente bei der L-DOPA-Therapie eingesetzt, werden sie heute als initiale Therapeutika nach der Diagnosestellung angewandt. In Kombination mit L-DOPA wirken sie gut gegen Akinese und Rigor und schlecht gegen Tremor. Sie können den Einsatz von L-DOPA hinauszögern. Damit können die Spätkomplikationen von L-DOPA zunächst aufgeschoben werden.

Die nächste wichtige Wirkstoffgruppe sind MAO-B- (Selegilin) und COMT-Hemmer (Entacapon). Durch Inhibition der Monoaminoxidase B (MAO-B) und der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) verzögern sie den Abbau von Dopamin im Striatum und erhöhen so dessen Konzentration und Verfügbarkeit. Sie wirken gut gegen die drei Hauptsymptome Tremor, Rigor und Akinesie.

Anticholinergika wie Biperiden, Trihexphenidyl und Methixen spielen nur noch eine untergeordnete Rolle. Sie werden bei unzureichender Tremorbehandlung verabreicht, wenn die L-DOPA-Therapie nicht genügend effektiv ist.

Das Amantadin ist aus der Substanzgruppe der NMDA-Rezeptorantagonisten. Es wirkt als Inhibitor in der Substantia nigra und dient dazu, die Nebenwirkungen der L-DOPA-Therapie zu vermindern. Es lindert akinetische Symptome und den Rigor, nicht aber den Tremor. Es kann die Wirkungen von Anticholinergika verstärken.

Eine neuartige Wirkstoffgruppe stellen die Adenosin-2A-(A2A)-Rezeptor-Antagonisten dar. Weil sie im nichtdopaminergen System ansetzen, bilden sie eine Ausnahme in der Behandlungsstrategie (Augood u. Emson 1994, Dixon et al. 1996).

Die Xanthinderivate KF17837 und KW6002 binden mit großer Affinität an die A2A-Rezeptoren. Diese Verbindungen scheinen die GABAerge Signalübertragung im Striatum zu unterdrücken und im Globus pallidus ext. zu stimulieren. Desweiteren wird eine Interaktion zwischen Dopamin-D2- und Adenosin-2A-Rezeptoren diskutiert. In verschiedenen Tiermodellen mit MPTP oder 6-OHDA lädierten Ratten und Mäusen konnten motorische Einschränkungen, die vorher durch L-DOPA induziert worden waren, vermindert werden. Unwillkürliche Bewegungen wurden nicht dezimiert (Nonaka et al., 1994; Kurokawa et al., 1994; Chen et al., 2001; Shindou et al., 2001; Aoyama et al., 2000; Franco et al., 2000; Lundblad et al., 2003).

Die medikamentöse Therapie spielt weiterhin die wichtigste Rolle in der Behandlung des Morbus Parkinson. Da sie jedoch nur symptomatische Ansätze verfolgt, häufig starke Nebenwirkungen aufzeigt und eine sehr gute Compliance des Patienten erfordern, gilt es, neue Therapieansätze aufzutun.

#### 1.2.6.2 Operative Therapie

Die chirurgischen Verfahren in der Behandlung der Parkinson-Erkrankung werden erst sekundär in Betracht gezogen, wenn die medikamentöse Therapie nicht ausreichend wirksam ist oder aufgrund ihrer Neben- und Wechselwirkungen in den Hintergrund tritt. Durch neue Erkenntnisse in der Anatomie und der Pathophysiologie und durch die Entwicklung neuer stereotaktischer Verfahren haben operative Methoden wieder an Bedeutung hinzugewonnen. Man kann die Techniken in drei Gruppen einteilen:

- a) ablative Verfahren
  - Pallidotomie
  - Thalamotomie
  
- b) Tiefenhirnstimulation
  - Nucleus ventralis intermedius (VIM) des Thalamus
  - Globus pallidus internus
  - Nucleus subthalamicus
  - Nucleus Pedunculopontinus
  
- c) Restorative Verfahren
  - Transplantation von Nervengewebe
  - Transplantation von fetalen und adulten Stammzellen
  - Wachstumsfaktoren

Operationen zur Behandlung der Parkinson'schen Erkrankung wurden schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts durchgeführt. In den 1940er bis 60er Jahren wurden Läsionen in die

Ansa lenticularis, GPi und den Thalamus platziert, um dadurch den Tremor zu verringern. Mit Entdeckung von L-DOPA Ende der 60er Jahre gingen die Operationen stark zurück, wurden in den 1970 und 1980er kaum durchgeführt, um in den 1990er Jahren einen Aufschwung zu erleben, da man Alternativen für die medikamentöse Therapie benötigte (Cooper und Bravo, 1958; Meyers, 1942).

Die unilaterale Thalamotomie hat heutzutage schon wieder an Bedeutung verloren, da sie häufiger Komplikationen wie Hemiparesen, Parästhesien, Dysarthrien u.a. im Vergleich zu den Stimulationsverfahren zur Folge hat. Sie wirkt sehr gut gegen kontralateralen Tremor, mäßig gut gegen Rigor und hat keine Auswirkungen auf die Akinesie.

Die Pallidotomie zeigt positive Effekte auf alle drei Hauptsymptome, wenn die Läsion in den posteroventralen Abschnitt des Globus pallidus internus gesetzt wird. Dabei zeigen ca. 80% der Patienten eine deutliche Verbesserung bei kontralateralen Dyskinesien. Langzeitstudien deuten daraufhin, daß diese Ergebnisse später bestätigt werden konnten. Beide Eingriffe sind mit hohem Risiko von Hämorrhagien und Infarkten verbunden (Laitinen et al., 1992; Baron et al., 1996; Fine et al., 2000).

Die Tiefenhirnstimulation (deep brain stimulation = DBS) wurde erstmals 1987 vorgestellt. Dabei wird eine Elektrode stereotaktisch in der Zielstruktur platziert. Es folgt eine intraoperative Testreizung mit einer Frequenz von über 100 Hertz (Hz). In einem zweiten Eingriff wird oder werden die Elektrode(n) an einen subkutanen Impulsgeber angeschlossen. Man vermutete, daß hierdurch das physiologische Entladungsmuster der Zielzellen direkt oder durch Freisetzung von inhibitorischen Neurotransmittern gehemmt wird. Führt man die Elektrode in den Nucleus ventralis intermedius (VIM) des Thalamus, läßt sich damit sehr gut der kontralaterale Tremor beherrschen. Die Rigidität und Akinesie lassen sich mit dieser Methode nicht behandeln (Benabid et al., 1987 u. 1996; Koller et al., 1997; Benazzouz und Hallett, 2000; Stefani et al., 2007; Herzog et al., 2008).

Stimuliert man den Nucleus subthalamicus oder den Globus pallidus internus auf diese Weise, lassen sich offensichtlich alle motorischen Hauptsymptome (Tremor, Rigor, Akinesie) positiv beeinflussen. Die Patienten zeigten Verbesserungen im motorischen Teil der UPDRS im Medikamenten- „ON“ als auch in den Phasen ohne Medikation („OFF“-Phasen). Relativ neu ist die Stimulation im Nucleus pedunculopontinus allein oder in Kombination mit einer Stimulation beispielsweise im Nucleus subthalamicus zur Behandlung der Lokomotion und posturalen Instabilität.

Ein Vorteil, den die Tiefenhirnstimulation gegenüber den ablativen Verfahren hat, ist, daß dieses Verfahren reversibel ist, weil es keine Zerstörung von Hirnarealen zur Folge hat. Komplikationen können durch den operativen Eingriff an sich entstehen. Dabei ist als schwerwiegendste Komplikation vor allem die Hirnblutung mit einem Risiko von ca. 2-4% zu nennen. Durch die Stimulation können ebenfalls Nebenwirkungen auftreten, die sich aber durch korrekte Einstellung des Impulsgebers in der Regel gut beheben lassen. Nachteile dieses Verfahrens sind relativ hohe Kosten, die Notwendigkeit, einen Batteriewechsel alle zwei bis fünf Jahre durchführen zu müssen und eine weiterhin nur symptomatische Therapie der Erkrankung (Limousin et al., 1995; Kumar et al., 1998; P.S. Group 2001). Neuerdings werden wiederaufladbare Impulsgeneratoren angeboten, die das Austauschintervall auf ca. 8-10 Jahre, abhängig vom Stromverbrauch, verlängern.

Eine Therapieoption mit kurativem Ansatz wurde erstmals aufgetan, als verschiedene Arbeitsgruppen begannen, fetales nigrales oder mesenzephales Gewebe zu implantieren (s. auch Abschn. Tiermodell), um die degenerierten Neurone bzw. den Transmittermangel zu kompensieren. Da im Tiermodell gute Ergebnisse erzielt wurden, hat man dieses Verfahren zur klinischen Anwendung gebracht. Man hat dabei fetales mesenzephales Gewebe in das postkommissurale Putamen und in die Substantia nigra implantiert, in der Hoffnung, daß sich die implantierten Zellen in die Umgebung integrieren und Dopamin produzieren.

Klinische Verbesserungen traten nach sechs bis 12 Wochen auf und persistierten für mindestens sechs Jahre.

Sowohl als adjuvante als auch als solitäre Therapie sind Wachstumsfaktoren in Betracht zu ziehen, vor allem der so genannte glial derived neurotrophic factor (GDNF). Dieser kann direkt oder über einen viralen Vektor in das Striatum eingebracht werden und soll dort protektiv bzw. restorativ auf dopaminerge Neurone wirken (Lindvall et al., 1990; Peschanski et al., 1994; Freeman et al., 1995; Wenning et al., 1997; Hauser et al., 1999; Kordower et al., 2000).

Adulte neuronale Stammzellen und die Einschleusung retroviraler Vektoren zeigen die neuesten Entwicklungen auf, die auf dem Gebiet der operativen Therapie gemacht wurden. Für das Thema „adulte neuronale Stammzellen“ wird auf den Abschnitt „Tiermodell“ hingewiesen.

### **1.3 Funktionelle Anatomie der Basalganglien**

#### *1.3.1 Anatomie und Physiologie*

Um die Parkinson-Erkrankung zu verstehen, ist es wichtig, die anatomischen und physiologischen Komplexe zu verdeutlichen. Im folgenden Abschnitt soll daher ein Überblick über alle relevanten Strukturen gezeigt werden, die bei einem Parkinson-Patienten betroffen sind.

Die Basalganglien gehören zum extrapyramidal-motorischen System und liegen subkortikal im Marklager des Großhirns. Zu den manchmal auch als Stammganglien zusammengefassten Strukturen gehören:

- Striatum (= Ncl. Caudatus und Putamen)
- Globus Pallidus internus und externus (GPe [GP bei der Ratte] und GPi [Ncl. entopeduncularis bei der Ratte])
- Ncl. Subthalamicus (STN)
- Substantia nigra (pars compacta SNc und pars reticularis SNr)

Histogenetisch ist das Striatum und ein Teil des Globus pallidus ext. dem Telencephalon zuzurechnen, wohingegen ein Segment des GPe, der GPi, das Pallidum, der Thalamus und der Ncl. subthalamicus dem Diencephalon zuzuordnen sind.

Die Substantia nigra befindet sich im Mittelhirn. Sie ist über das nigrostriatale Fasersystem mit dem Striatum verschaltet. Desweiteren weisen die Zellen der Substantia nigra und des GPi in Zytologie, Verschaltung und Funktion starke Ähnlichkeiten auf.

Die Funktion der Basalganglien liegt in der Modulation und Integration von Bewegungsabläufen der Extremitäten, der Blick- und Augenbewegungen und der Kognition. Viele Abläufe laufen unbewußt ab, wie zum Beispiel der Wechsel von An- und Entspannung von Muskeln beim Gehen. Über einen Kreislauf werden Informationen aus der Großhirnrinde über die Basalganglien und den Thalamus zurück an motorische Zentren

des Großhirns geleitet. Über diese Schleife greift das extrapyramidal-motorische System in die Willkürmotorik ein.

Das Striatum ist die wichtigste Inputstation und erhält seine Afferenzen aus dem ipsilateralen Cortex, v.a. aus motorischen und sensorischen Arealen, dem präfrontalen Assoziationskortex, und dem Thalamus, die als Transmitter Glutamat verstoffwechseln. Desweiteren ziehen über das nigrostriatale Bündel Fasern aus der Substantia nigra in das Striatum. Hier wird Dopamin als Transmitter verwendet. Zum Teil sind acetylcholinerge Zwischenneurone zwischen die afferenten nigralen und efferenten striatalen Neurone geschaltet, so daß die SN teilweise indirekt hemmend auf die Efferenzen des Striatums wirkt, indem sie die Zwischenneurone inhibiert.

Abgehende Neuronenfasern des Ncl. caudatus und des Putamens ziehen nun zum GPi und SNr. Dies geschieht über einen direkten und einen indirekten Weg, bei dem der Globus pallidus ext. und der Ncl. subthalamicus integriert sind. Alle Neurone benutzen GABA als Haupttransmitter, desweiteren spielen aber auch Enkephalin, Dynorphin und Substanz P eine Rolle. Eine Ausnahme bildet der STN, dessen Neurone ihre Signale über das exzitatorische Glutamat weiterleiten.

Die Substantia nigra ist in drei Kompartimente unterteilt: die Pars compacta, Pars reticulata, und die Pars lateralis. Afferenzen kommen überwiegend aus dem Striatum. Desweiteren ziehen Fasern von der Großhirnrinde (aus Areae 4, 6, 9-12) zu diesen Strukturen. Efferenzen entsendet die SN aus den Kompartimenten v.a. in das Striatum, aber auch zum Pallidum und zum STN. Dabei vermutet man eine topische Aufgliederung: dorsale und ventrale Anteile der SNc projizieren jeweils ins dorsale und ventrale Caudatoputamen. Die SNr gibt Informationen an den Ncl. ventralis lateralis des Thalamus und an den Colliculus sup. weiter.

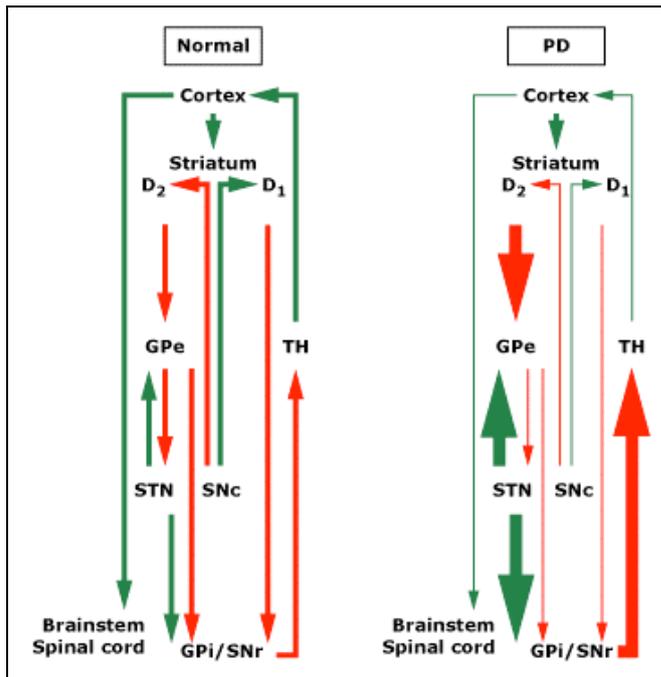
Die Fasern aus dem Striatum nutzen GABA und wirken auf die Neurone der SN inhibitorisch. Die Axone der Efferenzen aus der SN transportieren Dopamin in ihren Terminalen ins Striatum, wo es an die Dopamin-Rezeptoren bindet. Je nach Rezeptorsubtyp wirkt es dann exzitatorisch (D1-Rez.) bzw. inhibitorisch (D2-Rez.).

Auch zwischen den Anteilen der SN finden Interaktionen statt: dabei scheinen die GABAergen Neurone der SNr ebenfalls inhibitorisch auf die Neurone der SNc zu wirken.

Als Relaisstation leiten der GPi und die SNr die empfangenen Informationen nun zum einen an die Pars compacta der Substantia nigra weiter. Zum anderen gelangen Signale von hier aus zum Ncl. ventralis anterior und lateralis (= Ncl. ventralis anterolateralis) und zum Ncl. centromedianus des Thalamus, an dessen Synapsen wiederum GABA als Signalgeber gilt. Weitere Projektionsbahnen verlaufen zum Colliculus superior und zum Ncl. pedunculopontinus. Der Thalamus ist nun wiederum mit dem Cortex verschaltet, speziell mit den präfrontalen und -motorischen, dem supplementär motorischen und primär motorischen Anteilen.

Während die Neurone des direkten Weges überwiegend D1-Rezeptoren, die exzitatorisch sind, besitzen, exprimieren die Neurone des indirekten Weges v.a. D2-Rezeptoren, die inhibitorisch wirken.

In welcher Weise Dopamin auf die Sekretion einzelner Substanzen wie Dynorphin, Enkephalin und Substanz P wirkt, und in wie weit es bei der Modulation der Informationen eingreift, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Medikamenteninduzierte Läsionen führen zu einer erhöhten Enkephalin-mRNA Expression im striatopallidalen Pfad, und zu einer verminderten Substanz P- und Dynorphin-mRNA Expression im direkten Weg. Bei Gabe von D1- und D2-Agonisten sind diese Vorgänge rückläufig, so daß Dopamin die Expression einzelner Gene zu beeinflussen scheint.



**Abb. 2 Modell der Basalganglienverschaltungen.** Im linken Schema ist der physiologische Zustand dargestellt. Das Striatum erhält im direkten Weg exzitatorische Fasern (grün, Dopamin bzw. Glutamat im Ncl. subthalamicus) aus der Substantia nigra, pars compacta, die nach einmaliger Verschaltung über D1-Rezeptoren an den Globus pallidus internus und Substantia nigra, pars reticularis weiterleiten. Dies geschieht über inhibitorische Fasern (rot, GABA). Von dort ziehen ebenfalls inhibitorische Fasern zum Ncl. ventralis ant. und lateralis des Thalamus und zum motorischen Kortex. Im indirekten Weg erhält das Striatum inhibitorische Fasern über D2-Rezeptoren aus der Substantia nigra, pars compacta. Von dort ziehen Fasern über den Globus pallidus externus und Ncl. subthalamicus zum Globus pallidus internus und Substantia nigra, pars reticularis zum Thalamus und von dort zum motorischen Kortex. Beim Parkinson Syndrom entsteht durch den nigralen Neuronenverlust ein striataler Dopaminmangel, der letztendlich zu einer Überaktivität des Globus pallidus internus mit übermäßiger Hemmung des Thalamus mit konsekutiv verminderter Innervation des motorischen Kortex führt. SNc/SNr: Substantia nigra, pars compacta bzw. reticularis, GPi/GPe: Globus pallidus internus bzw. externus, STN: Ncl. subthalamicus, TH: Thalamus

### 1.3.2 Pathophysiologie

Der grundlegende pathophysiologische Mechanismus beim Idiopathischen Parkinson-Syndrom ist der Verlust der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra pars compacta. Der Mensch besitzt ca. 550000 dieser Neurone und ab einem Verlust von ca. 50-60% ist mit einer klinischen Symptomatik zu rechnen.

Es werden jedoch noch andere Strukturen des zentralen Nervensystems affiziert. Dazu zählen Teile des Allokortex (Hippocampus, Amygdala, Regio entorhinalis), der cholinerge Nucleus basalis Meynert, Strukturen der Formatio reticularis, namentlich die serotonergen Raphe-Kerne, der katecholaminerge Locus coeruleus, und der Nucleus gigantocellularis und das vegetative Nervensystem über den Nucleus dorsalis n. vagi.

Durch die Degeneration der Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra kommt es zu einer Disinhibition des Striatums. Diese führt über den indirekten Weg zu einer verstärkten Inhibition des Globus pallidus ext., welche in einer vermehrten exzitatorischen Aktivität des Ncl. subthalamicus resultiert. Dieser aktiviert den GPi und die

SNr und diese hemmen über GABA die o.g. Anteile des Thalamus, der letztendlich weniger Informationen an die Großhirnareale leitet. Im direkten Weg hat der Dopaminmangel einen verminderten exzitatorischen Einfluß über den Dopamin-D1-Rezeptor, wodurch eine vermindert inhibitorische Aktivität des Striatums auf den Globus pallidus int. über GABA entsteht. Im Endeffekt werden die oben beschriebenen Anteile des Thalamus vom GPi und der SNr über den Neurotransmitter GABA massiv inhibiert, so daß dieser seine exzitatorische Aktivierung auf den Kortex deutlich einschränkt.

Die Klinik kann dadurch aber nur ansatzweise erklärt werden. Scheint beim Tremordominanten Typ eher der mediale Teil der Substantia nigra pars compacta betroffen, sind es beim akinetisch-rigiden Typ wohl die lateralen Anteile. Die Rigidität wird mit dem verminderten Dopamingehalt im Putamen und dem Nucleus caudatus in Verbindung gebracht. Störungen der Beweglichkeit durch eine gestörte Innervation des N. pedunculopontinus (Kish et al., 1988; Paulus und Jellinger, 1991; Hirsch et al., 1992).

Nichtmotorische Defizite wie Demenz werden mit dem Zellverlust und der fehlenden cholinergen Innervation im Nucleus basalis Meynert assoziiert und Depressionen werden mit der Degeneration der serotoninerger Zellen in den dorsalen Raphe-Kernen in Verbindung gebracht (Paulus und Jellinger 1991).

Ergänzend soll erwähnt werden, daß noch ein weiterer pathophysiologischer Mechanismus in Betracht gezogen wird, der möglicherweise zum Zelluntergang in der Substantia nigra pars compacta beiträgt. Durch die fehlende striatale Hemmung im indirekten Weg kommt es zu einer Überaktivität des Nucleus subthalamicus und zu einer vermehrten Aktivierung von glutamatergen Zellen in der SNr und GPi. Dadurch erhöht sich die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration, was im weiteren Verlauf zu einer Ansammlung von freien Sauerstoffradikalen und zur Schädigung der mitochondrialen Atmungskette führt. Wenn der Nucleus subthalamicus chirurgisch mit der Tiefenhirnstimulation inhibiert wird (s. auch operative Therapie), zeigen sich die motorischen Symptome rückläufig (Limousin et al., 1995; Kumar et al., 1998).

## **1.4 Das Parkinsonmodell der Ratte**

### *1.4.1 Die Läsion mit 6-OHDA*

Ein weit verbreitetes Tiermodell für Parkinsonismus wurde 1968 von Ungerstedt entwickelt. Dies basiert auf der Grundlage, daß Tiere von Natur aus keinen M. Parkinson bekommen.

Es ist ein sehr etabliertes Modell in der Erforschung des Morbus Parkinsons und hat vor allem in der Zellersatz- oder Stammzelltherapie große Bedeutung erlangt. Nachdem man sich Mitte bis Ende der 1990er Jahre auch auf adulte neuronale Stammzellen fokussiert hat, hat sich dieses Modell auch in diesem Forschungszweig bewährt. Da zuvor gemachte Entdeckungen (s.u.) bei Tieren schließlich auch zur Entdeckung von Stammzellen beim Menschen geführt haben, berief man sich weiterhin auf die Verwendung von Tiermodellen zur weiteren Erforschung. Die artifizielle Degeneration des nigrostriatalen Systems kann bei Primaten und bei Nagern durch die Applikation von 6-OHDA (6-Hydroxydopamin) und durch MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) erfolgen. Bei Ratten wird das Modell mit 6-OHDA bevorzugt, da eine selektivere Zerstörung der dopaminergen Projektionsneurone durch Injektion ins Striatum und in die Substantia nigra erfolgt. Dafür

ist das Verfahren aufwendiger, weil es direkt in die Zielstrukturen gespritzt werden muß; MPTP hingegen kann subcutan verabreicht werden und wird daher häufiger bei Primaten angewandt (Brundin et al., 1986; Bjorklund, 1992; Nikkhah et al., 1994a; Olanow et al., 1996; Kirik et al., 1998; Roedter et al., 2001).

Das Toxin wird durch die Terminalen der dopaminergen Neurone aufgenommen und entfaltet seine neurotoxische Wirkung vermutlich durch die Bildung von Sauerstoffradikalen und durch Inhibition der mitochondrialen Atmungskette (Jellinger et al., 1995; Glinka et al., 1997 u. 1998; Soto-Otero et al., 2000).

6-OHDA wird in das mediale Vorderhirnbündel und in die Substantia nigra gespritzt, und führt durch oben beschriebenen Mechanismus zu einer ipsilateralen Zerstörung der dopaminergen Projektionsbahn und zu einem „Hemiparkinsonismus“ auf der kontralateralen Seite, der durch verschiedene Tests eruiert werden kann (s. Material und Methoden).

Die Schädigung erfolgt nur auf einer Seite, da bei einer bilateralen Läsion die Tiere zu Aphagie, Adipsie, massiver Akinesie und einem sensomotorischen Neglect neigen. Sie müßten in diesem Fall durch Sonden künstlich ernährt werden, was einen sehr großen Mehraufwand und sehr ausgeprägte Einschränkungen zur Folge hätte. Zum anderen könnten entsprechende Verhaltenstests mit Apomorphin, Amphetamin nicht durchgeführt werden.

Alternativ kann eine Injektion des Toxins ins Striatum durchgeführt werden. Ichitani et al. stellen nach diesem Prinzip die These auf, daß möglicherweise diese Struktur der Ausgangspunkt der Degeneration der dopaminergen Neurone ist, da durch diese Prozedur auch ein Parkinsonismus induziert werden kann (Dunnett et al., 1983a; Ichitani et al., 1991 und 1994).

#### *1.4.2 Molekulare und funktionelle Grundlagen der 6-OHDA-Läsion*

Die Schädigung des nigrostriatalen Systems erfolgt durch direkte und unilaterale Injektion des Neurotoxins 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) in das mediale Vorderhirnbündel und die Substantia nigra bzw. in das Striatum.

Vermutlich vollzieht sich der Zelltod der nigralen Neurone der SNc durch apoptotische Vorgänge. Die Degeneration setzt ca. 6-12 Stunden nach Injektion des Toxins ein und wird ungefähr 24 Stunden post injectionem durch Axonuntergang begleitet. Als Resultat sind 85- bis nahezu 100% der Nervenzellen zugrunde gegangen, was sich morphologisch in einem striatalen Dopaminverlust von 80-95% widerspiegelt (Gagnon et al., 1991; Hirsch et al., 1999; Kirik et al., 1998).

Im indirekten Weg des nigrostriatalen Projektionssystems zeigt sich kompensatorisch eine Erhöhung der Dopamin-D2-Rezeptoren bzw. der D2-Rezeptor-mRNA. Parallel dazu steigt die mRNA-Synthese von GAD67 (glutamic acid decarboxylase), das Schlüsselenzym in der GABA-Synthese, und von Präproenkephalin bzw. Enkephalin an (Savasta et al., 1992; Soghomonian 1993 u. 1994).

Im direkten Weg zeigen sich andere Alterationen nach der Applikation von 6-OHDA: die Expression von Dopamin-D1-Rezeptoren verhält sich entgegengesetzt zu der der D2-Rezeptoren im indirekten Weg und resultiert in einem Abfall um ca. 22% (Radja et al., 1993).

Die Expression von Prodynorphin mRNA ist im Vergleich zur intakten Seite vermindert, da Dopamin die Synthese dieses Peptids zu stimulieren scheint. Die Konzentration von Substanz P ist ebenfalls reduziert (Shashidharan et al., 2000). Versuche von C.R. Gerfen et al. weisen daraufhin, daß sich die Konzentrationen nach Applikation eines Dopaminagonisten wie z.B. Quinpirol wieder normalisieren. Und auch die Implantation

von fetalem neuronalen Gewebe weist darauf hin, daß sich bei ausreichender Dopaminproduktion die Konzentration der einzelnen Peptide und Rezeptoren wieder angleichen (Savasta et al., 1992; Nisenbaum et al., 1996; Li et al., 1990; Gerfen et al., 1990).

Um überhaupt eine ausreichende Läsion und deren Ausmaß abschätzen zu können, wurden bestimmte Verhaltenstests entwickelt, die vor und nach verschiedenen Therapeutika wiederholt werden können, um eine mögliche Progression oder Remission im Krankheitsbild zu beurteilen.

Ungerstedt et al. konnten 1970 im sog. Rotationstest beschreiben, daß mit 6-OHDA lädierte Tiere nach Applikation von Dopaminagonisten oder Amphetamin ein bestimmtes Drehverhalten zeigten. Apomorphin bewirkt dabei eine Rotation kontralateral zur lädierten Seite (ist das Tier rechts geschädigt, dreht es sich zur linken Seite bzw. gegen den Uhrzeigersinn). Dies geschieht ab einer striatalen Dopamindepletion von über 90% der ursprünglichen Transmitterkonzentration, und ist damit die sensitivere Methode im Vergleich zur Applikation von Amphetamin. Man vermutet dabei eine durch die Läsion bedingte erhöhte Dopaminrezeptordichte, die kompensatorisch entstanden ist, um den Transmittermangel auszugleichen (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970; Hudson et al., 1993; Robinson et al., 1994).

Intraperitoneal verabreichtes Amphetamin erzeugt circa acht Tage post-operativ ein Drehverhalten des Tieres zur ipsilateralen Seite (ist das Tier rechts geschädigt, dreht es sich zur rechten Seite bzw. mit dem Uhrzeigersinn). Dies geschieht schon nach einer striatalen Dopamindepletion von 50-75%. Dieses Verhalten scheint dadurch zu entstehen, daß in der gesunden Hemisphäre des Tieres ein massiver Transmitterüberschuß im Vergleich zur lädierten Seite vorliegt. Dies geschieht durch Hemmung der Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt. Dieser Test hat eine geringere Sensitivität als die Applikation von Apomorphin (s.o.) und sollte daher eher unterstützend angewandt werden.

Die Injektion von 6-OHDA erfolgt unilateral und funktionelle Einschränkungen können kontralateral beobachtet werden. So machen die Tiere beim sog. Sidestepping-Test weniger Schritte mit der lädierten vorderen Extremität als mit der gesunden Seite und im Vergleich mit Kontrolltieren. Desweiteren sind die Tiere in ihrer Fähigkeit stark eingeschränkt, nach Verlust des Gleichgewichts die vollständige Balance auf der erkrankten Seite wiederzuerlangen, was im sog. Sidefalling- oder Gleichgewichtstest ersichtlich wird.

Der Staircasetest zeigt deutlich die Defizite in gerichteten Bewegungen und gezieltem Greifen der lädierten Seite (s. auch Material und Methoden). Dabei ist es für die Ratten erschwert, kleine Futterpellets aus Vertiefungen zu greifen und zum Maul zu führen (Hefti et al., 1980; Montoya et al., 1991; Robinson et al., 1994; Olsson et al., 1995; Barneoud et al., 2000; Rodter et al., 2000; Roedter et al., 2001).

## **1.5 Die Transplantation von neuralem Gewebe**

Schon 1965 lieferten J. Altman et al. Anzeichen für Neurogenese in den Gehirnen von adulten Ratten und stellten damit das Dogma in Frage, daß das menschliche Gehirn im Erwachsenenalter nicht zur Regeneration fähig ist. Somit waren die Zweifel groß und erst 1983 konnte S.A. Goldman et al. diese Entdeckung bestätigen, als sie in den Gehirnen von Kanarienvögeln Anzeichen für Neurogenese erhielten, als diese das Singen erlernten. Ein weiteres Jahrzehnt verging, bis 1997 proliferierende Zellen im Hippocampus von

Spitzenhörnchen entdeckt wurden, die schon entfernte Verwandte von Primaten darstellen. Ein weiteres Jahr später wurden diese Zellen im Hirn von Weißbüscheläffchen identifiziert (Altman und Das, 1965; Goldman und Nottebohm, 1983; Gould et al., 1997 u. 1998). In einem in „Nature of Medicine“ gedruckten Artikel veröffentlichten Eriksson et al. dann ihre Entdeckung von adulten Stammzellen im menschlichen Gehirn (Eriksson et al., 1998). Unter bestimmten Laborbedingungen können sich diese Zellen in Neurone, Astrozyten oder Oligodendrozyten differenzieren und sind so für die Therapie zahlreicher Erkrankungen in Betracht gezogen worden (Palmer et al., 1997).

Schon Ende des 19. Jahrhunderts wurde erstmals neuronales Gewebe in das Gehirn von Säugetieren implantiert. Dennoch vergingen weitere Jahrzehnte, bis die Arbeitsgruppe um A. Björklund 1976 einen Artikel veröffentlichte, in dem sie die Transplantation von solidem Nervengewebe in das Gehirn von Ratten beschrieben. Nach anfänglicher Euphorie hatte man aber zunächst Probleme mit der immunologischen Toleranz des Spendergewebes durch den Empfänger und es galt, die Überlebensfähigkeit des Transplantats zu erhöhen (Stenevi et al., 1976; Brundin et al., 1985).

Entwicklungen neuer Techniken wie der Zellsuspension führten dazu, daß eine homogenere Verteilung der Transplantate erzielt und damit die Vitalität der Zellen erhöht werden konnte. Schon kurz darauf konnten erste Erfolge verzeichnet werden. Verschiedene konsekutive Studien weisen auf eine Verbesserung der Symptome und Beeinträchtigungen im Rattenmodell des Morbus Parkinson hin (Bjorklund et al., 1983; Gage et al., 1983; Schmidt et al., 1981 u. 1983; Fray et al., 1983).

### *1.5.1 Transplantation in das Striatum und in die Substantia nigra*

Der Morbus Parkinson geht einher mit striatalem Dopaminmangel, verursacht durch die Degeneration der Neurone in der SNc. Dieser Transmittermangel kann im Rattenmodell durch die Injektion von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) in das mediale Vorderhirnbündel und in die Substantia nigra selektiv simuliert werden. Nach Erforschung der Pathophysiologie dieser Erkrankung wurde als oberstes Ziel die Substitution der degenerierten Neurone angestrebt. Mit Entwicklung der Zellsuspensionstechnik und der Implantation fetalen Gewebes schien man diesem Ziel einen Schritt näher zu kommen. Man versuchte dabei, den Transmittermangel durch Injektion von dopaminergem Gewebe direkt ins Striatum zu kompensieren (Fray et al., 1983; Dunnett et al., 1983b; Lindvall et al., 1990).

In einem stereotaktischen Verfahren hat man die Zellen in das Striatum injiziert. Nachfolgende histologische Untersuchungen zeigten vitale dopaminhaltige Zellen im Bereich der Implantationsorte und eine vorhandene Transmitterproduktion, die individuell jedoch großen Schwankungen unterworfen war (Schmidt et al., 1983; Strecker et al., 1987). Dabei produzierte die lädierte Hemisphäre mit den implantierten Zellen durchschnittlich 13-18% der Dopaminkonzentration der intakten Seite; dies konnte in einer anderen Studie ebenfalls gemessen werden. Die Vitalität der Zellen konnte anhand von Faseraussprossungen gezeigt werden, die abhängig von der Umgebung und der Quantität des implantierten Gewebes war. Desweiteren erhielten die Neurone Affenzen aus der umgebenden Region beziehungsweise entsandten Efferenzen in die umliegende Region des Empfängergewebes (Bjorklund et al., 1983; Freund et al., 1985; Izzo und Bolam, 1988; Victorin et al., 1989 und 1990; Gagnon et al., 1991).

Auch auf molekularbiologischer Ebene waren Verbesserungen zu registrieren: im indirekten Weg des nigrostriatalen Projektionsweges war die Präproenkephalin-mRNA

Expression rückläufig. Die Dopamin-D2-Rezeptoren-Dichte und die GABA Konzentration gingen ebenfalls zurück. Im direkten Weg sind kaum Veränderungen zu verzeichnen (Dawson et al., 1991; Gagnon et al., 1991; Bal et al., 1993; Rioux et al., 1993).

Zur Überprüfung der Funktionalität wurden wiederum Verhaltenstests herangezogen. Das Rotationsverhalten hat sich nach Applikation von Amphetamin zunächst reduziert und dann normalisiert. Dies galt aber nur für implantierte Zellen eines neun Wochen alten Embryos; dieses Verhalten konnte auch in anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Die aussagekräftigere Applikation von Apomorphin, die eine Rotation erzeugt, wenn über 95% der dopaminergen Neurone degeneriert sind, zeigte nur partiell Verbesserungen im Verhalten. Einschränkend zu sagen ist, daß auch eine spontane Verbesserung des Drehverhaltens eintreten kann, wenn nach inkompletter Zerstörung der striatalen und nigralen Nervenzellen eine kompensatorische Hochregulierung der Dopaminproduktion und eine Reinnervation des Striatums durch die verbliebenen Neurone einsetzt. Insofern kann nur eine limitierte Aussagekraft über die Transplantatvitalität und -funktionalität anhand der Rotationsversuche gemacht werden (Dravid et al., 1984; Brundin et al., 1986 und 1988; Brown und Dunnett, 1989; Mendez et al. 1993).

Eine fundiertere Hypothese über die Erfolgsrate von neuronalen Transplantationen läßt sich anhand der Verhaltenstests aufstellen, die die Motorik überprüfen. Dort waren die Ergebnisse aber nur zum Teil zufriedenstellend. Im sog. Staircasetest, in dem die Tiere gezielt nach Futterpellets greifen mußten, zeigten sich geringe bis keine Veränderungen bei Implantation von fetalem Gewebe in das Striatum, wo hingegen bei Applikation von Zellen in die Substantia nigra ein Benefit in diesem Test erzielt werden konnte (Dunnett et al., 1987).

Ein weiterer Test wurde entwickelt, um eine Aussage über das Ausmaß der Hypo-/Akinesie, eines der Kardinalsymptome der Parkinson-Erkrankung, treffen zu können. Der sogenannte Side-Stepping Test soll die eher subtilen motorischen Defizite einer unilateral 6-OHDA lädierten Ratte detektieren und quantifizieren. Der auch in dieser Arbeit verwandte Test kann mit dem sogenannten Side-Falling Test ergänzt werden. Anhand dieser beiden Tests können gezielte Aussagen über die Funktion einer Extremität, v.a. der vorderen, getroffen werden.

Nach einer Läsion mit 6-OHDA war die kontralaterale vordere Extremität deutlich defizitär, d.h. im Vergleich zur gesunden ipsilateralen Seite und zu Kontrolltieren machten die Tiere weniger Schritte über festgelegte Strecken und Zeiträume. Nach Implantation von embryonalem Nervengewebe in das Striatum und in die Substantia nigra konnte eine Zunahme der Schrittzahl vermerkt werden, was für eine Verbesserung der motorischen Funktion der kontralateralen Extremität spricht. Wurden zusätzlich noch Dopaminagonisten gegeben (z.B. Apomorphin) konnte das Ergebnis nochmal gesteigert werden (Olsson et al., 1995). Im Side-Falling Test, bei dem die Tiere durch den Experimentier auf die Seite „geworfen“ werden und die Reaktion der Ratte anhand eines ausgleichenden Ausfallschritts mit einem Zahlenwert erfasst wird, zeigten sich identische Ergebnisse (Winkler et al., 1996).

Die oben aufgeführten Erläuterungen gelten noch für die Erforschung von fetalem Gewebe. Erzielte Resultate mit der Implantation von adultem neuronalem Progenitorgewebe werden im weiteren Verlauf erläutert.

Die ersten klinischen Versuche mit fetalem Gewebe wurden Anfang der 1990er Jahre durchgeführt. In stereotaktischen Verfahren wurde Patienten, die schon lange an der Parkinson'schen Erkrankung litten, fetale Zellen in das Putamen implantiert; in verschiedenen Studien wurden die Effekte evaluiert und es zeigten sich schwankende und individuell sehr unterschiedliche Ergebnisse. Auf diese Resultate wird im weiteren Verlauf noch näher eingegangen (Lindvall et al., 1989; Freed et al., 1990; Hauser et al., 1999).

Aufgrund oben aufgeführter Problematik mußte man sich eine alternative Methodik erarbeiten, mit deren Hilfe man die Überlebensrate und die funktionellen Ergebnisse verbessern konnte.

In Anlehnung an die Patch-Clamp-Technik, die 1976 von B. Sakmann und E. Neher erfunden wurde, um Ionenkanäle zu differenzieren, tat sich eine Möglichkeit auf, mit sehr viel schonenderen, weniger traumatischen Methoden neurales Gewebe zu implantieren. Die Arbeitsgruppe um G. Nikkhah machte sich diese Methode zunutze, um die Mikrotransplantationstechnik zu entwickeln. Sie benutzten eine 1µl Hamiltonspritze, an deren Kanüle über einen Adapter eine Glaskapillare befestigt wurde. Diese Kapillare hat einen Durchmesser von 50-70µm und ist somit um ein Vielfaches kleiner als der Durchmesser der Kanüle der Hamiltonspritze (500µm). Das in Einzelzellsuspension vorliegende neurale Gewebe kann problemlos durch dieses geringe Lumen appliziert werden. Die einzelnen Zellen haben einen Durchmesser von ca. 15-20µm (Nikkhah et al., 1994c).

Die Vorteile durch die Anwendung dieser Methode liegen auf der Hand. Durch den geringen Durchmesser läßt sich wesentlich schonender und atraumatischer die vorbereitete Zellsuspension applizieren. Komplikationen wie Blutungen bzw. Infarkte lassen sich reduzieren. Durch diese verminderte Traumatisierung und Schädigung des Hirngewebes wird die astrozytäre Reaktion vermindert und eine Narbenbildung dadurch umgangen. Dadurch könnte eine bessere Integration und Interaktion des Spender- mit dem Empfängergewebe gewährleistet werden. Dies läßt sich auch im Experiment belegen: die Zellen hatten eine 2,8-fach höhere Überlebensrate als bei der früheren Methode mit der Hamiltonspritze und der Metallkanüle. Desweiteren ließen sich TH-positive Zellen nachweisen, die dazu tendierten, den nigrostriatalen Projektionsweg zu rekonstruieren. Eine Faserausproßung in die Umgebung hat stattgefunden.

Ein weiterer großer Vorteil ist, daß sich die Zellen wesentlich homogener in die Zielstruktur einbringen lassen. Im Gegensatz zu zwei großen Implantationslokalisationen kann man nun viele verschiedene kleine Orte ansteuern, um so eine gleichmäßigere Innervation zu erreichen.

Betrachtet man nun die erhöhte Vitalität und die genauere Verteilung der Zellen im Striatum, zeigt sich, daß dadurch eine gesteigerte Funktionalität der Implantate erzielt wird. Dies drückt sich zum einen darin aus, daß die Dopaminproduktion im Vergleich mit der herkömmlichen Methode von 12,5 auf 30% gesteigert ist. Zum anderen wurden in den Verhaltenstests deutliche Verbesserungen registriert (Nikkhah et al., 1993 und 1994b).

Mit dieser Applikationsmethode tat sich auch die Möglichkeit auf, noch andere Zielstrukturen zu erreichen. Da es mit der herkömmlichen Methode nicht möglich war, Zellen direkt in die Substantia nigra zu verabreichen, ließ sich dieses auf diese filigrane Art und Weise bewerkstelligen. In Tierversuchen konnte man eine Reinnervation der Substantia nigra erreichen, die sich morphologisch und funktionell darstellen ließ (Nikkhah et al., 1995a, b).

Nachdem in Tierversuchen sehr gute Ergebnisse erzielt wurden, ging man dazu über, klinische Untersuchungen vorzunehmen. Wie oben schon kurz erwähnt, bekamen Ende der 1980er Jahre die ersten beiden Patienten fetales neurales Gewebe implantiert (Lindvall et al., 1989). Es wurde unilateral in das Striatum eingebracht. Das Resultat war mäßig: zunächst waren die Patienten postoperativ eingeschränkter als vorher und zeigten keine Veränderungen. Im weiteren Verlauf zeigten sie geringe, aber statistisch signifikante Verbesserungen in komplexen Bewegungen wie Supination/Pronation oder Fußhebung. Im Positronen-Emissions-Tomogramm dieser beiden Patienten zeigte sich keine vermehrte Dopaminaufnahme.

In folgenden Studien wurden daher andere Rahmenbedingungen geschaffen. Zunächst galt es herauszufinden, in welchem Entwicklungsalter sich die Zellen befinden sollen, um

bessere Voraussetzungen für eine Integration und Vitalität mitzubringen. In den meisten darauffolgenden Studien wurden dann Zellen von sechs bis sieben Wochen alten Föten verwendet. Desweiteren mußten immunologische Aspekte aufgedeckt werden, obwohl das menschliche Gehirn in dieser Hinsicht eine Sonderrolle spielt. In den meisten Studien wurde daraufhin eine Immunsuppression mit Ciclosporin A von sechs Monaten angestrebt (Kordower et al., 1997).

Ein größeres Problem, was immer noch zu lösen gilt, sind die interindividuell sehr unterschiedlichen Ergebnisse. Bis heute konnte nicht erreicht werden, ein relativ gleichmäßiges Outcome bei den behandelten Patienten zu erzielen. Es treten sehr große Unterschiede in morphologischer und funktioneller Verbesserung auf. Dennoch sind die Ergebnisse recht vielversprechend, da sich häufig eine Verbesserung in der Symptomatik in der „OFF-Phase“, Verminderung der Bradykinesie und der Rigidität und eine Verbesserung der Lebensqualität registrieren ließ (Widner et al., 1992; Lindvall et al., 1992, 1994 und 1997; Defer et al., 1996; Freeman et al., 1999; Piccini et al., 2005; Redmond et al., 2008).

Nicht auszuschließen bei dieser Therapieoption sind auftretende unerwünschte Effekte. Sie können sich in Dyskinesien oder Dystonien äußern, die auch auftreten, wenn die L-DOPA Applikation unterbrochen oder vermindert wurde (Jacques et al., 1999; Freed et al., 2001 u. 2003; Ma et al., 2002).

Die Mikrotransplantationsmethode läßt sich auch an adulten Stammzellen durchführen, so wie es in dieser Arbeit geschehen ist.

Die Erfahrungen und die Kenntnisse über adulte neuronale Stammzellen sind sehr viel geringer als bei fötalem Gewebe, da diese Zellressource erst unlängst für die Therapie der Parkinson'schen Erkrankung in Erwägung gezogen worden ist.

Die Erforschung dieser Zellen befindet sich somit noch am Anfang. Der Schwerpunkt liegt dabei auf der Untersuchung der molekularen und neurophysiologischen Eigenschaften sowie der Kultivierung und Expansion im Labor. Im Gegensatz zu der Anwendung von embryonalem Gewebe in zahlreichen klinischen Versuchen, steht die Erprobung von adulten Progenitorzellen bei Parkinson-Patienten noch bevor.

Diese adulten neuralen Stammzellen sind charakterisiert durch Pluripotenz und ihre Kapazität zur Selbsterneuerung (Kennea und Mehmet 2002). Das bedeutet, daß sie Hauptbestandteile des zentralen Nervensystems (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten) generieren können, aber nicht die anderer Organe (wie embryonale Stammzellen).

Die adulten neuralen Stammzellen finden sich gehäuft in der Subventrikularzone der lateralen Ventrikel und in der Subgranularzone des Gyrus dentatus (GD) in der Hippocampus-Formation. Entlang eines „Kanals“, dem sogenannten Rostral Migratory Stream (RMS), wandern diese Zellen zum Bulbus olfactorius (BO), wo sie sich zu GABAergen Interneurone differenzieren können (Morshead und van der Kooy, 1992; Luskin, 1993; Cameron et al., 1993; Kuhn et al., 1996; Palmer et al., 2000).

Nachdem man diese Zellen zunächst v.a. bei Nagern lokalisiert und charakterisiert hatte, wurde das Augenmerk auf das menschliche Gehirn gerichtet. Es war beispielsweise die Frage zu klären, ob homologe Strukturen in Primaten bzw. beim Menschen vorliegen. Dies ist Voraussetzung für die Anwendung von Tiermodellen auf den menschlichen Organismus (Altman und Das, 1966; Hinds, 1968; Costanzo und Graziadei, 1983; Kishi et al., 1990; Schwartz Levey et al., 1991; Lois und Alvarez-Buylla, 1994; Kirschenbaum et al., 1999; Ostefeld et al., 2002; Bedard et al., 2002).

In einzelnen Studien konnte die Generierung von Progenitoren bzw. Neuroblasten in der Subventrikularzone und die Migration dieser Zellen im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden. Anhand von Bromdeoxyuridin (ein Thymidinanalogon) kann die Proliferation dieser Zellen gezeigt werden. Die Zellen wandern, ähnlich wie bei Nagern,

von Zytostrukturen geleitet zum Bulbus olfactorius. Die Leitstrukturen bestehen dabei aus Neuroblasten (Eriksson et al., 1998; Kukekov et al., 1999; Kornack und Rakic, 2001). Diese Stammzellen können aus den verschiedenen Strukturen isoliert werden (s. dazu auch unter Material und Methoden). Sie werden daraufhin unter Zugabe von Wachstumsfaktoren wie basic fibroblast growth factor (bFGF) oder epithelial growth factor (EGF) kultiviert und expandiert. Entfernt man diese beiden Komponenten, gehen die meisten Zellen in der Kultur zugrunde. Ein Großteil der Zellen exprimiert den typischen Stammzellmarker Nestin. Ein geringer Teil der Zellen in vitro exprimiert gliale Marker wie glial fibrillary acidic protein (GFAP), charakteristisch für Astrozyten, oder Galactocerebroside (Oligodendrozyten) (Lendahl et al., 1990; Gage et al., 1995).

Im Tiermodell steht im Vordergrund, ob und inwieweit implantierte Zellen vital sind und inwiefern sich die Zellen in dopaminerge Zellen differenzieren. Nach striataler Implantation zeigten implantierte Grafts eine hohe Überlebensrate und neigen zu einer Differenzierung zu dopaminergen Neuronen. Dabei scheint diese Tendenz im dopamindepletierten Striatum, wie es auch bei der Parkinson-Erkrankung vorliegt, begünstigt zu werden. H. Nishino et al. konnten nachweisen, daß sich mesencephale Progenitorzellen im 6-OHDA lädierten Striatum von Ratten zu Neuronen differenzieren, die Tyrosin Hydroxylase exprimierten. Dies ist ein Hinweis für eine Dopaminproduktion der implantierten Neurone. Indes unterstützt es die These, daß die Umgebung die Differenzierung maßgeblich beeinflusst. Fraglich ist allerdings, warum sich Stammzellen aus anderen Regionen nicht ebenfalls in dopaminproduzierende Neurone entwickeln. Die Theorie, daß sich die Stammzellen in Abhängigkeit von der Umgebung differenzieren, konnte auch in anderen Studien bestätigt werden (Vicario-Abejon et al., 1995; Svendsen et al., 1996; Yang et al., 2002; Nishino et al., 2000; Burnstein et al., 2004).

In einigen Versuchen konnte eine Verbesserung in Verhaltenstests nachgewiesen werden. In der amphetamininduzierten Rotation waren im Vergleich zu Kontrolltieren und zum Zeitpunkt vor der Implantation verminderte Umdrehungen pro Minute zu registrieren. Ein interessanter Aspekt, der in letzter Zeit vermehrt aufgenommen wurde, ist die Frage, ob bei einer Transplantation von adulten Stammzellen diese eher neuroprotektiv bzw. „neurorestorativ“ wirken. Für ersteres spricht die Differenzierung der implantierten Zellen in Gliazellen, die durch die Bildung neurotropher Faktoren die verbliebenen dopaminergen Neurone unterstützen (Studer et al., 1998; Yang et al., 2002; Ourednik et al., 2002 und 2009; Madhavan und Ourednik, 2008).

## **1.6 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit**

In der vorliegenden Dissertation soll geklärt werden:

1. Können adulte neuronale Progenitorzellen in die Zielstrukturen Striatum und Substantia nigra eingebracht werden?
2. Werden die Transplantate in diese Strukturen so integriert, daß möglicherweise zumindest tendenziell ein Dopaminmangel kompensiert werden kann?
3. Läßt sich durch die Anwendung von motorischen Verhaltenstests eine funktionelle Kompensation nachweisen?
4. Wenn sich die Zellen integrieren, inwieweit sind sie vital, proliferieren sie und in welche Zelllinie (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten) differenzieren sie sich?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Experimentelles Design

Für das vorliegende Experiment wurden insgesamt 36 weibliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Anfangsgewicht von 200-225g verwendet. Die Tiere wurden in Makrolon-III-Käfigen zu je vier Stück gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Temperatur im Raum betrug 21°C und die Luftfeuchtigkeit wurde konstant gehalten. Um einen adäquaten Tag-Nacht-Rhythmus zu erhalten, wechselten Hell- und Dunkelphase nach 12 Stunden (6 bzw. 18 Uhr).

Alle Tiere erhielten eine stereotaktische Läsion mit 6-Hydroxydopamin in das mediale Vorderhirn- bzw. nigrostriatale Bündel der rechten Hemisphäre. Um zu überprüfen, ob die Tiere erkrankt sind, wurden sog. Apomorphin- und Amphetaminrotationen durchgeführt. Für eine Quantifizierung der Läsion schlossen sich daran Verhaltenstests an. Nach Abschluß dieser Tests wurde den Tieren mit Glaskapillaren (in wenigen Fällen mit einer Metallkanüle) adulte neurale Progenitorzellen aus Rattenhirnen implantiert. Je nach Gruppe erhielten die Tiere Progenitorzellen unterschiedlichen Alters (frühe vs. späte Passage) oder sie unterschieden sich in den Implantationslokalisationen (Striatum vs. Substantia nigra). Danach schlossen sich wiederum Rotations- und Verhaltenstests an. Die Tiere wurden schließlich getötet, um die Hirne immunhistologisch und autoradiographisch auswerten zu können.

Die Gruppenzusammensetzung ist folgende:

**Tab. 1: Gruppenzusammensetzung**

Gruppe	Zellpassage	Implantationslokalisation	N = Anzahl der Tiere (20 Wo Tiere)
1	Früh (P6-P11)	Striatum (CPu)	4 (n=2)
2	Früh (P6-P7)	Substantia nigra (SN)	5 (n=5)
3	Spät (P24-P31)	Striatum (CPu)	6 (n=5)
4	Spät (P25-P32)	Substantia nigra (SN)	6 (n=2)
<b>Kontrolle K1</b>	Sham-Tx	Striatum (CPu)	5 (n=5)
<b>Kontrolle K2</b>	Sham-Tx	Substantia nigra (SN)	5 (Ø)
<b>Kontrolle K3</b>	Nur Lx	-	5 (n=2)

Innerhalb des Versuchphase, die sich über 1,5 Jahre hinzog, wurde das Design für einige Tiere verändert, da wir der Meinung waren, der Zeitraum zwischen Implantation der adulten Stammzellen und der Tötung sei zu kurz. Daraufhin wurde dieser von 6 Wochen auf 22 Wochen erhöht. Wir orientierten uns hierbei an Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen, die v.a. mit embryonalen Stammzellen gearbeitet haben. Desweiteren versprachen wir uns dadurch positivere Ergebnisse, da die Zellen möglicherweise besser integriert werden könnten.

### Zeitplan I:

SS/SF, Staircase	6-OHDA-Läsion	Apomorphin-/ Amphetaminrotation	SS/SF, Staircase Transplantation	Apomorphin-/ Amphetaminrotation	SS/SF, Staircase Tötung
-2 Wo.	0 Wo.	4 Wo.	6 Wo.	10 Wo.	12 Wo.

### Zeitplan II (nach Änderung):

SS/SF, Staircase	6-OHDA-Läsion	Apomorphin-/ Amphetaminrota	SS/SF, Staircase Transplantation	Apomorphin-/ Amphetaminrota	SS/SF, Staircase	Apomorphin-/ Amphetaminrota	SS/SF, Staircase Tötung
-2 Wo.	0 Wo.	4 Wo.	6 Wo.	10 Wo.	12 Wo	26 Wo.	28 Wo.

## **2.2 Die Läsion mit 6-Hydroxydopamin**

### *2.2.1 Narkose*

Die Läsion mit 6-Hydroxydopamin wurde in einem stereotaktischen Apparat der Firma TSE durchgeführt. Sie erfolgte unilateral auf der rechten Seite.

Dazu wurden die Tiere mit einer Kombination aus Ketamin (100mg/kg KG) und Xylazin (5mg/kg KG), welche intraperitoneal verabreicht wurde, narkotisiert. Nach Injektion wurde das Tier in einen abgedunkelten Käfig gesetzt, um unnötigen Streß zu vermeiden. Die Einschlafphase, die i.d.R. 5-10 Minuten dauert, kann stark variieren. Sie wird eingeleitet durch unkoordinierte Bewegungen, Ausfall von Klammer- und Umdrehreflex und zunehmendem Verlust des Muskeltonus mit Auflegen des Kopfes oder Seitenlage des Hinterkörpers. Es folgte die Rasur der Kopfoberseite, die Reinigung mit einem Hautdesinfiziens und der Schutz der Augen mit Heilsalbe vor Austrocknung. Währenddessen wurde regelmäßig die Narkosetiefe überwacht:

- A Cornealreflex (sollte gering vorhanden sein)
- B Zwischenzehreflex (sollte gar nicht vorhanden sein)
- C Pupillen-Reaktion (sollte gering vorhanden sein)

Desweiteren sollte man die Atmung, Temperatur und Ausscheidung überwachen, da das Ketamin stark diuretisch wirkt. Gegebenenfalls kann man bei hohem Flüssigkeitsverlust 3ml NaCl i.p. (intraperitoneal) spritzen. Die Narkose dauerte ungefähr 60 Minuten. Bei Bedarf kann Ketamin als halbe Initialdosis erneut injiziert werden, bei Xylazin besteht eine

hohe Gefahr der Atemdepression; aufgrund der längeren Wirkdauer reicht in der Regel eine einmalige Injektion.

### *2.2.2 Stereotaktische Operation*

Bei einer ausreichenden Narkose und nach Abschluß der Vorbereitungen wurde die Ratte im stereotaktischen Apparat fixiert (s. Abb. 4). Dazu wird der Oberkiefer mit den beiden Schneidezähnen auf einen Zahnbalken gelegt, um im nächsten Schritt den Kopf seitlich zu fixieren, indem Ohrbalken in den rechten und linken äußeren Gehörgang geschoben werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Balken wirklich in dem Meatus acusticus externus zu liegen kommen, da der Kopf unter der OP sonst abzurutschen droht bzw. falsch fixiert wird. Der Versuchsaufbau entspricht dabei dem der Implantation der Zellsuspensionen, welcher in einer unten aufgeführten Darstellung gezeigt wird.

Ist der Kopf ausreichend verankert, erfolgt eine erneute Hautdesinfektion mit 30 Sekunden Einwirkzeit (je nach Hersteller des Desinfiziens verschieden). Mit einem Skalpell wird eine ca. 2,5 cm lange Hautinzision durchgeführt, die median, 0,5 cm oberhalb der Augen beginnt und bis zum Ende des Hinterhaupts reichen kann. Zur besseren Übersicht werden die Wundränder mit einem Retraktor zur Seite geschoben. Mit einem scharfen Löffel wird das Periost entfernt und die Schädelkalotte sichtbar gemacht. Zur Blutstillung kann ggf. Wasserstoffperoxid herangezogen werden.

Im nächsten Schritt wird das Bregma dargestellt und als Nullpunkt kalibriert: dazu wird mit der Spitze der Metallkanüle (10µl Hamilton-Spritze), mit der später das Toxin, verabreicht wird, der Schnittpunkt von Koronar- und Sagittalnaht angefahren. Dadurch erhält man die anterior-posteriores und medio-lateralen Referenzkoordinaten, mit denen man anhand des Anatomie-Atlas der Ratte von G. Paxinos und C. Watson seine Zielstrukturen anfahren kann.

Nach Ermittlung der Zielkoordinaten wird an den entsprechend gekennzeichneten Stellen der Schädel mit einem kleinen Handbohrer trepaniert. Mit einer umgeknickten Injektionskanüle wird das Loch von Knochensplittern gereinigt, bis die Dura mater freigelegt ist. Anhand dieser wird die dorso-ventrale Koordinate bestimmt, indem man mit der Spitze der Hamilton-Spritze diese ansteuert. Schließlich wird die Dura mater eröffnet.

### *2.2.3 Applikation des Toxins 6-Hydroxydopamins*

Die Injektion des 6-Hydroxydopamins (6-OHDA) erfolgte in das

- a) Nigrostriatale Bündel (Koordinaten s.u.)
- b) Mediale Vorderhirnbündel (Koordinaten s.u.)

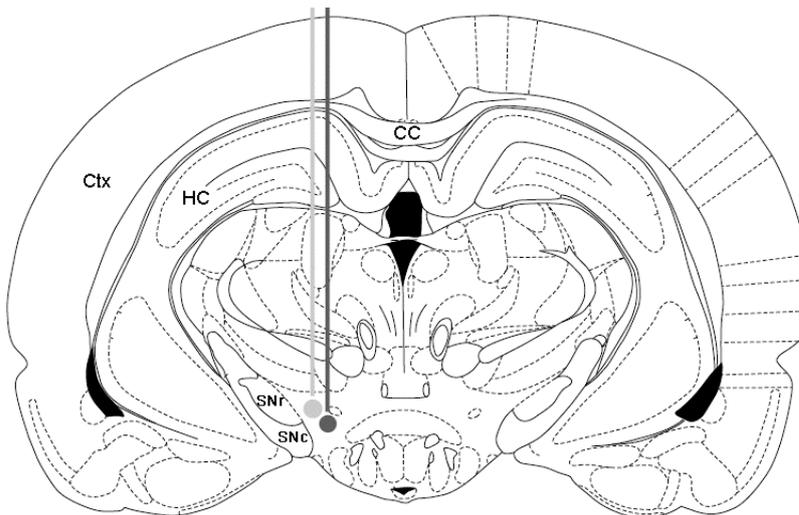
**Tab. 2: Koordinaten für die 6-OHDA-Läsion**

	AP	ML	DV	Zahnbalken	Volumen
<b>Nigrostriatales Bündel</b>	-4,4	-1,2	+7,8	-2,4	2,5 µl
<b>Mediales Vorderhirnbündel</b>	-4,0	-0,8	+8,0	+3,4	3 µl

Die Injektionsmenge betrug dabei 2,5 µl bei a) und 3 µl bei b). Die Konzentration des 6-OHDA lag bei 3,6 µg/µl in 0,2 mg/ml 0,9% Kochsalzlösung mit Ascorbinsäure als Antioxidans. Das Toxin wurde erst kurz vor Verabreichung angesetzt und bis zur Injektion dunkel und auf Eis gelagert. Bei Trübung oder anderen Veränderungen wurde das Eppendorfgefäß verworfen.

Die Kanüle der Hamilton-Spritze wurde langsam in die Zielstrukturen herabgelassen, nachdem man über das Duraniveau die dritte Koordinate bestimmen konnte. Dort wurde 1 µl/min injiziert. Hinterher wurde die Kanüle für jeweils fünf Minuten belassen, um einen Reflux des Toxins durch den Stichkanal zu vermeiden.

Nach Entfernung der Kanüle wird das Tier aus dem Stereotaxierahmen herausgenommen und der Schnitt mit Einzelknopfnähten verschlossen. Da häufig die Tiere noch tief narkotisiert sind, werden sie in Zellstoff und Aluminiumfolie eingewickelt, um ein Auskühlen zu verhindern. Bei hohem Flüssigkeitsverlust wurden 3 ml NaCl i.p. gespritzt. Danach kann das Tier in den Käfig zurückgelegt werden. Bis es vollständig erwacht, sollte man es von den anderen Tieren in einem Einzelkäfig isolieren. Um das Fressen zunächst zu erleichtern, kann vorher aufgeweichtes Futter mit in den Käfig gelegt werden.



**Abb. 3 Schematische Darstellung der Injektionstrakte.** Der hellgraue Trakt kennzeichnet die Injektion in das Nigrostriatale Bündel, der dunkelgraue in das mediale Vorderhirnbündel. Das Toxin 6-OHDA führt zu einer retrograden Degeneration der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra.

CC: Corpus callosum, Ctx: Cortex, HC: Hippocampus, SNC: Substantia nigra pars compacta, SNr: Substantia nigra pars reticulata

## 2.3 Transplantation der adulten neuralen Progenitorzellen

### 2.3.1 Entnahme und Dissektion des Gewebes

Zur Gewinnung der adulten Stammzellen wurde an einer weiblichen Sprague-Dawley-Ratte eine Biopsie vorgenommen. Dazu wurde das Tier analog zur Läsion mit einer Kombination aus Ketamin (100mg/kg KG) und Xylazin (5mg/kg KG) narkotisiert. Es wurde mit dem Kopf im stereotaktischen Apparat fixiert und der Zahnbalken auf -3,3 eingestellt. Daraufhin folgte eine Inzision der Kopfhaut, die Entfernung des Periosts mit einem scharfen „Löffel“ und ggf. Blutstillung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mit einer Biopsiekanüle (18 Gauge), die an einer 10ml-Spritze befestigt war, wurde auf Bregma geeicht, um daraufhin den Bulbus olfactorius anzusteuern (6.2-6.6 mm vor Bregma, 2mm lateral). An der entsprechend markierten Lokalisation wurde eine Trepanation durchgeführt und nach Eichung auf Bregma die Kanüle herabgelassen. Nach Erreichen der Zielstruktur wurde mit dem Stempel der Spritze aspiriert, um einen Gewebezylinder zu erhalten. Daraufhin wurde die Kanüle sofort zurückgezogen und der Stanzzylinder in einen Flacon mit kaltem Hank's Puffer (HBS= Hank's buffered solution) gegeben, um ihn labortechnisch aufzubereiten. Das Tier wurde aus dem stereotaktischen Apparat entfernt und noch unter Narkose dekapitiert.

### 2.3.2 Aufbereitung der Zellsuspension

Das gewonnene Zellmaterial wurde nach der Biopsie für 45 Minuten bei 37°C in einer Papain-Lösung enzymatisch verdaut. Dadurch können die einzelnen Gewebebestandteile des Biopsats voneinander dissoziiert werden. Zur weiteren Trennung wurde die Probe nun einem Dichtgradienten folgend zentrifugiert. Das dadurch gewonnene Zellpellet wird in einem sog. „Stoppmedium“ in Kulturflaschen eingebracht, die mit bovinem Fibronectin (1µg/cm<sup>2</sup>) ausgelegt sind. Das Medium enthält DMEM/F12, L-Glutamin (200mM), die Antibiotika Penicillin und Streptomycin, Fungizone und 10%iges fetales Kälberserum (FCS). Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumshift auf ein Standardmedium, das DMEM/F12, L-Glutamin (200mM), die Antibiotika Penicillin und Streptomycin, Fungizone und 20%iges serumfreies Supplement BIT (**bovines Serumalbumin, Insulin, Transferrin**) enthielt. Desweiteren wurden 20ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF), 20ng/ml epithelial growth factor (EGF) und 20ng/ml platelet derived growth factor AB (PDGF-AB) zugesetzt. Die Zellen setzen sich am Flaschenboden ab und es entsteht eine adhärenzte Monolayer-Kultur. Zweimal pro Woche wird ein teilweiser Mediumwechsel mit Standardmedium vorgenommen, um eine homogene Expansion zu gewährleisten.

Ist der Flaschenboden vollständig mit Zellen bedeckt („konfluent“), wird die Kultur gesplittet bzw. passagiert. Dazu werden die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden dissoziiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wird Stoppmedium hinzugegeben, so daß man eine Zellsuspension erhält. Diese in Medium schwimmenden Zellen können nun abgesaugt werden. Die verbleibenden Zellen in der Kulturflasche werden erneut in Stoppmedium eingebettet. Auf diese Weise erhält man die nächste „Passage“: nach Umbettung der kultivierten Zellen auf mehrere Flaschen wechselt das Stadium der Expansion beispielsweise von Passage p4 auf p5.

Um den Nachweis zu erbringen, daß es sich bei den kultivierten Zellen um neuronale Stammzellen handelt, wurde eine Immunocytochemie und RT-PCR durchgeführt, die das Vorhandensein von dem Intermediärfilament-Protein Nestin zeigten.

### 2.3.3 Mikrotransplantation der Einzelzellsuspension

Die Transplantation der Progenitorzellen fand sechs bzw. 20 Wochen nach der Läsion mit 6-Hydroxydopamin und Durchlaufen der gesamten Testbatterie (s.u.) statt. Die Operation, die für die Implantation der Zellen angewandt wurde, unterscheidet sich nicht sonderlich von der vorangehend beschriebenen Vorgehensweise bei der Läsion. Dazu wurden die Tiere mit einer Kombination aus Ketamin (100mg/kg KG) und Xylazin (5mg/kg KG), welche intraperitoneal verabreicht wurde, erneut narkotisiert. Nach Prüfung einer adäquaten Narkosetiefe durch Reflextestung wurden die Tiere im Zahnbalken und mit den Ohrbalken des stereotaktischen Apparats fixiert. Die Kopfhaut wurde in gleicher Weise längsinzidiert wie es auch bei der 6-OHDA-Läsion stattfand. Das Periost, welches aufgrund der Läsion mit 6-OHDA hypertrophiert und vernarbt sein konnte, wurde entfernt. Gegebenenfalls wurde eine ausreichende Blutstillung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorgenommen. Daraufhin wurde mit der Glaskapillare bzw. bei wenigen Tieren mit der Metallkanüle Bregma angefahren. Die Implantationskoordinaten sind aus einer Veröffentlichung von Mukhida et al. entnommen und in unten stehender Tabelle aufgeführt:

**Tab. 3: Implantationskoordinaten**

	AP	ML	DV	Zahnbalken	Volumen
<b>Striatum</b>	1,3/0,6/0,3	-2,1/-2,9/-3,7	Jeweils 5,5/4,3	-3,3	6 µl (=450000 Zellen)
<b>Substantia nigra</b>	-4,8/-5,0	-2,0/-2,6	Jeweils 8,3/8,1	-3,3	4 µl (=300000 Zellen)

Für die Implantation der Zellsuspension in das Striatum waren sechs (drei Loci mit je zwei unterschiedlichen Tiefen) und für die Transplantation in die Substantia nigra vier (zwei Loci mit je zwei unterschiedlichen Höhen) Lokalisationen vorgesehen. Nachdem die Zielpunkte auf der Schädelkalotte markiert waren, der Knochen dementsprechend trepaniert worden war, wurde die Zellsuspension mit der Kapillare aufgezogen. Dabei wurde sie oberhalb der Zielkoordinate belassen, um sicherzugehen, daß keine Abweichung mehr stattfindet. Zuvor wurde die Zellsuspension mit einer Pipette vorsichtig durchmischt, um eine gleichmäßige Zelldichte zu erhalten. Sowohl das Aufziehen als auch das Injizieren wurde mit einer mechanischen Handpumpe durchgeführt. Anhand einer dort markierten Skala ließ sich auch die Injektionsmenge ablesen. Die Handpumpe war über einen Verbindungsschlauch mit einer Halterung verbunden, an die die Glaskapillare fixiert wurde. Das System wurde mit Paraffinöl entlüftet, um gleichmäßige Transplantatvolumina injizieren zu können. Nachdem die Zellen aufgezogen waren, wurde die Spitze der Glaskapillare auf Duraniveau herabgelassen und anhand der entsprechenden Koordinate der Zielwert berechnet. Daraufhin wurde die Kapillare um den kalkulierten DV-Wert nach ventral herabgelassen. Nach Erreichen der tieferen Zielstruktur (Striatum-Tx: 5,5mm, SN-Tx: 8,3mm) wurde 1 ml der Zellsuspension injiziert (= 75000 Zellen/µl) und die Kapillare für drei Minuten belassen, um einen Reflux zu verhindern. Dann wurde sie um den jeweils

errechneten Wert zurückgezogen (Striatum-Tx: -1,2mm, SN-Tx: -0,2mm) und wiederum wurde 1 ml appliziert. Nach drei Minuten wurde die Kapillare entfernt und die nächste Zielstruktur angefahren, wobei auch jedesmal vom Neubestimmten Duraniveau aus in die Tiefe gegangen wurde. Die Injektionszeitpunkte und die Quantität wurden für jede Injektion dokumentiert. Tiere, die Zellen in das Striatum implantiert bekommen haben, erhielten insgesamt ca. 450000 Zellen (= 6 µl Volumen); bei Transplantation in die Substantia nigra wurden insgesamt ca. 300000 Zellen (4 µl Volumen) appliziert. Nach der letzten Injektion wurde das Tier aus dem stereotaktischen Apparat entfernt und die Kopfhaut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Danach wurde das Tier bei Bedarf in Zellstoff und Aluminiumfolie eingewickelt, um es vor Auskühlung zu bewahren. Es wurde daraufhin zum Aufwachen in einen mit Zellstoff ausgelegten Käfig gelegt.

Die Zellsuspension, die verabreicht wurde, wurde erst kurz vor Applikation aus dem bearbeitenden Labor geholt. Außer bei zwei Tieren wurden Zellen implantiert, die zuvor mit einem Fluoreszenz-Marker markiert wurden („fast blue“, Protokoll s. Immunhistologie), um sie bei der späteren immunhistologischen Analyse unter einem Immunfluoreszenzmikroskop betrachten zu können. Vor der Transplantation befanden sich die Zellen in einem Eppendorfgefäß. Als Lösungszusatz und Nährlösung ist STOP-Medium hinzugegeben worden. Das Gefäß wurde bei 37 Grad Celsius gelagert.



**Abb. 4 Implantationssitus.** Blick von oben auf den fixierten Schädel. Der Kopf der Ratte wird mit den beiden Schneidezähnen in einem Zahnbalken gelegt und durch zwei weitere Ohrbalken im äußeren Gehörgang fixiert. Außerdem sichtbar ist die Injektionskapillare, die an einer Hamiltonspritze befestigt ist. Die gleiche Versuchsanordnung gilt für die Entnahme von Hirngewebe für die Kultivierung von Stammzellen und bei der Läsion mit 6-OHDA.

## 2.4 Analyse des Verhaltens

### 2.4.1 Rotationsverhalten

Zur Ermittlung, ob die Tiere tatsächlich erkrankt sind, wurden vier Wochen nach der Läsion bzw. vier und zwanzig Wochen nach der Implantation medikamenten-induzierte Rotationstests durchgeführt.

#### 2.4.1.1 Apomorphin-induziert

Die Apomorphin-Rotation wurde vier und 10 Wochen nach der 6-OHDA-Läsion im ursprünglichen Zeitplan durchgeführt. Tiere, die nach dem geänderten Zeitplan behandelt wurden, ließen wir zusätzlich noch in der 26. Woche post-operativ rotieren.

Den Ratten wurde subkutan Apomorphin mit einer Konzentration von 0,05mg/kgKG injiziert und daraufhin über 40 Minuten beobachtet. Dazu wurden sie in eine durchsichtige Halbkugel aus Plexiglas gesetzt (Rotameter, TSE, Gießen). Über ein Jäckchen, das den Ratten übergezogen wurde und das über einen Nylonfaden mit einer Zählleinheit verbunden war, konnten die Umdrehungen innerhalb des Beobachtungszeitraum von einem PC und dessen Software registriert und abgespeichert werden. Die Vorzugsdrehrichtung war nach kontralateral zur lädierten Seite bzw. gegen den Uhrzeigersinn (GUZ). Hatte das Tier 160 Umdrehungen GUZ/ 40 Minuten (= 4 Umdrehungen/min), konnte man von einer Läsion ausgehen. Eine Rotation unter Apomorphin geschieht ab einer striatalen Dopamindepletion von über 90% der ursprünglichen Transmitterkonzentration und ist damit die sensitivere Methode im Vergleich zur Applikation von Amphetamin. Man vermutet dabei eine durch die Läsion bedingte erhöhte Dopaminrezeptordichte, die kompensatorisch entstanden ist, um den Transmittermangel auszugleichen (Hudson et al., 1993; Robinson et al., 1994).

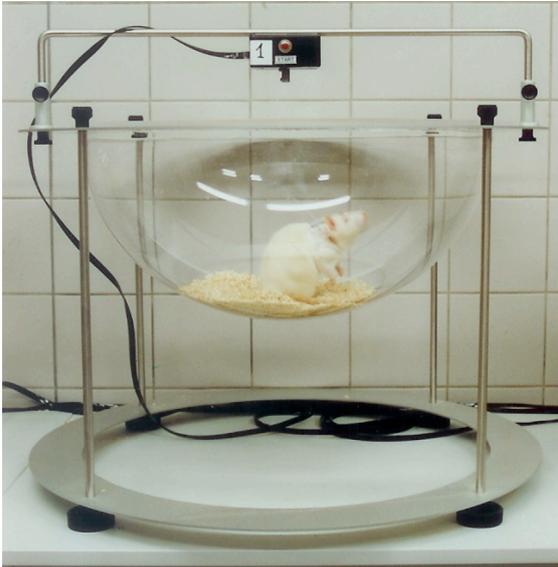
#### 2.4.1.2 Amphetamin-induziert

Die Amphetamin-Rotation wurde vier und 10 Wochen nach der 6-OHDA-Läsion im ursprünglichen Zeitplan durchgeführt. Tiere, die nach dem geänderten Zeitplan behandelt wurden, ließen wir zusätzlich noch in der 26. Woche post-operativ rotieren. Zwischen Apomorphin- und Amphetamin-Rotation lagen immer zwei Tage, um die Tiere nicht unnötigem Streß auszusetzen. Die Testvorrichtung war identisch mit der, die auch zur Apomorphin-Rotation verwandt wurde.

Den Ratten wurde intraperitoneal d-Amphetamin mit einer Konzentration von 2,5mg/kgKG injiziert und daraufhin über 90 Minuten beobachtet. Die bevorzugte Richtung war ipsilateral zur lädierten Seite bzw. im Uhrzeigersinn (IUZ). Hatte das Tier 540 Umdrehungen IUZ/ 90 Minuten (= 6 Umdrehungen/min), konnte man von einer Läsion ausgehen. Dies geschieht schon nach einer striatalen Dopamindepletion von 50-75%. Dieses Verhalten scheint dadurch zu entstehen, daß in der gesunden Hemisphäre des Tieres ein massiver Transmitterüberschuß im Vergleich zur lädierten Seite vorliegt. Dies geschieht durch Hemmung der Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt. Dieser Test hat eine geringere Sensitivität als die Applikation von Apomorphin (s.o.) und sollte daher eher unterstützend angewandt werden (Robinson et al., 1994; Hefti et al., 1980).

Wurden die obengenannten Kriterien erfüllt, konnte man von einer 98%igem striatalem Dopamindepletion ausgehen, und die Tiere wurden in die Studie aufgenommen. Nicht

ausreichend erkrankte Tiere, die die Kriterien nicht erfüllen konnten, wurden so ausselektiert.



**Abb. 5 Vorrichtung für die Testung des Rotationsverhaltens.** Das Tier sitzt in einer halbkugelförmigen Schale und ist über ein übergestreiftes Jäckchen und einer Nylonschnur mit einer Zählereinheit verbunden, die die Umdrehungen pro Minute registriert und an eine Computersoftware weiterleitet.

#### *2.4.2 Side Stepping Test*

Dieser Verhaltenstest dient zur qualitativen Beurteilung der motorischen Fähigkeiten der linken Vorderpfote im Vergleich zur rechten und im Zusammenhang mit den Zuständen vor der Läsion (prä-Lx), nach der Läsion (post-Lx) und nach der Implantation der neuronalen Stammzellen (post-Tx). Dabei sollen die motorischen Fertigkeiten, insbesondere die Akinesie, eingeschätzt werden, indem eine Schrittfolge des Tieres gezählt wird. Diese wurde immer seitengetreunt durchgeführt.

Der Side-Stepping-Test wurde 2 Wochen vor der Läsion und fünf und 11 Wochen nach der Läsion mit 6-OHDA gemacht. Bei Tieren, die nach dem geänderten Zeitplan behandelt wurden, mußte er zusätzlich ab der 27. Woche post-op vollführt werden.

Der Test gliedert sich in eine Trainingsphase, die vor der 6-OHDA-OP drei Tage und nach der OP und Transplantation zwei Tage dauert, an die sich jeweils drei sog. Performancetage anschließen. Diese Daten gehen in die Auswertung ein, wohingegen das Training zur Gewöhnung der Tiere an den Test dient. Ein Test beinhaltet zwei Wiederholungen in Vorhand- und in Rückhandrichtung. Der Experimentier fixiert die Hinterläufe und den nicht relevanten Vorderlauf des Tieres mit beiden Händen und stellt es mit der Vorderpfote, die er testen will, auf eine glatte Oberfläche (z.B. Tisch). Der Körper des Tieres soll parallel zur Oberfläche gehalten werden. Testet er beispielsweise die linke Pfote, hält er mit der rechten Hand die rechte Vorderpfote fest und mit seiner linken Hand die Hinterläufe. Nun wird das Tier parallel zur Oberfläche gezogen. Die Strecke ist 90 cm lang und sollte in ca. 30 sek. zurückgelegt werden. Dabei wird die Anzahl der Schritte registriert, die das Tier mit der getesteten Pfote macht. Die Vorhandrichtung ist am Bsp. der linken Pfote von links nach rechts und die Rückhandrichtung von rechts nach links.



**Abb. 6 Side Stepping Test.** Der Experimentier fixiert die beiden Hinterläufe mit einer und die nicht untersuchte Vorderpfote mit der anderen Hand. Das Tier wird über eine glatte Oberfläche gezogen. Die Anzahl der Ausgleichschritte in Vorhand- (VH) und Rückhandrichtung (RH) werden gezählt. Diese Ausgangsposition des Tieres wird auch für den Side Falling Test verwendet, bei dem das Tier z.B. in diesem Falle auf die rechte Seite gedreht werden würde.

#### 2.4.3 Side Falling Test

Dieser Test dient ebenfalls zur qualitativen Beurteilung der linken Vorderpfote im Vergleich zur rechten und im Zusammenhang mit den Zuständen vor der Läsion (prä-Lx), nach der Läsion (post-Lx) und nach der Implantation der neuronalen Stammzellen (post-Tx). Hierbei wird jedoch die Koordination getestet, wenn man versucht, das Tier schnell auf die Seite zu drehen. Er kann direkt im Anschluß an den Side-Stepping-Test durchgeführt werden.

Analog zum Side Stepping Test teilt er sich in eine Trainingsphase und eine Performancephase ein. Der Experimentier fixiert das Tier mit beiden Händen wie beim Side Stepping Test auf einer glatten Oberfläche. Der Körper des Tieres ist ebenfalls parallel zum z.B. Tisch. Der Tester versucht nun, das Tier schnell auf die Seite zu drehen und achtet dabei auf die Reaktion der Ratte. Anhand einer Punkteskala wird die Koordination (0-3, s. Tabelle 4) des Tieres eingeteilt. Dieser Test wird pro Performancetag sechs Mal wiederholt.

**Tab. 4: Werte für die Gleichgewichtserlangung beim Side Falling Test**

Punkte	Reaktion der Ratte
0	keine erkennbare Muskelreaktion, das Tier fällt auf die Seite
1	deutlich erkennbare muskuläre Reaktion, der Ratte gelingt es jedoch nicht, die Extremität unter den Körperschwerpunkt zu bringen und fällt weiterhin auf die Seite
2	unvollständige Gleichgewichtsherstellung: das Tier bewegt die Extremität unter den Körperschwerpunkt, die Pfote befindet sich jedoch nicht im Lot zum Körper
3	komplette Gleichgewichtswiederherstellung

#### 2.4.4 Staircase Test

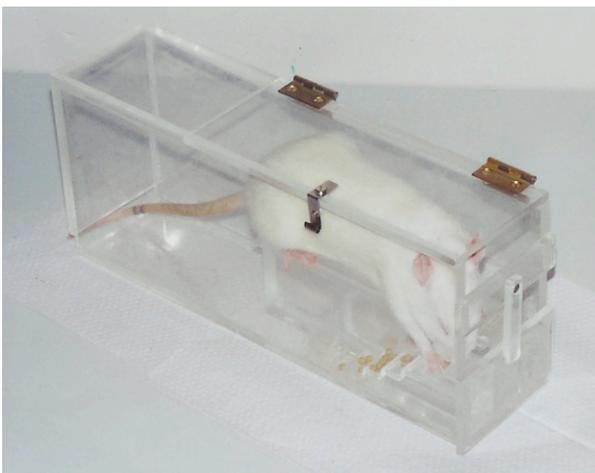
Dieser Test wurde 1990 von C.P. Montoya et al. entwickelt (Montoya et al. 1991). Er dient zur Untersuchung der beiden Vorderpfoten und zu deren Einschätzung von Bewegungen bei gerichtetem Greifen. Dabei kann eine unabhängige und seitengetrennte Beurteilung vorgenommen werden.

Der Staircase-Test wurde ebenfalls zwei Wochen vor der Läsion und im Anschluß an den Side-Stepping-Test gemacht. Dies entsprach also ca. fünf und 11 Wochen nach der Läsion mit 6-OHDA bzw. zusätzlich ab der 27. Woche post-op bei Tieren, die nach dem geänderten Zeitplan behandelt wurden. Zwischen Staircase- und Sidestepping-Test lagen stets zwei Tage, in denen die Ratten auf Diät gesetzt wurden (s.u.)

Vor der Läsion der Tiere gibt es eine 12-tägige Trainingsphase, an die sich acht aufeinanderfolgende Tage „Performance“ anschließen. Hier werden die relevanten Daten ermittelt. Nach der Läsion und nach Implantation der Stammzellen werden die Tiere erneut getestet. Hierbei wird kein Training mehr durchgeführt und alle erhobenen Werte fließen sofort in die Auswertung ein.

Desweiteren kann der Test zum einen bilateral durchgeführt werden, d.h. beide Vorderpfoten werden gleichzeitig getestet. Zum anderen gibt es den sog. forced choice Test, bei dem beide Vorderpfoten getrennt voneinander getestet werden. Vor Beginn (zwei Tage) und während der Testreihe werden die Tiere einer „Diät“ unterzogen, bei der jedes Tier nur 10 Gramm Futter pro Tag erhält. Dabei ist darauf zu achten, dass die Tiere mindestens 80 % ihres Ursprungsgewichts behalten. Der Zugang zu Wasser ist nicht eingeschränkt.

Die Ratten sitzen in speziell angefertigten Plexiglasboxen (290mm lang, 60mm weit, 110mm hoch). In der vorderen Hälfte der Box befindet sich eine stegähnliche Plattform (160mm lang, 20mm weit, 50mm hoch), auf der das Tier sitzt und rechts und links vorbeigreifen kann. Für gewöhnlich ist es den Tieren nicht möglich, sich hier umzudrehen. Im hinteren Abschnitt der Box können sich die Tiere zurückziehen und umdrehen.



**Abb. 7 Versuchsvorrichtung für den Staircase Test.** Die Tiere werden von oben in diese Box gesetzt und bekommen von vorne ein Treppchen mit Futterkugeln hingereicht. Die Zeit, die die Tiere benötigen, um die Pellets zu greifen und zu verzehren, wird gemessen. Es ist möglich, sowohl beide Extremitäten gleichzeitig oder seitengetrennt voneinander („forced choice“) zu beurteilen.

Bei der Durchführung des Tests wird nun von vorne ein Treppchen hineingeschoben, das rechts und links neben dem Steg, auf dem das Tier sitzt, platziert wird. An den Seiten reicht es jeweils bis zur Wand der Box. Dieses Treppchen hat sechs Stufen, von denen die zweite bis zur fünften mit jeweils 10 Futterpellets (á 45 µg) bestückt ist. Das Tier kann links nur mit der linken und rechts nur mit der rechten Vorderpfote greifen. Ein seitenverkehrtes Greifen ist in der Regel nicht möglich, es sei denn, das Tier dreht sich auf

dem Steg. Auf diesem befindet sich eine Deckplatte, die an den Seiten 3 mm übersteht und verhindern soll, dass die Tiere die Pellets an der Wand der Plattform hochziehen.

Bei der bilateralen Testung werden beide Pfoten gleichzeitig über einen Zeitraum von 15 Minuten beobachtet, ab Tag 6 wird der Forced choice Test mit jeweils 5 Minuten pro Vorderpfote durchgeführt. Nach Ablauf der Zeit werden die gegriffenen Pellets und die Anzahl der gegriffenen, aber nicht gefressenen Pellets gezählt, aus denen die Anzahl der gefressenen hervorgeht. Der Quotient aus gegriffenen und gefressenen Pellets und der Gesamtzahl der gegriffenen Pellets ergibt die Erfolgsrate (in %).

## **2.5 Histologische Aufbereitung der Gehirne**

### *2.5.1 Autoradiographie der Hirngewebes*

Zur Bildanalyse der Rattenhirne diente die Autoradiographie. Sie wurde sechs bzw. 20 Wochen nach Transplantation der adulten neuronalen Zellen durchgeführt. Aufgrund der Hirnschnitte konnte eine semiquantitative Auswertung erfolgen, indem die linke gesunde als Referenzwert für die rechte erkrankte Hemisphäre diente.

Den Tieren wurde morgens mit Iod<sup>123</sup> markiertes  $\beta$ -CIT injiziert. Die Aktivität betrug ca. 30 MBq. Dazu wurden die Tiere kurz mit Halothan narkotisiert. Die Aktivität in der Spritze wurde vor und nach der Injektion gemessen, um die Nettoaktivität zu ermitteln, die die Ratte eingespritzt bekommen hat. Nach einer Wartezeit von sechs Stunden wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet und dekapitiert. Mit einer Knochenzange wurde der Rattenschädel eröffnet, indem lateral rechts und links und im Verlauf der Coronarnaht die Schädelkalotte eröffnet und dann zu Seite weggeklappt wurde. Mit einem gebogenen Löffel wurde das Hirn angehoben und von den Hirnnerven sowie im Bereich der Medulla vom Rückenmark getrennt und entnommen. Nach Absetzen vom Bulbus olfactorius wurde das Hirn in eine Petrischale gelegt und für zehn Minuten bei -20 Grad Celsius gekühlt, um es besser schneiden zu können. Daraufhin wurden das Kleinhirn und das Vorderhirn abgesetzt. Das Großhirn wurde coronar in zwei Hälften geteilt. Die vorderen Anteile wurden auf Korkplättchen fixiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um Hirnschnitte anfertigen zu können.

Schnitte wurden sowohl von der Substantia nigra als auch vom Striatum angefertigt. Die Schichtdicke betrug 20  $\mu$ m. Die Schnitte wurden auf Objektträger gezogen, die wiederum auf Autoradiographieplatten gelegt wurden. Die Belichtungszeit betrug 48 Stunden. In einem Scanner wurden die Platten eingelesen und die Bilder digitalisiert abgespeichert.

### 2.5.2 Immunhistochemische Auswertung des Hirngewebes

Die immunhistochemische Auswertung verfolgt folgende Ziele:

1. Detektion der implantierten Progenitorzellen durch Fast Blue Markierung und Nestinexpression
2. Beurteilung der Differenzierungstendenz durch neurale und gliale Marker (Synaptophysin, GFAP) sowie TH als Enzymmarker für dopaminproduzierende Zellen.
3. Prüfung der Vitalität der implantierten Progenitorzellen durch BrdU-Labeling

Um die Prüfung der Vitalität der implantierten Zellen vornehmen zu können, wurde den Ratten sieben Tage vor der Tötung zur Autoradiographie Bromdeoxyuridin (BrdU) verabreicht. Die Dosis betrug 100mg/kgKG und wurde einmal täglich jeden Morgen intraperitoneal appliziert.

BrdU ist ein Thymidinanalogon, das sich *in vitro* und *in vivo* während der S-Phase der Mitose in die DNA einbaut. Es können somit proliferierende Zellen nachgewiesen werden. Es kann immunhistochemisch gut detektiert und durch stereologische Zähltechniken zur Quantifizierung von proliferierenden herangezogen werden. Nachteil dieser Methode ist, daß es prinzipiell nur ein Marker von DNA-Synthetisierungsvorgängen und nicht für Zellteilungen ist. Somit wird es auch in die DNA eingefügt, wenn z.B. Reparaturprozesse an der DNA durchgeführt werden.

Zur Analyse der Differenzierungstendenzen der implantierten Zellen wurden Koronarschnitte des Hirngewebes angefertigt. Aus den Gruppen wurde jeweils ein Tier untersucht. Die Tiere aus Gruppe 1 und 3 waren mit Glaskapillare implantiert und 20 Wochen beobachtet, das Tier aus Gruppe 2 mit Metallkanüle und sechs Wochen, das Tier aus Gruppe 4 mit Glaskapillare und ebenfalls sechs Wochen Beobachtungszeitraum. Damit sollte ein größtmöglicher Überblick über die einzelnen Ergebnisse geschaffen werden. Die Schichtdicke betrug 5µm. Entsprechend den Implantationslokalisationen wurden Präparate von den jeweiligen Strukturen angefertigt (d.h. Striatum und Substantia nigra). Die Schnitte wurden anschließend folgendermaßen fixiert: ein Teil der Objektträger wurden bei Raumtemperatur PFA-fixiert (zunächst 20 min 4% PFA, dann jeweils 5 min in 70 bzw. 100% Ethanol), ein anderer Teil wurde bei – 20°C für 10 min in 100% Aceton fixiert. Daraufhin wurden die Gewebe bei – 80°C gelagert.

Die Schnitte wurden auf die Expression von Nestin, Tyrosinhydroxylase (TH), GFAP (glial fibrillary acidic protein), BrdU und Synaptophysin untersucht.

TH ist das Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese, in die auch die Produktion von Dopamin integriert ist.

Synaptophysin ist ein Glykoprotein in präsynaptischen Vesikeln von Neuronen und neuroendokrinen Zellen. Zusammen mit Synaptobrevin bildet der Synaptophysin-Synaptobrevin-Komplex eine entscheidende Rolle bei Exozytose-Endozytose-Zyklen von axonalen und dendritischen Synapsen.

Nestin ist ein Typ IV Intermediärfilament, das initial als Marker für Stamm- und Progenitorzellen identifiziert wurde, aber auch in anderen Zelllinien (Hämatopoese, Pankreas) eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Im ZNS von Säugetieren wird es in frühen Entwicklungsphasen exprimiert und später durch andere Filamente ersetzt.

GFAP ist ebenfalls ein Intermediärfilament, das vornehmlich in Astrozyten und Zellen glialen Ursprungs vorkommt.

Als Nachweissysteme dienten die Avidin-Biotin- (ABC-) Methode und jeweils die indirekte Immunfluoreszenz-Methode mit Fluorochrom-gekoppeltem Zweitantikörper und unter Verwendung des ABC-Nachweis-Systems.

Zur Detektion der spezifischen Primärantikörper (Nestin, TH, GFAP, BrdU, Synaptophysin) wurde das Vectastatin Elite ABC Kit (Fa. Vector Laboratories, CA, USA) verwendet, das aus folgenden Komponenten besteht:

- Normalserum (Serum aus dem Tier, in dem der Sekundär-Antikörper hergestellt wurde)
- biotinylierte Sekundär-Antikörper (1:200 in 1x PBS verdünnt)
- Ratten-adsorbierter Anti-Maus IgG
- Anti-Kaninchen IgG
- Anti-Ziege IgG
- Avidin-Biotin-Komplex: Reagenz A (Avidin-DH), Reagenz B (biotinylierte Peroxidase)

Zur Sichtbarmachung des Avidin-Biotin-Komplexes wurde AEC-Substratlösung (Fa. Vector Laboratories, CA, USA) eingesetzt, die in Aqua bidest. aus 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) und Acetatpuffer pH 5.2 unter Zugabe von Wasserstoffperoxid stets frisch hergestellt wurde. Die Kernfärbung erfolgte mit Meyers Hämalaun. Dazu wurde 1 g Hämatoxylin (Fa. Merck, Darmstadt) unter Rühren in 1 l Aqua dest. erwärmt; der Lösung wurden 0,2 g NaIO<sub>3</sub> (Fa. Merck, Darmstadt) und 50 g Aluminium-Kaliumsulfat (Fa. Merck, Darmstadt) zugesetzt und für 10 Minuten gerührt. Anschließend wurden 50 g Chloralhydrat (Fa. Serva, Heidelberg) sowie 1 g Citrat x 1 H<sub>2</sub>O (Fa. Serva, Heidelberg) hinzugefügt und für weitere 10 Minuten gerührt. Dies ergab eine rotviolette Lösung, die vor der Verwendung einige Wochen zur Reifung gelagert wurde. Zur Einbettung der Objektträger wurde Elvanol verwendet. Hierzu wurde 1 g Moviol (Fa. Calbiochem, La Jolla, CA, USA) in 3,7 ml PBS über Nacht gerührt, dann 2,3 ml 87%iges Glycerin hinzugegeben und wiederum über Nacht gerührt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 G für 15 Minuten. Die fast blue Markierung, die an den Progenitorzellen vorgenommen wurde, bevor sie implantiert wurden, richtet sich nach folgendem Protokoll: aus Fast Blue Pulver (Sigma) wurde eine Stammlösung in Aqua bidest. hergestellt (10mg/ml), die bei 4 Grad Celsius im Dunklen gelagert wurde.

Die zu markierenden Zellen wurden auf Petrischalen ausplattiert (ca. 90% konfluent). Anschließend wurden sie drei Stunden in einer 0,008%igen Fast Blue Lösung im Brutschrank inkubiert (oben beschriebene Stammlösung entspricht 1%iger Lösung, die 1:125 in Medium verdünnt wird), z.B. 20 µl Stammlösung in 2,5 ml Medium. Daraufhin werden die Zellen trypsiniert, zweimal in frischem Medium gewaschen und für die Implantation auf 105 Zellen pro 5 µl Medium (ohne Zusätze) eingestellt. Restliche Zellen werden auf Objektträger aufgebracht und auf Fluoreszenz überprüft. Die zu implantierenden Zellen werden bis zur Applikation bei Raumtemperatur belassen. Da die Zellen an der Eppendorfgefäßwand adhären, werden sie kurz vor der Implantation gut, aber vorsichtig angespült.

Für die Studie wurde ein Ethikantrag bei der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg gestellt und bewilligt (Antragsnummer 05/2003). Für die Tierversuche wurde ein Antrag bei dem Regierungspräsidium Karlsruhe gestellt und am 06.09.2002 genehmigt (AZ: 35-9185.81/G-83/02). Die Experimente wurden im Jahre 2003-2004 über die Neurochirurgie der Universität Heidelberg durchgeführt. In Kooperation beteiligt waren das Tierlabor, das Molekularbiologische Labor der Neurochirurgie und die Pathologie der Universität sowie das DKFZ.

### 3. ERGEBNISSE

Nach Gewinnung der Daten wurde eine explorative Datenanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Daten der vier mit Stammzellen behandelten Gruppen und der Kontrolltiere gegenübergestellt. Für die Deskription der Ergebnisse und für den Vergleich der Gruppen wurden der Median, das Minimum (Min) und Maximum (Max) herangezogen.

Zusätzlich wird eine Deskription der Bildmorphologie vorgenommen. Hierbei werden Bilder einbezogen, die anhand der oben beschriebenen Methodik gewonnen wurden und eine Deskription zulassen. Es wurden Bilder aus der Immunhistochmie als auch der Autoradiographien berücksichtigt.

Eingeschlossen wurden Daten, die während der Apomorphin- und Amphetamin-Rotation gewonnen wurden. Zudem wurden beide Extremitäten im Side Stepping-, Side Falling- und die linke Extremität im Staircase-Test betrachtet. Die Werte wurden im Zustand vor der 6-OHDA-Operation, sechs Wochen nach der 6-OHDA Läsion und sechs und 20 Wochen nach der Stammzellimplantation gewonnen.

Die Anzahl der Tiere in der ersten Spalte ( $n=x$ ) entspricht der Anzahl, die über einen 6-Wochen beobachtet wurde; Tiere die nach 20 Wochen beurteilt werden konnten, sind separat in der letzten Spalte (ebenfalls mit  $n=x$ ) aufgeführt.

Die Ermittlung der Daten erfolgt mit der Software SPSS. Die beiden Nachkommastellen in den Rotationen wurden beibehalten, weil aufgrund der Datenerfassung während des Versuchs auch unvollständige Drehungen erfasst wurden.

Die Daten im Side Stepping und Side Falling Test ergeben sich aus Mittelung der Werte der einzelnen Tiere für Vorhand (VH) und Rückhand (RH) bzw. rechts und links und daran anschließend o.g. statistische Angaben.

Für den Staircase Test wurden zunächst die Mediane aus Gegriffen und Gefressen kalkuliert, aus denen sich dann die Erfolgsrate ergibt.

Die Daten für die einzelnen Tests werden nun im Folgenden aufgeführt.

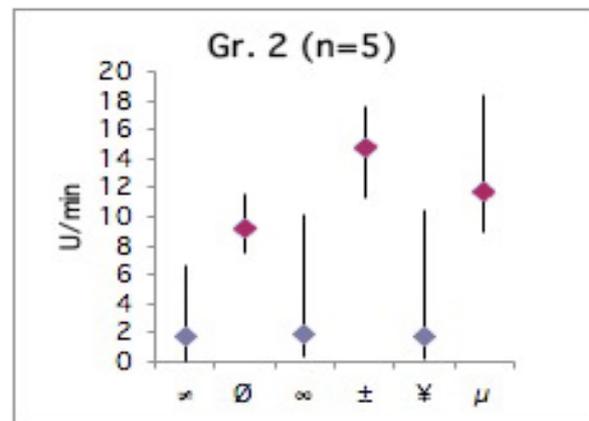
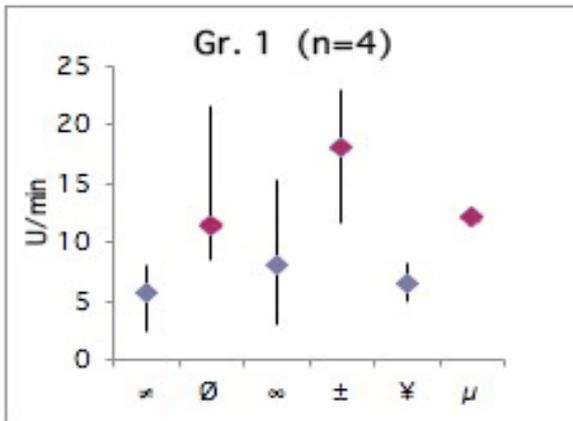
#### 3.1 ANALYSE DES VERHALTENS

##### 3.1.1 ROTATIONSVERHALTEN

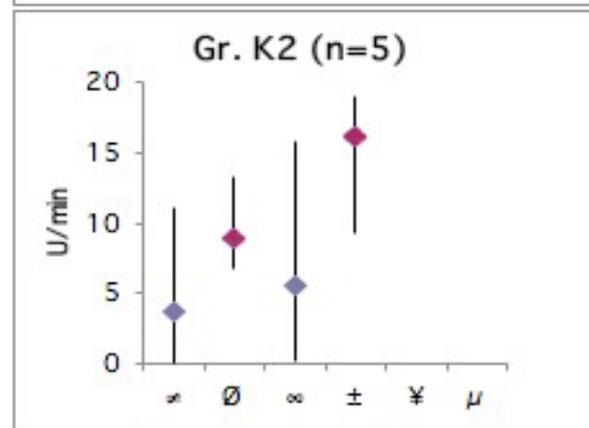
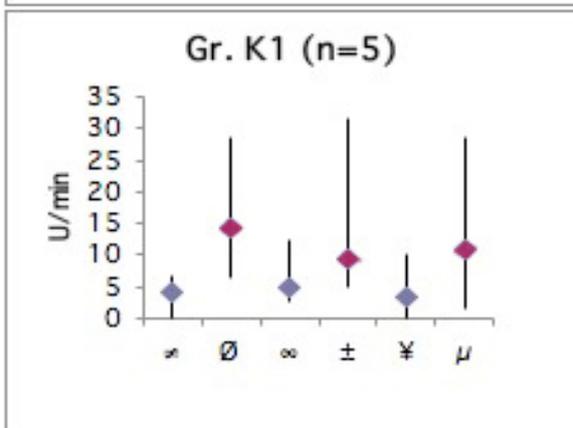
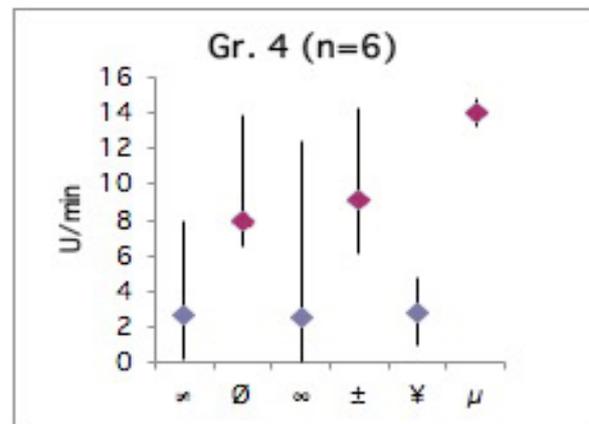
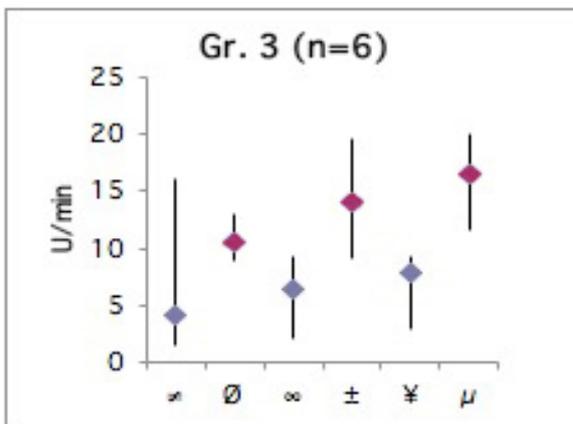
Anhand des Rotationsverhaltens soll eruiert werden, ob die Tiere tatsächlich erkrankt sind. Dazu wird einerseits Apomorphin- und andererseits Amphetamin appliziert. Die Kriterien, die auf eine Läsion des Tiers hinweisen, sind hinreichend erfüllt, wenn nach Apomorphin- vier Nettoumdrehungen und nach Amphetaminverabreichung sechs Nettoumdrehungen/Min registriert werden.

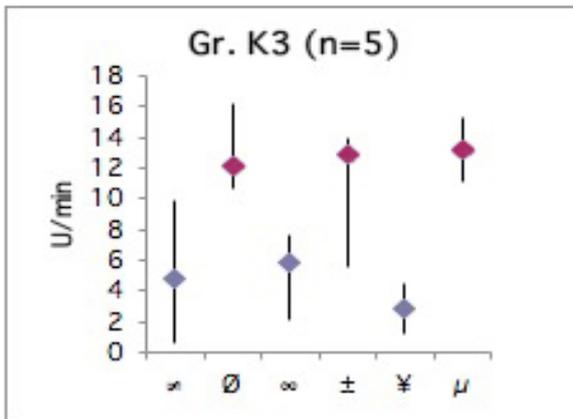
Die nachstehenden Graphiken zeigen das Rotationsverhalten der mit Progenitorzellen behandelten Gruppen 1-4 und die Kontrollgruppen K1-K3. Aufgeführt sind die beiden Testdurchgänge nach Applikation von Apomorphin oder Amphetamin in den Phasen nach der Operation (post-Lx), 6 Wochen (post-Tx 6 Wo) und 20 Wochen nach der Stammzellimplantation (post-Tx 20 Wo). Der Beobachtungszeitraum innerhalb der Studie wurde geändert, so daß in den Gruppen 1, 4 und K3 jeweils zwei und in den Gruppen 2, 3 und K1 jeweils fünf Tiere graphisch dargestellt sind. In der Gruppe K2 haben zu dem Zeitpunkt keine Tiere mehr gelebt. Die Anzahl der Tiere, die 6 Wochen nach der Implantation in die Auswertung eingegangen sind, ist der Tabelle 1 im Teil Material und Methoden zu entnehmen

Aufgeführt ist die Anzahl der Nettoumdrehungen pro Minute als Median (lila, rot), die beiden Enden der senkrechten Balken markieren jeweils Minimum und Maximum.



Legende 1: ∞ post lx apo, Ø post lx amph, ∞ post tx 6 wo apo, ± post tx 6 wo amph, ¥ post tx 20 wo apo, μ post tx 20 wo amph





**Abb. 8 Apomorphin- und amphetamininduziertes Rotationsverhalten in den einzelnen Versuchsabschnitten.** Vier Wochen nach Läsion und sechs bzw. 20 Wochen nach Transplantation wurde das Rotationsverhalten nach Injektion von 0,05 mg/kg KG Apomorphin und 2,5 mg/kg KG Amphetamin getestet. In allen Gruppen läßt sich erkennen, daß das Rotationsverhalten im Verlauf und v.a. nach Verabreichung von Amphetamin zunimmt. Im apomorphininduzierten Verhalten zeigen sich teilweise stagnierende bzw. nur leicht ansteigende Werte in den einzelnen Beobachtungszeiträumen. In Gruppe K2 sind 20 Wochen nach Transplantation keine Tiere mehr vorhanden, so daß für diesen Beobachtungszeitraum die Balken fehlen. ♦ Median Apomorphin, ♦ Median Amphetamin, ∞ post lx apo, Ø post lx amph, ∞ post tx 6 Wo Apo, ± post tx 6 Wo Amph, ¥ post tx 20 Wo Apo, μ post tx 20 Wo Amph.

In Gruppe 1 (frühe Zellpassage/Striatum) haben die Tiere die Einschlußkriterien sowohl für die Apomorphin- (> 4 Nettoumdrehungen/Min) als auch für die Amphetaminrotation (> 6 Nettoumdrehungen/Min) nach der Läsion mit 5,74 bzw 11,35 Umdrehungen/Min im Median erfüllt. Sechs Wochen nach Implantation der Stammzellen zeigt die Gruppe in beiden Tests höhere Werte im Vergleich zu den post-Lx Daten. Zwei Tiere, die aus dieser Gruppe nach 20 Wochen getestet werden konnten, erzielten im Vergleich zu den 6-Wochen-Daten um 18% geringere Werte, die jedoch im Vergleich zu den post-Lx Daten nach Applikation beider Substanzen um 14% höher bleiben.

Die Tiere der Gruppe 2 (frühe Zellpassage/Substantia nigra) haben für die Apomorphinrotation das Einschlußkriterium im Median mit 1,79 Umdrehungen/Min nicht erreicht. Für die Amphetaminrotation werden die Voraussetzungen für eine ausreichende Läsion der Tiere mit 9,14 Umdrehungen/Min erfüllt. Für beide Testsubstanzen sind die Werte sechs Wochen nach Implantation der Stammzellen im Vergleich zum post-Lx Zustand erhöht. Dies gilt v.a. für das Rotationsverhalten nach Amphetaminapplikation. 20 Wochen nach Implantation der Stammzellen zeigt sich in der Apomorphinrotation tendenziell kaum Veränderung (1,70 Umdrehungen/Min), in der Amphetaminrotation sinkt der Wert auf 11,67 Umdrehungen/Min nach 14,76 Umdrehungen in der Untersuchung 6 Wochen post-Tx. Damit ist er jedoch im Vergleich zur post-Lx Testung (9,14 Umdrehungen/min) immer noch um 21,7% erhöht. In dieser Gruppe konnten fünf Tiere 20 Wochen nach Transplantation getestet werden.

Die Gruppe 3 erfüllt die Einschlußkriterien sowohl für die Apomorphin- (4,21 Umdrehungen/Min) als auch für die Amphetamin-Rotation (10,53 Umdrehungen/Min). Sechs Wochen nach Implantation der Stammzellen zeigen sich nach Applikation beider Substanzen um 53,4% bzw. 32,5% erhöhte Rotationsfrequenzen. Fünf Tiere konnten nach 20 Wochen getestet werden. Dort zeigen sich weiter angestiegene Werte auf 7,80 Nettoumdrehungen in der Apomorphin- und 16,63 Umdrehungen/Min in der

Amphetaminrotation. Dies entspricht einer Zunahme um 85,3% bzw. 57,9% gegenüber dem post-Lx Zustand.

Die Gruppe 4 erfüllt für die Apomorphinrotation nicht das Einschlußkriterium von 4 Nettoumdrehungen/Min. Der Median liegt bei 2,70 Umdrehungen. Für die Amphetaminrotation werden die Voraussetzungen für eine ausreichende Läsion der Tiere mit 7,92 Umdrehungen/Min erfüllt. Nach sechs und 20 Wochen nach Zellimplantation bleiben die Werte in der Apomorphinrotation nahezu unverändert (2,46 bzw. 2,84 Umdrehungen/Min im Median). In der Amphetaminrotation steigen die Werte um 15,5% bzw. 76,4% auf 9,15 und 13,97 Umdrehungen/Min. Aus dieser Gruppe konnten zwei Tiere nach 20 Wochen getestet werden.

Die Kontrollgruppe K1 erfüllt die Einschlußkriterien sowohl für die Apomorphin- (4,18 Umdrehungen/Min) als auch für die Amphetaminrotation (14,27 Umdrehungen/Min). In der Apomorphinrotation sechs Wochen post-Tx zeigt sich ein Anstieg des Wertes um 20,1% auf 5,02 Umdrehungen/Min, der nach 20 Wochen post-Tx auf 3,35 Umdrehungen/Min absinkt. In der Amphetaminrotation ist zunächst ein Abfall des Wertes auf 9,49 Umdrehungen zu verzeichnen. Nach 20 Wochen betrug die Anzahl der Umdrehungen 10,98. Damit liegt dieser Wert um 23,1% unter dem Ausgangswert in der post-Lx Registrierung. In dieser Gruppe konnten fünf Tiere nach 20 Wochen erneut beurteilt werden.

Die Kontrollgruppe K2 erfüllt das Einschlußkriterium in der Amphetaminrotation mit 8,97 Umdrehungen/Min. In der Apomorphinrotation wird dieses mit 3,71 Umdrehungen nicht erreicht. Beide Werte steigen nach sechs Wochen post-Tx um 47,4% nach Apomorphin- und 79,1% nach Amphetaminapplikation auf 5,47 und 16,07 Umdrehungen/Min. Für eine Beurteilung 20 Wochen nach Sham-Implantation standen keine Tiere zur Verfügung.

Die Kontrollgruppe 3 erfüllt sowohl für die Apomorphin- als auch für die Amphetaminrotation die Einschlußkriterien (4,83 bzw. 12,17 Umdrehungen/Min). Nach sechs Wochen post-Tx zeigt sich in beiden Tests ein geringe Zunahme der Umdrehungen auf 5,92 bzw. 12,93 Umdrehungen/Min. Nach 20 Wochen post-Tx fällt der Wert nach Apomorphinapplikation auf 2,87 Umdrehungen. Dies entspricht einer Reduzierung vom Ausgangswert post-Lx um 40,6 %. In der Amphetaminrotation erhöht sich der Wert auf 13,16 Umdrehungen. In der Beobachtung 20 Wochen post-Tx sind zwei Tiere eingeflossen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß man bei vier Gruppen (Gr. 1, 3, K1, K3) von vollständigen Läsionen ausgehen kann. In den drei anderen Gruppen (Gr. 2, 4, K2) sind Tiere enthalten, bei denen möglicherweise eine nur partielle Läsion vorliegt, da sie während der Apomorphinrotation nur unzureichende Resultate zeigten. Bei der Amphetaminrotation erfüllten alle Tiere das Einschlußkriterium von 6 Nettoumdrehungen/Min.

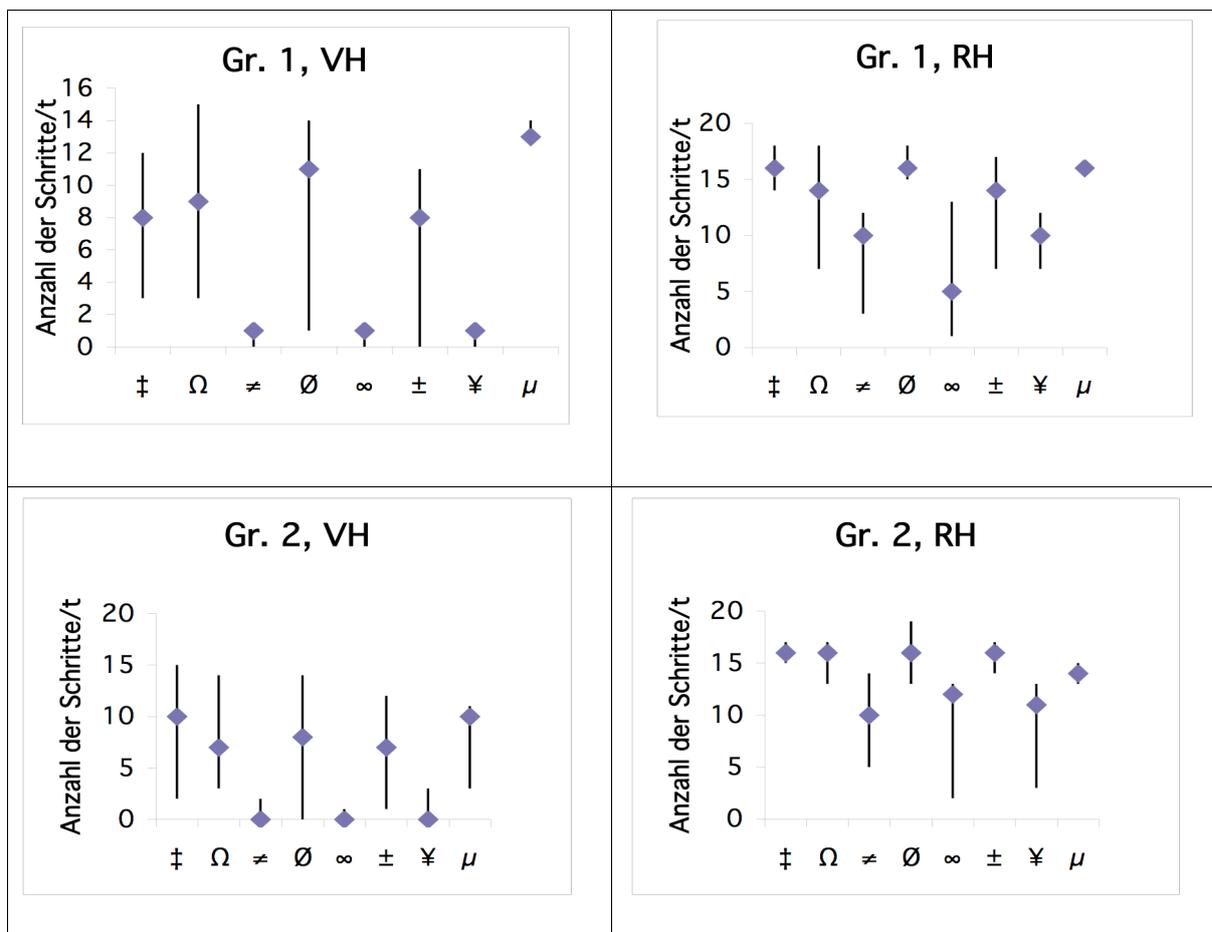
Hinsichtlich eines möglichen Benefits fallen v.a. die Gruppen 1 und 2 auf, bei denen nach 20 Wochen ein Rückgang der Rotationsfrequenz (nach Amphetaminapplikation) bzw. zumindest ein Stagnieren des Roatationsverhaltens zu verzeichnen ist.

### *3.1.2 SIDE STEPPING TEST*

Der Side Stepping Test dient zur Beurteilung komplexer motorischer Einschränkungen der vorderen Extremitäten, insbesondere der Akinesie. In den unten dargestellten Grafiken sind die Werte für die behandelten und die Kontrollgruppen aufgeführt. Daten wurden vor der

Läsion (prä-Lx) registriert und als Referenzwerte für die Zustände nach der 6-OHDA-Operation (post-Lx) und für die Beobachtungszeiträume sechs und 20 Wochen nach Implantation (post-Tx 6 bzw. 20 Wo) herangezogen.

Dokumentiert ist die Anzahl der Schritte eines Tiers auf eine Distanz von 90 cm, die das Tier in 30 Sekunden zurücklegt. Dabei wird das Tier einmal in Vorhand- (VH) und in Rückhandrichtung (RH) geführt (s. auch Material u. Methoden). Dargestellt sind der Median, das Minimum und das Maximum, aufgerundet auf ganze Zahlen. Die Werte werden nun im Folgenden erläutert.



**Abb. 9 Sidestepping Test in Vorhand- und Rückhandrichtung der Gruppen 1-2.** Gesunde Tiere führten vor Läsion (‡, Ω) deutlich mehr Schritte in beiden Richtungen aus als in den beobachteten Zeiträumen nach Läsion (≠, Ø) bzw. Implantation (übrige Symbole). Die Akinesie wird v.a. in Vorhandrichtung der linken Vorderpfote deutlich. ◆ Median, VH Vorhand, RH Rückhand, ‡ prä lx li, Ω prä lx re, ≠ post lx li, Ø post lx re, ∞ post tx 6 Wo li, ± post tx 6 Wo re, ¥ post tx 20 Wo li, μ post tx 20 Wo re.

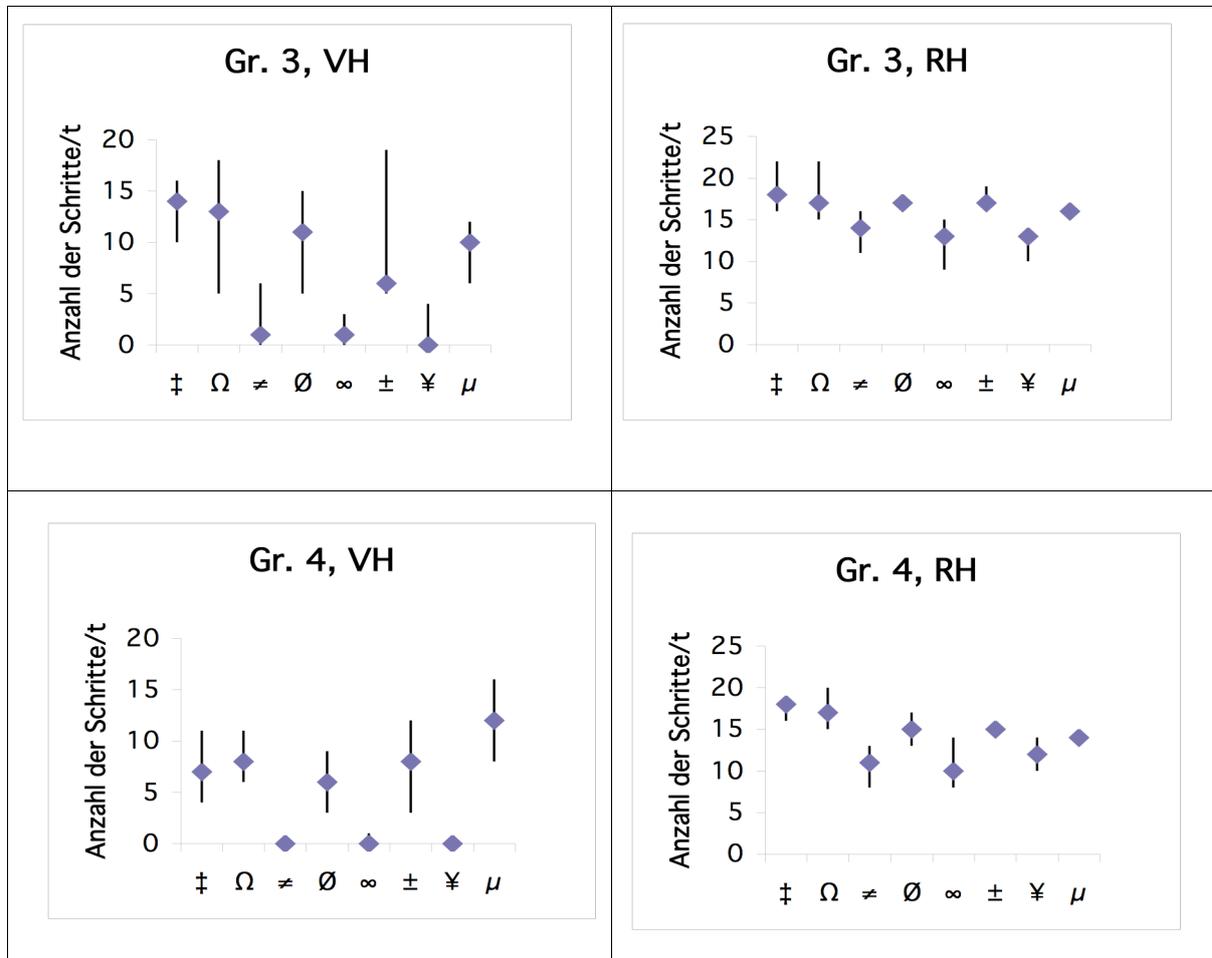
In der Gruppe 1 zeigen sich nach der Läsion mit 6-OHDA eine um 87 % in der Vorhand- und um 37 % in der Rückhandrichtung verminderte Frequenz der Schritte. Die Anzahl der Schritte in der Vorhand ist nach sechs und 20 Wochen post implantationem weiter gesunken. In der Rückhandrichtung sinkt sie bis zum 6 Wochen post-Tx Zeitraum ebenfalls weiter ab (5 Schritte im Median), um dann nach 20 Wochen auf 10 Schritte anzusteigen. Nach diesem Zeitraum konnten zwei Tiere beobachtet werden.

Ipsilateral zur Läsion konnte in der Rückhandrichtung eine Kontinuität der Werte um 14-16 Schritte beobachtet werden. In der Vorhand schwankten die Werte zwischen acht und 13, sind aber deutlich höher als auf der kontralateralen Seite.

In der Gruppe 2 zeigt sich ein ähnliches Bild. Dort zeigt sich in der linken Vorhand eine Reduzierung der Schritte um nahezu 100 %. In der Rückhand fällt der Wert um 37 % auf

10 Schritte (post-Lx). In den Beobachtungszeiträumen sechs und 20 Wochen nach der Implantation steigen die Werte auf 12 und 11 Schritte. Dabei ist zu berücksichtigen, daß diese Gruppe das Einschlußkriterium von 4 Nettoumdrehungen/Min während der Apomorphinrotation nicht erfüllte.

Ipsilateral zur Läsionsseite zeigen die Tiere nahezu unveränderte Werte. Nach 20 Wochen konnten fünf Tiere nochmals beurteilt werden.



**Abb. 10 Sidestepping Test in Vorhand- und Rückhandrichtung der Gruppen 3-4.** Auch in diesen Gruppen zeigt sich eine deutlich Akinesie in der linken Vorderpfote. Auffällig in diesen beiden Gruppen sind die geringeren Amplituden der Balken, so daß innerhalb der Gruppen der höchste und niedrigste Schrittwert enger beieinander liegen. ◆ Median, VH Vorhand, RH Rückhand, ‡ prä Lx li, Ω prä Lx re, ≠ post Lx li, Ø post Lx re, ∞ post Tx 6 Wo li, ± post Tx 6 Wo re, ¥ post Tx 20 Wo li, μ post Tx 20 Wo re.

In der Gruppe 3 treten die gleichen Erscheinungen auf der kontralateralen Seite zur Läsion auf. In der post-Lx-, post-Tx 6 Wo- und 20 Wochen Phase zeigen sich sowohl auf der Vorhand- als auch in der Rückhandrichtung deutlich verminderte Werte im Vergleich zur prä-Lx Phase. In den Zeiträumen sechs und 20 Wochen post implantationem stagnieren die Werte und pendeln sich auf 13 Schritte/Distanz ein. Nach 20 Wochen konnten fünf Tiere erneut beurteilt werden.

In der Gruppe 4 sinken die Werte in der Vorhand- um nahezu 100 % und in der Rückhandrichtung um ca. 38 % (post-Lx) bzw. ca. 44% (post-Tx 6 Wo) gegenüber den prä-Lx Daten. Nach 20 Wochen post-Tx zeigt sich hier eine tendenziell um 20 % erhöhte Schrittfrequenz gegenüber 6 Wochen post-Tx. Hierbei muß jedoch wieder eine

unvollständige Läsion vorausgesetzt werden. Die rechte vordere Extremität zeigt in der Vorhandrichtung post-Lx ebenfalls eine um ca. 25 % reduzierte Leistungsfähigkeit, die sich im weiteren Verlauf jedoch wieder erhöht und mit 12 Schritten 20 Wochen post implantationem den prä-Lx Referenzwert übersteigt. In der Rückhandrichtung zeigt sich ipsilateral zur Läsion in den Beobachtungsphasen eine Reduzierung der Schrittfrequenz um insgesamt ca. 18 %. Nach 20 Wochen konnten zwei Tiere erneut beurteilt werden.

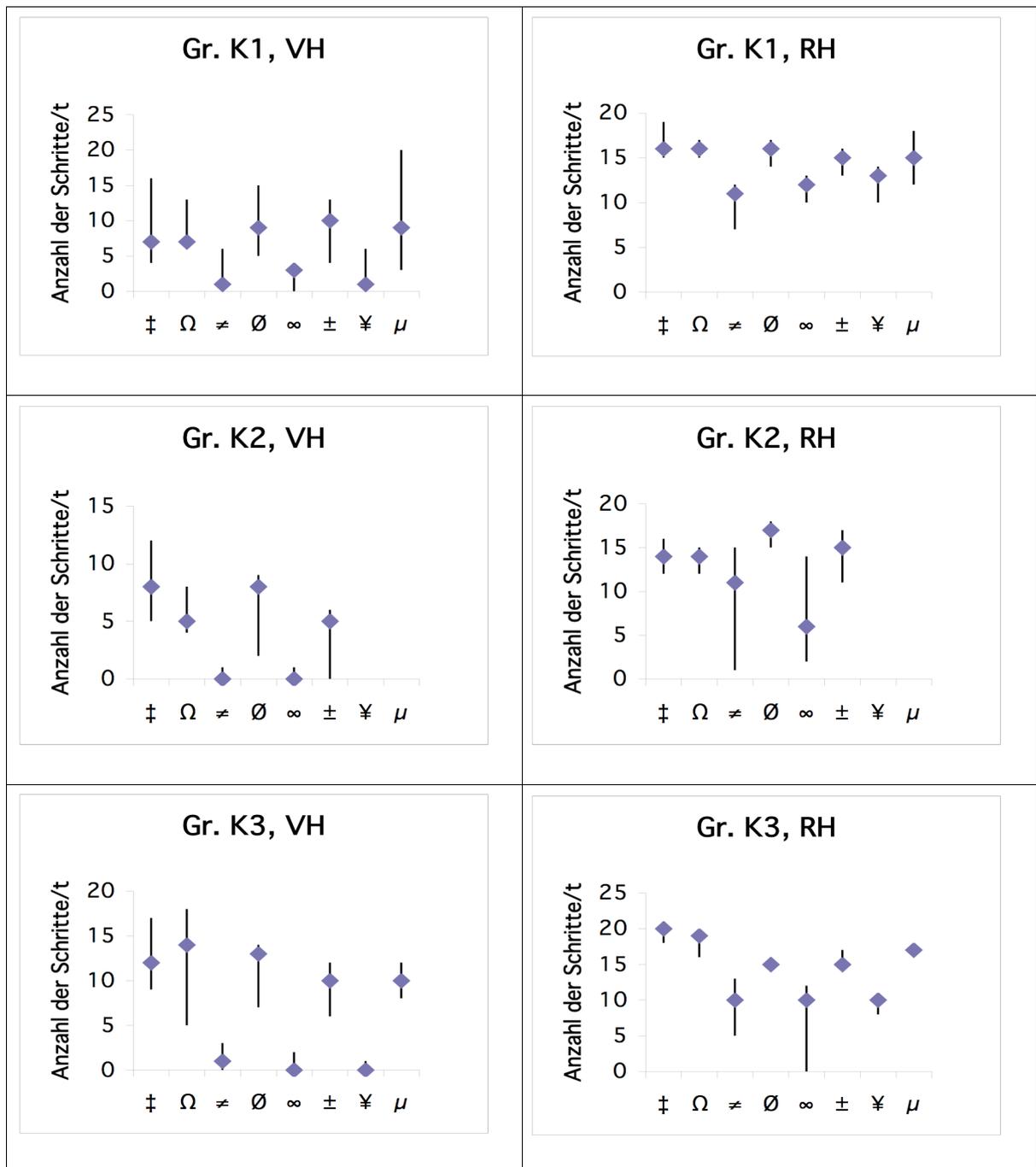
In den Kontrollgruppen zeichnet sich ein ähnliches Bild ab wie in den zuvor aufgeführten Gruppen. In der post-Lx Beobachtung sind für die linke Extremität deutlich verminderte Werte in beiden Richtungen zu verzeichnen (VH ca. 100 %, RH ca. 50 - 21%).

Auffällig ist eine Erhöhung der Werte in der Gruppe K1 von 11 Schritten post-Lx über 12 Schritte post-Tx 6 Wo. auf 13 Schritte in der Rückhand nach 20 Wochen post implantationem, obwohl dem Rotationsverhalten entsprechend eine vollständige Läsion vorliegen müßte. In Gruppe K2 und K3 bleibt eine deutlich verminderte Schrittfrequenz kontralateral in beiden Richtungen bestehen. Die rechte Vorderpfote zeigt für alle drei Kontrollgruppen nahezu konstante Ergebnisse in beiden Testvarianten (VH und RH).

In der Gruppe K1 konnten fünf Tiere, in K3 zwei Tiere nach 20 Wochen beurteilt werden. Durch die nachhaltige Änderung des Designs im Laufe der Studie, standen für die Gruppe K2 keine Ratten nach 20 Wochen mehr zur Verfügung.

Zusammenfassend läßt sich für diesen Test sagen, daß für die Vorhandrichtung ein deutliches kontralaterales Defizit in allen Gruppen zu verzeichnen ist. Im Verlauf können nach Implantation für die Vorhandrichtung kaum Benefits dargestellt werden. Die Anzahl der Schritte stagniert bzw. verschlechtert sich in der Folge noch deutlicher.

Auch für die Rückhandrichtung zeigen sich durchgehend schlechtere Werte nach der Läsion. Jedoch zeigen sich v.a. in dieser Richtung bei allen Gruppen, daß die Werte in den Beobachtungszeiträumen stabil bleiben (Gr. 2, 3, K3) oder daß es zu einer Zunahme der Schrittfrequenz kommt (Gr. 1, 4, K1). Wie ersichtlich, gilt dies allerdings auch für die Kontrollgruppen.



**Abb. 11 Sidestepping Test in Vorhand- und Rückhandrichtung der Gruppen K1-K3.** Kontrolltiere zeigten ebenfalls eine deutliche linksseitige Vorderpfotenakinesie, die in den beobachteten Zeiträumen relativ gleiche Werte für Vor- und Rückhand aufweist. ◆ Median, VH Vorhand, RH Rückhand, ‡ prä lx li, Ω prä lx re, ≠ post lx li, Ø post lx re, ∞ post tx 6 Wo li, ± post tx 6 Wo re, ¥ post tx 20 Wo li, μ post tx 20 Wo re.

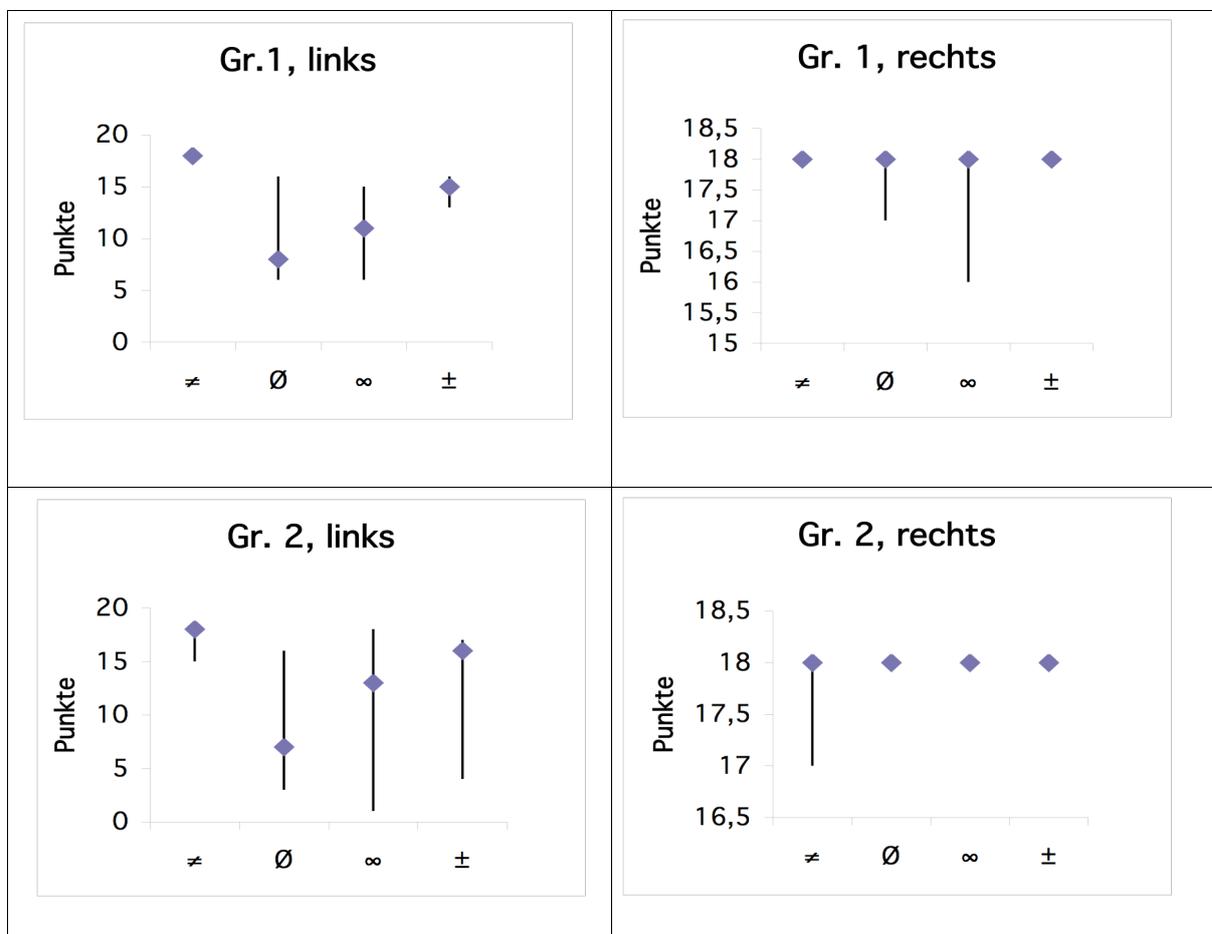
### 3.1.3 SIDE FALLING TEST

Ergänzend zum Side Stepping- haben wir den Side Falling Test durchgeführt. Er dient zur Verdeutlichung des Koordinationsvermögens des Tier. Man dreht die Ratte mit fixierten Hinterläufen abrupt auf die Seite und registriert, wie schnell das Tier die fragliche

Vorderpfote unter den Körper bekommt, um das Gleichgewicht zu halten. Die Reaktion wird anhand einer Punkteskala von 0-3 (ohne Dimension) dokumentiert. Der Test wird sechsmal am Tag pro vordere Extremität durchgeführt. Somit kann ein Maximalwert von 18 entstehen (s. auch Material/ Methoden).

In den nachfolgenden Graphiken sind die Werte für die behandelten und die Kontrollgruppen aufgeführt. Daten wurden vor der Läsion (prä-Lx) registriert und erneut als Referenzwerte für die Zustände nach der 6-OHDA-Operation (post-Lx) und für die Beobachtungszeiträume sechs und 20 Wochen nach Implantation (post-Tx 6 bzw. 20 Wo) herangezogen. Die Anzahl der Tiere, die im letztgenannten Zeitraum beurteilt werden konnten, sind nochmals gesondert in der post-Tx 20 Wo-Spalte aufgeführt.

Die Werte zeigen den Median der Maximalwerte an, die innerhalb einer Gruppe in den Testzeiträumen erreicht wurden. In Klammern sind das Minimum und Maximum aufgeführt.

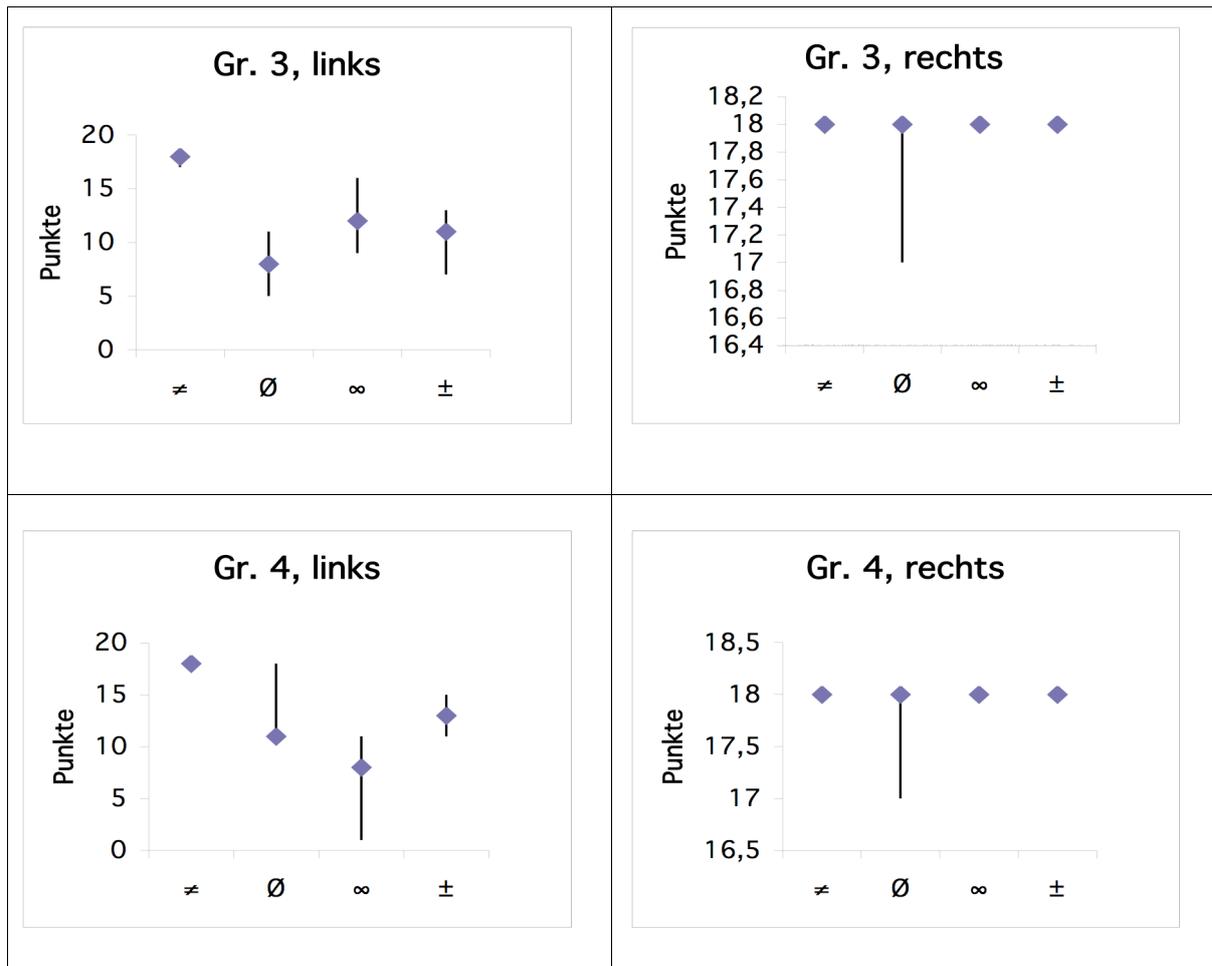


**Abb. 12 Side Falling Test der Gruppen 1-2.** Nach Läsion (∅) der linken Extremität durch die rechtscerebrale Operation sieht man einen deutlichen Punkteabfall, der sich nach 6 (∞) bzw. 20 Wochen (±) post transplantationem zu erholen scheint. Die rechte Vorderpfote bleibt in diesen beiden Gruppen nahezu unbeeinträchtigt, was sich schon an der Skalierung erkennen läßt. ◆ Median, ≠ prä Lx, ∅ post Lx, ∞ post tx 6 Wo, ± post tx 20 Wo.

In der Gruppe 1 zeigt sich nach der 6-OHDA-Läsion (post-Lx) eine deutliche Reduktion der Koordinationsfähigkeit um 66 % in der linken Vorderpfote. Nach 6 Wochen post-Tx scheint es eine tendenzielle Erhöhung des Werts zu geben, das Minimum und Maximum bleiben jedoch nahezu unverändert. Die beiden Tiere, die nach 20 Wochen erneut beurteilt werden konnten, zeigen eine deutliche Erhöhung der Koordination im Median, Minimum

und Maximum. Die rechte Vorderpfote blieb nach der Läsion vollständig intakt. Die Werte blieben über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant.

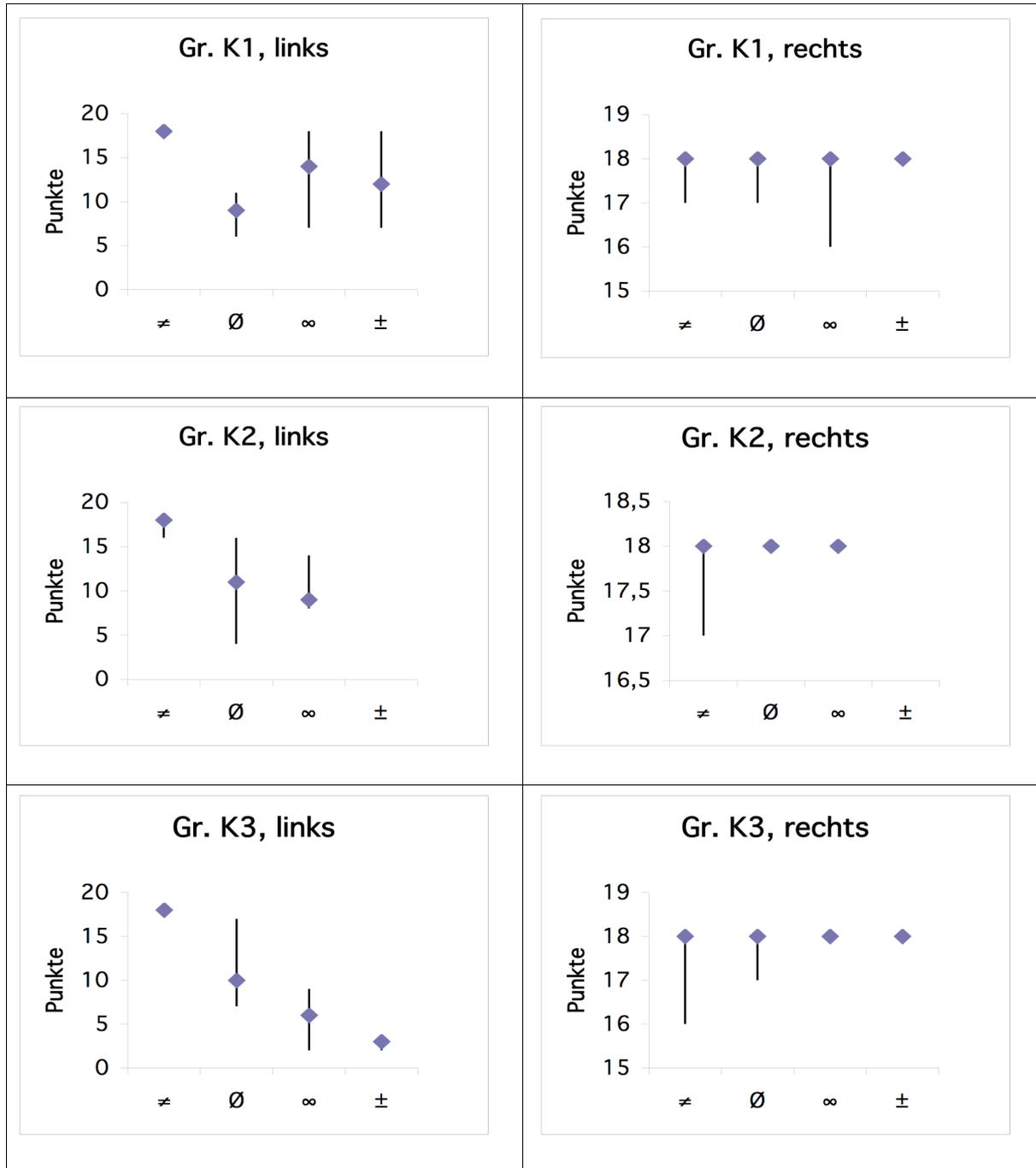
In der Gruppe 2 erscheinen die erfassten Daten sehr ähnlich zu denen der Gruppe 1. Auch hier reduziert sich der Wert nach der Operation (post-Lx) deutlich (39 % des prä-Lx Wertes) und scheint dann im weiteren Verlauf anzusteigen. Minimum und Maximum verändern sich aber nur unwesentlich. Bei dieser Gruppe gilt erneut, daß möglicherweise eine unvollständige Läsion vorliegt und somit eine Spontanverbesserung möglich ist. Die ipsilateral zur Läsion gelegene Seite zeigt über den gesamten Zeitraum der Studie nahezu unveränderte Werte. Nach 20 Wochen konnten fünf Tiere erneut beurteilt werden.



**Abb. 13 Side Falling Test der Gruppen 3-4.** In diesen beiden Gruppen läßt sich ebenfalls eine Abnahme der Punktzahl post lesionem erkennen. In Gruppe 4 scheint das motorische Defizit nach 6 Wochen noch zuzunehmen, um sich nach 20 Wochen zu verbessern. Auch in diesen beiden Gruppen scheint die rechte vordere Extremität unbeeinträchtigt von der Läsion zu bleiben. ◆ Median, ≠ prä lx, ∅ post lx, ∞ post tx 6 Wo, ± post tx 20 Wo.

Gruppe 3 zeigt im post-Lx Zeitraum eine Reduktion des Werts um ca. 66 %. Auch hier findet sich wiederum eine scheinbar erhöhte Koordinationsfähigkeit im weiteren Verlauf: sechs bzw. 20 Wochen post implantationem steigen die Werte auf 12 bzw. 11. Minimum und Maximum steigen ebenfalls. Die rechte Vorderpfote scheint von der Läsion nicht betroffen. Die Werte bleiben über den gesamten Studienzeitraum konstant. Nach 20 Wochen konnten fünf Tiere erneut getestet werden.

Die Gruppe 4 zeigt einen Wert, der 61 % des prä-Lx Zustands entspricht. Dieser reduzierte sich im weiteren Verlauf um weitere 17 % auf 8 als Median. Zwei Tiere, die nach 20 Wochen beurteilt wurden, zeigen einen Median von 13, was 72 % des Ausgangswertes im unlädierten Zustand entspricht. Die rechte Vorderpfote zeigt keine Veränderungen und bietet über den gesamten Zeitraum den Maximalwert von 18.



**Abb. 14 Side Falling Test der Gruppen K1-K3.** In den Kontrollgruppen ist ebenfalls ein Vorderpfotendefizit der linken Seite zu erkennen, was sich in der verminderten Punktezahl post lesionem darstellt. In Gr. K1 scheint es jedoch eine spontane Verbesserung der Leistung zu geben, wenn man den Median als Vergleichswert heranzieht. Das Minimum nimmt jedoch auch zu, so daß leicht erhöhte Werte zu verzeichnen sind. Besonders deutlich wird die Vorderpfotenakinesie in Gruppe K3. Die rechte Vorderpfote zeigt durchgehend unauffällige Werte. ◆ Median, ≠ prä lx, ∅ post lx, ∞ post tx 6 Wo, ± post tx 20 Wo.

In den Kontrollgruppen K1-K3 zeichnet sich ein ähnliches Bild ab. Im post-Lx Zustand zeigt sich eine deutliche Reduktion des Maximalwertes zwischen 50 – 61 % auf der kontralateralen Seite. Auffällig ist, wie im zuvor beschriebenen Testverfahren, eine Erhöhung der Werte in der Kontrollgruppe K1, obwohl nur eine Scheinimplantation mit Nährmedium durchgeführt wurde. In Kontrollgruppe K2 und K3 werden im weiteren Verlauf jeweils schlechtere Ergebnisse im Vergleich zur Voruntersuchung erzielt. Die rechte vordere Extremität blieb in allen drei Kontrollgruppen intakt und zeigte über den gesamten Studienzeitraum konstante Werte. In Kontrollgruppe K1 konnten nach 20 Wochen fünf, in K3 zwei Tiere erneut getestet werden. Zusammenfassend läßt sich für diesen Test sagen, daß die kontralaterale Seite nach Läsion mit 6-OHDA deutlich beeinträchtigt wird. Im weiteren Verlauf kommt es in den Gruppen 1-4 jedoch zu einer zunehmenden Punktzahl, wenn man die Mediane betrachtet. Für die ipsilaterale Seite scheinen keine Defizite in den Beobachtungsintervallen aufzutreten. Hier zeigten sich durchgehend konstante Werte.

#### *3.1.4 STAIRCASE TEST*

Mit Hilfe des Staircase Tests lassen sich auf der einen Seite das gezielte Greifen des Tiers nach einem Futterpellet, zum anderen die gerichtete Rückführung des Pellets zum Maul untersuchen; der Quotient aus Gegriffen und Gefressen ergibt die Erfolgsrate in Prozent. Damit läßt sich die Genauigkeit von koordinierten Bewegungen quantifizieren.

Man kann diesen Test bei beiden Vorderpfoten gleichzeitig durchführen (bilateral) oder jede Extremität seitengetrennt beurteilen (forced choice). Aufgeführt sind die Werte für die linke Vorderpfote.

In den folgenden Abbildungen sind die Werte für die behandelten und die Kontrollgruppen graphisch dargestellt. Daten wurden vor der Läsion (prä-Lx) registriert und als Referenzwerte für die Zustände nach der 6-OHDA-Operation (post-Lx) und für die Beobachtungszeiträume sechs und 20 Wochen nach Implantation (post-Tx 6 bzw. 20 Wo) herangezogen. Die Anzahl der Tiere, die im letztgenannten Zeitraum beurteilt werden konnten, sind gesondert in der post-Tx 20 Wo-Spalte aufgeführt.

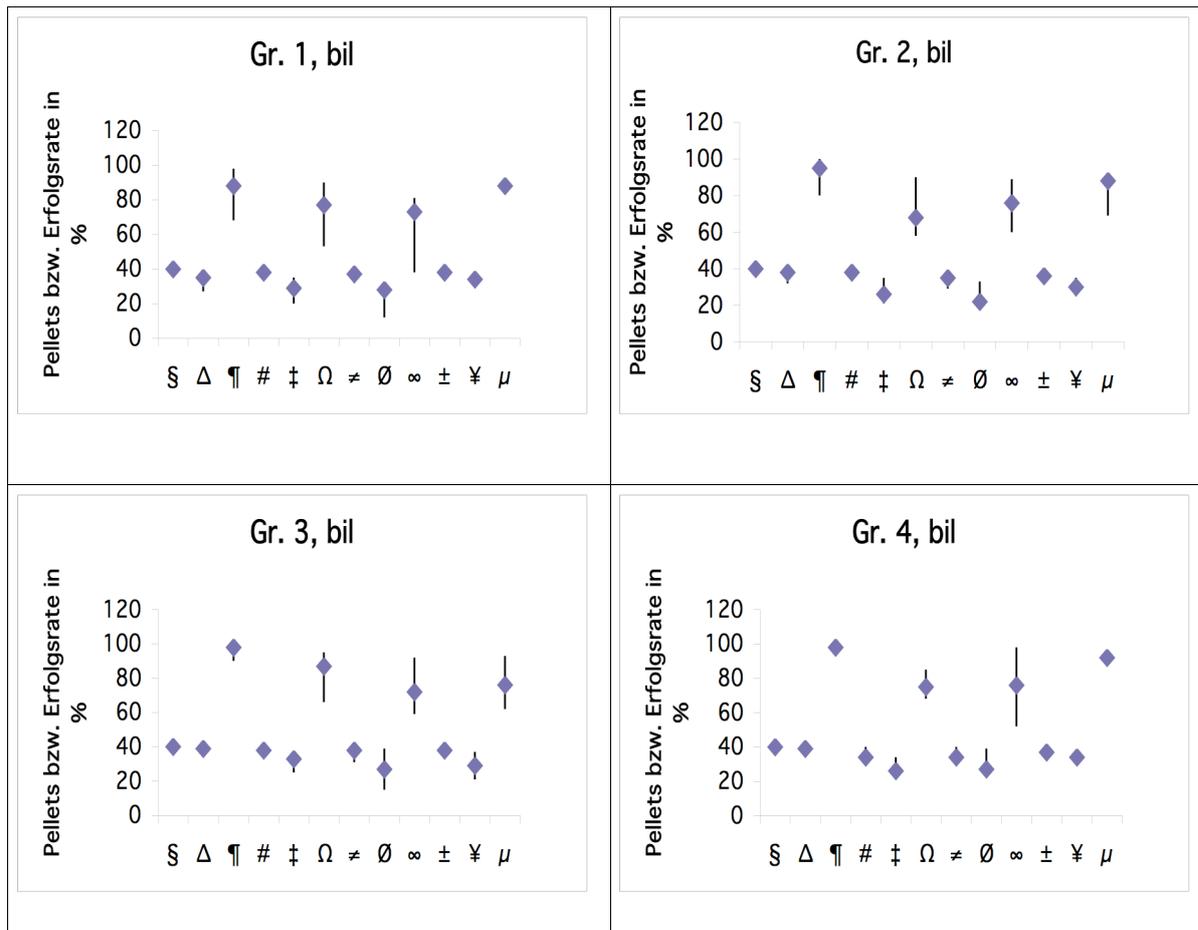
Die Werte wurden jeweils für die zwei Bewegungskomponenten Gegriffen und Gefressen als absoluter Punktwert dokumentiert, aus denen sich die Erfolgsrate in % ergibt. Dargestellt sind der Median, Minimum und Maximum. Die Daten aus untenstehenden Graphiken werden nun im Einzelnen erläutert.

In Gruppe 1 zeigt Gegriffen post-Lx eine geringe Reduzierung um ca. 5 %, die Anzahl der gefressenen Pellets ist um ca. 17 % vermindert, wodurch sich eine Erfolgsrate von 77 % im Median ergibt. Alle drei Kategorien verschlechtern sich gering im weiteren Verlauf. Zwei Tiere, die nach 20 Wochen getestet werden konnten, zeigen dagegen bessere Werte: die Anzahl der gegriffenen Pellets bleibt gegenüber dem post-Lx Zustand konstant, und der Wert der gefressenen Pellets erhöht sich um ca. 17 %, wodurch auch eine bessere Erfolgsrate erzielt wird (88 %).

In Gruppe 2 sinkt die Anzahl der geriffenen Pellets im post-Lx Zustand um 5 %, die Menge der gefressenen um ca. 33 %, wodurch sich eine Erfolgsrate von 68 % im Median gegenüber 98 % im unlädierten Zustand der Tiere errechnet. Die Werte bei den gegriffenen und gefressenen Pellets verringern sich im weiteren Verlauf. Die Erfolgsrate dagegen

scheint anzusteigen. Dies ist statistisch begründet. Denn zieht man Minimum und Maximum hinzu, zeigt sich im post-Tx 6 Wo Zeitraum nahezu keine Veränderung gegenüber post-Lx. Die vermeintlich höhere Erfolgsrate ergibt sich aus der Verteilung der Werte innerhalb der Gruppe.

Die Tiere aus dieser Gruppe, die nach 20 Wochen beurteilt werden konnten, zeigen dagegen in allen drei Kategorien erhöhte Werte. Man behalte jedoch im Hinterkopf, daß hier möglicherweise eine unvollständige Läsion vorliegt, die sich aufgrund der Rotationsdaten ergeben. Dennoch konnten fünf Tiere erneut gemessen werden. Daher sollte dieses Ergebnis nicht unerwähnt bleiben.



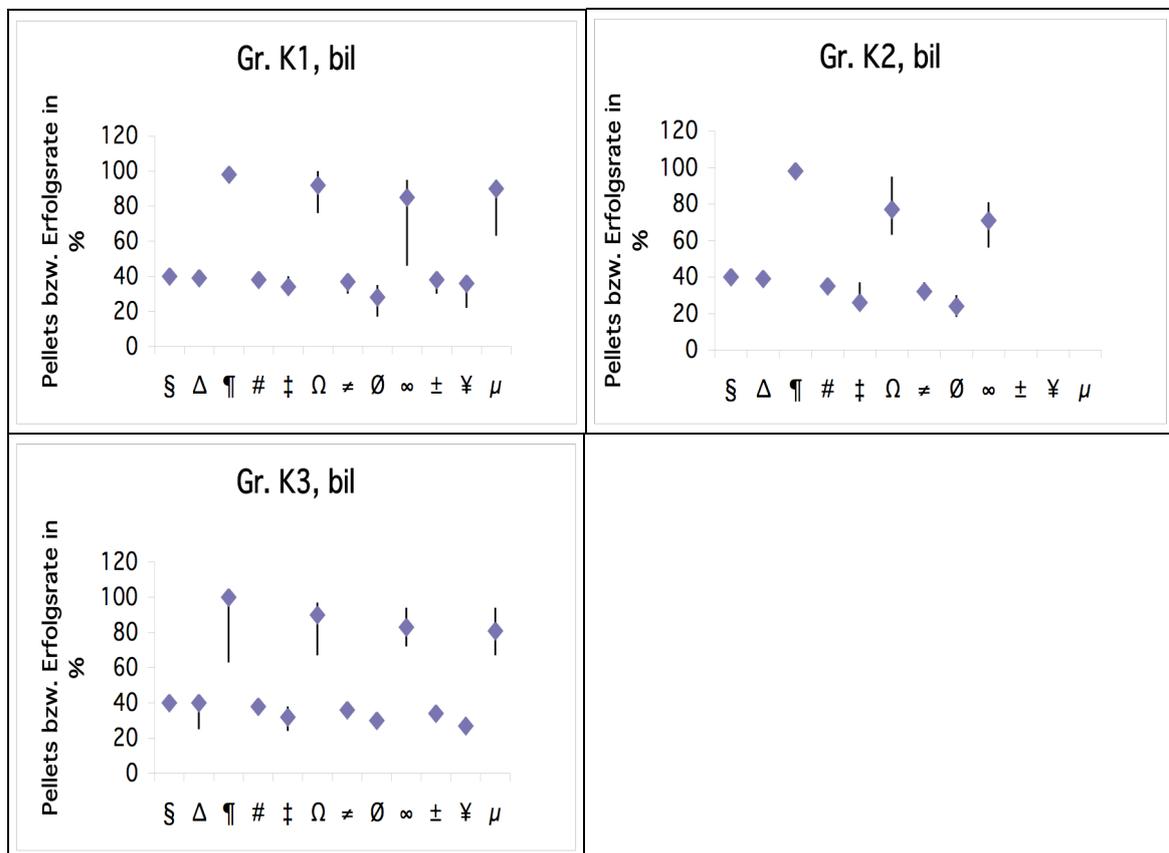
**Abb. 15 Staircase Test bilateral der Gruppen 1-4.** In allen vier Gruppen ist eine Abnahme aller drei Qualitäten (gegriffen, gefressen, Erfolgsrate) zu verzeichnen. Betrachtet man die Werte für 20 Wochen post transplantationem scheint sich für diese Tiere jedoch eine bessere Erfolgsrate zu ergeben, wenn man den Median betrachtet. ◆ Median, § prä lx gegriffen, Δ prä lx gefressen, ¶ prä lx Erfolgsrate, # post lx gegriffen, ‡ post lx gefressen, Ω post lx Erfolgsrate, ≠ post tx 6 gegriffen, Ø post tx 6 gefressen, ∞ post tx 6 Erfolgsrate, ± post tx 20 gegriffen, ¥ post tx 20 gefressen, μ post tx 20 Erfolgsrate.

Gruppe 3 zeigt eine ähnliche Entwicklung. Im post-Lx Zustand ist die Anzahl der gegriffenen Pellets um ebenfalls ca. 5 % vermindert. Die gefressenen Pellets sind um 15 % reduziert, wodurch sich eine Erfolgsrate von ungefähr 87 % ergibt, die um 11 Prozentpunkte geringer als im prä-Lx Zustand ist. In dieser Gruppe verringern sich die Werte weiter, so daß die Erfolgsrate sechs Wochen post implantationem bei 72 % liegt. Bei fünf Tieren, die nach 20 Wochen erneut beurteilt werden konnten, zeigt sich tendenziell

eine leichte Verbesserung. Die Anzahl der gefressenen Pellets erhöht sich um 5 % und die Erfolgsrate um 4 %; Minimum und Maximum sind dabei unverändert (Gefressen) bzw. leicht erhöht (Erfolgsrate).

Gruppe 4 zeigt nach der 6-OHDA-Operation eine Reduzierung der gegriffenen Pellets um 15 %, die gefressenen sind um ca. 33% verringert; dadurch errechnet sich eine Erfolgsrate von 75 % im Median gegenüber 98 % im prä-Lx Zustand. Im Gegensatz zu den anderen Gruppen bleiben die Werte bis zur Beurteilung sechs Wochen nach Zellimplantation konstant. Zwei Tiere, die nach 20 Wochen erneut beurteilt werden konnten, zeigen leicht erhöhte Werte, v.a. in der Anzahl der gefressenen Pellets. Dadurch ergibt sich auch eine deutlich höhere Erfolgsrate mit 92 % im Median. Dies entspricht einer Steigerung um ca. 23 %.

In den Kontrollgruppen K1 bis K3 zeigen sich analog zu den bereits beschriebenen Gruppen ähnliche Verläufe. Post läsionem verringert sich die Anzahl der gegriffenen Pellets zwischen fünf und 12 %, die Gefressenen zwischen 12 und 33 %. Dadurch ergeben sich Erfolgsraten, die zwischen 6 und 21 Prozentpunkte gegenüber dem prä-Lx Zustand reduziert sind.



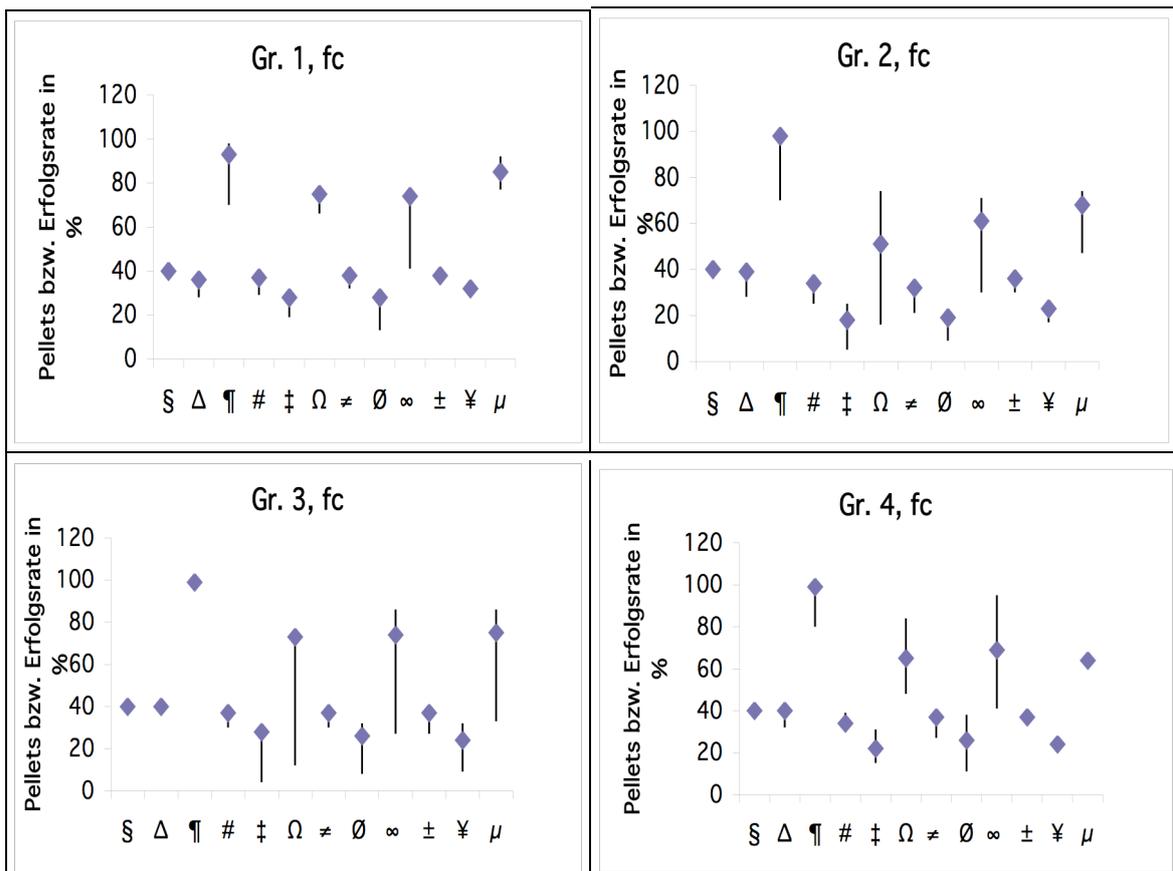
**Abb. 16 Staircase Test bilateral der Gruppen K1-K3.** In den Kontrollgruppen zeichnet sich ebenfalls eine Verschlechterung der Leistung ab. Besonders deutlich wird dies in Gr. K2. Hier standen jedoch keine 20-Wochen Tiere zur Verfügung, so daß die letzten drei Werte fehlen. ◆ Median, § prä lx gegriffen, Δ prä lx gefressen, ¶ prä lx Erfolgsrate, # post lx gegriffen, ‡ post lx gefressen, Ω post lx Erfolgsrate, ≠ post tx 6 gegriffen, Ø post tx 6 gefressen, ∞ post tx 6 Erfolgsrate, ± post tx 20 gegriffen, ¥ post tx 20 gefressen, μ post tx 20 Erfolgsrate.

Zusammenfassend läßt sich somit feststellen, daß bei rein graphischer Betrachtung in den Gruppen 1, 2 und 4 ein Benefit darstellen läßt, bei Betrachtung der einzelnen Werte und der

statistischen Rahmenbedingungen jedoch nur eine eingeschränkte Aussage diesbezüglich möglich ist. Dennoch erscheint es lohnenswert, in nach folgenden Studien aussagekräftigere statistische Methoden heranzuziehen, da in den Kontrollgruppen tendenziell eine Stagnation bzw. Verschlechterung der Werte registriert werden konnten.

In der seitengetrenten Beurteilung der Koordination der linken Vorderpfote (forced choice [fc]) fällt auf, daß in fast allen Gruppen schlechtere Ergebnisse als in der bilateralen Testung erzielt wurden.

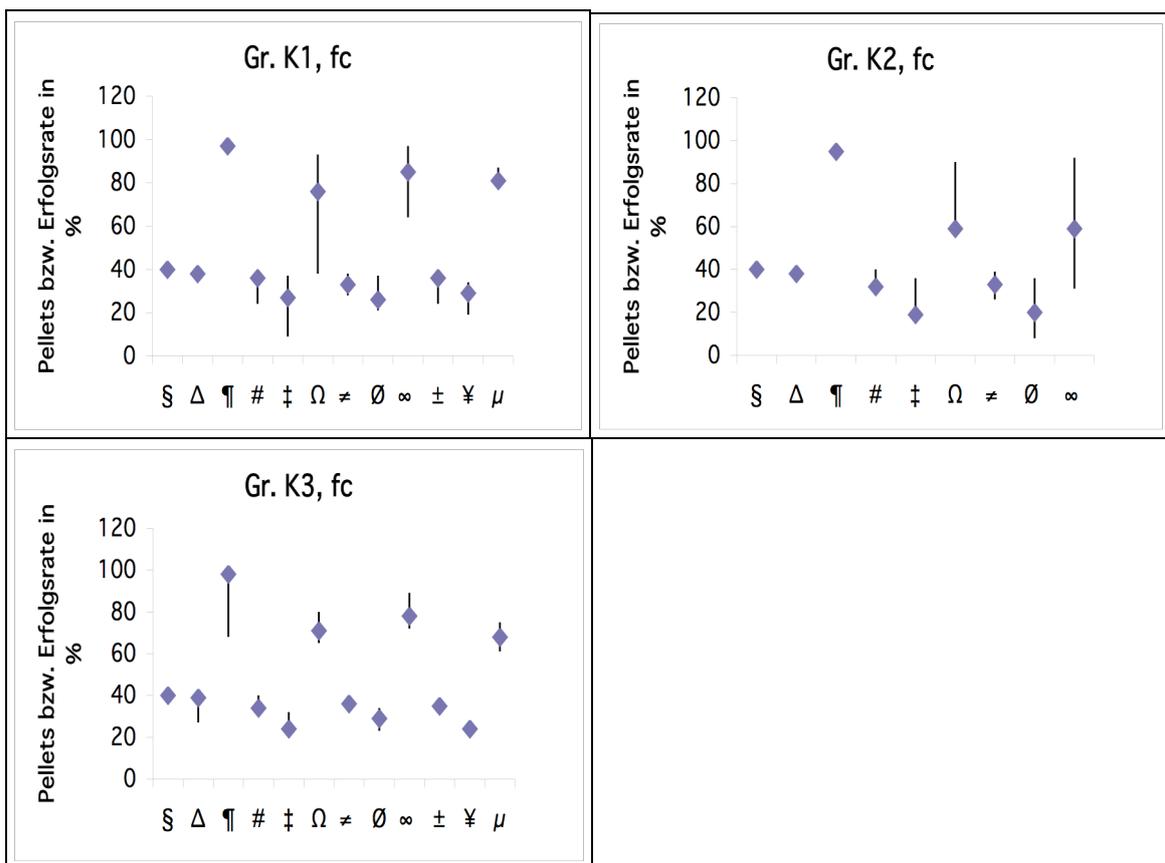
Die Gruppe 1 bildet in derlei Hinsicht eine Ausnahme. Die Mediane in den drei Beurteilungskriterien Gegriffen, Gefressen und Erfolgsrate sind nahezu identisch mit denen aus der zweiseitigen Prüfung. Hier liegt eine Reduzierung der gegriffenen Pellets um ca. 7 % vor. Die Rate der gefressenen Pellets ist um ca. 23 % gegenüber dem prä-lx Zustand vermindert. Daraus ergibt sich eine Erfolgsrate von 77 % im Median. Wie in der bilateralen Testung, sind die Werte konstant nach sechs Wochen post implantationem. Die zwei Tiere in der forcierten Überprüfung, die nach 20 Wochen erneut beurteilt werden konnten, zeigen in der Anzahl der gefressenen Pellets um 14 % höhere Werte als im post-Lx Zustand. Daraus ergibt sich auch eine bessere Erfolgsrate mit 85 % im Median gegenüber 75 % post läsionem.



**Abb. 17 Staircase Test forced choice der Gruppen 1-4.** Prinzipiell werden die Ergebnisse aus der bilateralen Testung bestätigt. Nach 20 Wochen zeigt sich eine gewisse Erholungstendenz im Greifverhalten und in der Erfolgsrate. ◆ Median, § prä lx gegriffen, Δ prä lx gefressen, ¶ prä lx Erfolgsrate, # post lx gegriffen, ‡ post lx gefressen, Ω post lx Erfolgsrate, ≠ post tx 6 gegriffen, Ø post tx 6 gefressen, ∞ post tx 6 Erfolgsrate, ± post tx 20 gegriffen, ¥ post tx 20 gefressen, μ post tx 20 Erfolgsrate.

Bei Gruppe 2 sind in allen drei Kategorien die Werte deutlich schlechter als in der bilateralen Überprüfung. Die Anzahl der gegriffenen Pellets ist im post-Lx Zustand um 15 % vermindert, die Rate der Gefressenen um 50 %. Dadurch errechnet sich eine verminderte Erfolgsrate um 52 % (gegenüber 28 % in der bilateralen Testung). Im weiteren Verlauf bleiben die Werte bei gegriffenen und gefressenen Pellets konstant. Die Erfolgsrate erscheint um 10 Prozentpunkte höher, was an der geringeren Differenz zwischen Minimum und Maximum liegt. Fünf Tiere, die nach 20 Wochen erneut beurteilt werden konnten zeigen in allen drei Testsparten erhöhte Messergebnisse. Die Erfolgsrate ist gegenüber dem post-Lx Zustand um ca. 33 % gesteigert.

Auch in Gruppe 3 wurden bei gegriffenen und gefressenen Pellets und bei der dazugehörigen Erfolgsrate niedrigere Werte als bei der simultanen Beurteilung beider Extremitäten (bilateral) ermittelt. Post läsionem sank der Wert von 40 auf 37 (ca. 8 %) im Median bei den Gegriffenen, von 40 auf 28 bei den gefressenen Pellets in der forced choice Testung. Daraus ergibt sich eine Erfolgsrate von 73 % im Median post-lx. Diese Werte bleiben im weiteren Verlauf nahezu konstant. Die Anzahl der gegriffenen Pellets ändert sich geringfügig im Minimum und Maximum, die Anzahl der Gefressenen vermindert sich leicht um ca. 7 bzw. 14 % im sechs und 20 Wochen (fünf Tiere) Beobachtungszeitraum post transplantationem. Der Median der Erfolgsrate bleibt nahezu unverändert. Gegenüber den bilateralen Ergebnissen ergeben sich somit leicht negativere Resultate.



**Abb. 18 Staircase Test forced choice der Gruppen K1-K3.** In allen drei Kontrollgruppen sind im Verlauf deutlich schlechtere Werte gegenüber dem prä lx Status registriert worden. ◆ Median, § prä lx gegriffen, Δ prä lx gefressen, ¶ prä lx Erfolgsrate, # post lx gegriffen, ‡ post lx gefressen, Ω post lx Erfolgsrate, ≠ post tx 6 gegriffen, Ø post tx 6 gefressen, ∞ post tx 6 Erfolgsrate, ± post tx 20 gegriffen, ¥ post tx 20 gefressen, μ post tx 20 Erfolgsrate.

In der Gruppe 4 zeigen sich schlechtere Ergebnisse gegenüber der bilateralen Testung v.a. in der Anzahl der gefressenen Pellets. Sie sinkt post läsionem auf 22 im Median und ist somit um 45 % gegenüber dem prä-lx Zustand und um 12 Prozentpunkte gegenüber der zweiseitigen Testdurchführung reduziert. Durch den Wert von 34 im Median errechnet sich daraus ein Erfolgsrate von 65 %. Sechs Wochen nach Implantation der Progenitorzellen haben sich alle drei Werte scheinbar verbessert, betrachtet man jedoch Minimum und Maximum, zeigen sich nahezu konstante Werte (Gegriffen) bzw. größere Differenzen zwischen diesen beiden Werten.

In den Kontrollgruppen K1-K3 ist die Anzahl der gegriffenen Pellets zwischen 10 und 20 % post läsionem vermindert, die der Gefressenen zwischen 19 und 50 %. Daraus errechnen sich

Erfolgsraten zwischen 59 und 76%.

In Gruppe K1 errechnet sich sechs Wochen nach Implantation eine scheinbar höhere Erfolgsrate als im post-Lx Zustand. Betrachtet man die gegriffenen und gefressenen Pellets, erscheint dies paradox. Der Wert der Erfolgsrate ergibt sich aufgrund statistischer Berechnungen und ist von der Verteilung der Werte abhängig. Nach 20 Wochen konnten aus dieser Gruppe fünf Tiere erneut getestet werden. Die Werte bleiben nahezu konstant.

In Gruppe K2 zeigt sich sechs Wochen post implantationem keine Veränderung. 20 Wochen post-Tx konnten aus dieser Gruppe keine Tiere getestet werden.

In Gruppe K3 zeigt sich eine Erhöhung der Werte sechs Wochen post-Tx in der Anzahl der gefressenen Pellets um ca. 21 % im Median; der Wert der Gegriffenen scheint sich zu verändern, Minimum und Maximum bleiben jedoch nahezu konstant. Aus den genannten Tatsachen errechnet sich eine erhöhte Erfolgsrate um ca. 10 % im Median. Im Fall dieser Gruppe ist jedoch kein Benefit zu erwarten, da diese Tiere nur lädiert wurden. Somit ist trotz vorausgesetzter vollständiger Läsion von einer spontanen Verbesserung der Symptomatik auszugehen.

Zusammenfassend fördert die forcierte Testung der vorderen Extremitäten die motorischen Defizite deutlicher zutage, da nahezu durchgängig schlechtere Werte als in der bilateralen Testung erzielt wurden. Doch eine parallele Entwicklung ergibt sich im weiteren Beobachtungsverlauf, da auch hier jeweils für die Gruppen 1, 2, und 4 nach 20 Wochen zumindest stagnierende bzw. leicht steigende Zahlenwerte für gegriffene und gefressene Pellets registriert werden könne, woraus sich leicht erhöht Erfolgsraten errechnen. Genauere statistischere Verfahren sollten hier im Verlauf jedoch detaillierteren Aufschluß über mögliche Signifikanzen geben könne.

## **3.2 BILDANALYSE**

### *3.2.1 HELLFELDMIKROSKOPIE*

Tiere der Gruppe 1 und 3 (s Tab. 1 in Material und Methoden) erhielten ca. 450000 Zellen (75000 Zellen/ $\mu$ l) an sechs Implantationslokalisationen, verteilt auf das gesamte Striatum. Tiere der Gruppen 2 und 4 bekamen ca. 300000 Zellen (75000 Zellen/ $\mu$ l) an vier Implantationsstellen, die auf die gesamte Substantia nigra distribuiert waren. Aus jeder dieser Gruppen wurde ein Tier immunhistologisch untersucht.

Das Tier aus Gruppe 1 hat bis 20 Wochen post implantationem gelebt und erhielt die Progenitorzellen mit der Glaskapillare. Implantationslokalisierung war das Striatum. Zunächst werden die Ergebnisse für die Hellfeldmikroskopie aufgeführt.

In der Nestin Färbung zeigt sich im medialen Striatum eine deutlich positive Reaktion an und um den Implantationslocus. Die Größe des Grafts beträgt ca. 300µm in der craniocaudalen und ca. 150µm in der mediolateralen Ausdehnung. Das Graft zeigt sich entlang des Einstichkanals, in dessen Verlauf sich die Zellen konzentrieren. Einige Zellen im medialen und cranialen Areal scheinen in die Umgebung zu migrieren. Das gesamte Graft erscheint gut integriert in das Neuropil. Intensive gefärbte Fasern der Zellen erstrecken sich in die unmittelbare Umgebung hin. Ein Einstichkanal durch die Glaskapillare ist nicht auszumachen.

Das Gewebe insgesamt wirkt kompakt und ist nur durch einzelne Artefakte in Form von kleinen Geweberupturen lädiert. Vermutlich sind sie während der Färbvorgänge entstanden.

Die TH-Färbung der implantierten Zellen fällt bei diesem Tier relativ schwach aus. Innerhalb der Lokalisation lassen sich aber deutlich TH-positive Zellen ausmachen, die sich vor allem im Zentrum des Transplantationslocus befinden. Einige Zellen in der Peripherie des Grafts sind ebenfalls TH-positiv. Deren Entfernung zum Zentrum entspricht ca. 50µm. Zieht man die kontralaterale Substantia nigra zum Vergleich heran, wird die relativ schwache TH-Positivität der Progenitorzellen deutlich, dennoch zeigt sich indirekt eine Tendenz zur Dopaminproduktion.

In der GFAP Färbung zeigt sich eine positive Reaktion an der Transplantationsstelle selbst. Intensiv rot angefärbte Fasern erstrecken sich in die Umgebung, aber es ist schwierig, dem Faserverlauf zu folgen. Dies liegt an der dünnen Schichtdicke. Um die Implantationslokalisierung herum und im restlichen Striatum zeigt sich eine relativ schwache, aber homogene Farbintensität. Es stellt sich hierbei die Frage, ob die Fasern von den implantierten oder den ortsständigen Zellen ausgehen, die eine gliale Reaktion aufgrund der Traumatisierung durch den operativen Eingriff zeigen.

In der BrdU Färbung zeigen sich v.a. in den cranialen und caudalen Abschnitten des Transplantats markante rote Zentren. Eine Abgrenzung der einzelnen Zellen ist schwierig. Außerhalb des Transplantats sind keine BrdU positiven Zellen zu sehen.

Somit läßt sich sagen, daß in den Zellen eine Proliferationstendenz zu erkennen ist. Die Abgrenzung von Reparaturvorgängen wäre allerdings noch ergänzend hinzuzufügen. Demnach scheinen die Zellen vital zu sein und tendenziell Dopamin zu produzieren.

Die Synaptophysinkomponenten zeigen sich als kleine rote Dots. Innerhalb der Transplantationsstelle fällt sie im Vergleich zur Umgebung relativ schwach aus. Im Zentrum der implantierten Zellen sind nur wenige Punkte zu erkennen. Je weiter man sich vom Implantat in die Umgebung bewegt, desto intensiver gefärbte und zahlreichere Dots treten auf. Ob interzelluläre Kontakte zwischen implantierten und originalen Neuronen entstanden sind, ist schwierig zu beurteilen, jedoch auch nicht auszuschließen. Für synaptische Verbindungen zwischen den Progenitorzellen an sich sprechen die vereinzelt Synaptophysinpunkte innerhalb des Transplantats.

Das Tier, das aus der Gruppe 2 immunhistochemisch erfasst wurde, lebte 20 Wochen und erhielt Progenitorzellen aus einer frühen Passage. Diese wurden mit einer Metallkanüle in die Substantia nigra eingebracht.

Die Nestin Färbung fällt bei diesem Tier wesentlich schwächer aus als bei dem Tier aus Gruppe 1. Innerhalb des Grafts ist eine schwach rote Färbung in allen Bereichen erkennbar. Diese bleibt auf das Implantat begrenzt und reicht nicht bis in die Peripherie wie das beim voranbeschriebenen Tier der Fall war. Das Graft zeigt eine Ausdehnung von ca. 300 µm in kraniokaudaler und 150 µm in mediolateraler Richtung. Ein Teil der

Implantationsstelle ist während der immunhistochemischen Untersuchung lädiert worden und konnte nicht mehr beurteilt werden.

Das Implantat erscheint gut integriert in die Umgebung. Der Einstichkanal ist entlang dem Graft nachzuvollziehen. Innerhalb des Grafts befinden sich wenige Rückstände aus dem Infusionssystem. Dies könnten z.B. Partikel von Paraffinöl, und Gewebebestandteile sein, die beim Herablassen der Kanüle mit in den Implantationslokus eingebracht wurden. Direkt im Zentrum ist eine Struktur mit granulären Einschlüssen auszumachen, die diesem Befund entsprechen könnte.

In der TH Färbung finden sich in einzelnen Arealen des Grafts positive Zellen. Sie erscheinen schwach rot. In der Peripherie der Lokalisation finden sich keine TH-reaktiven Zellen.

In der GFAP Färbung imponieren Fasern v.a. im Randbereich des Grafts. Es zeigen sich kurzstreckige Ausläufer, die aufgrund der Schichtdicke von  $5\mu\text{m}$  nicht weiter verfolgt werden können. Bis zu einem Radius von ca.  $100\mu\text{m}$  von der Implantationsstelle sind intensiv rot angefärbte Fasern auszumachen. In der Peripherie nimmt dann die Farbtintensität ab.

In der BrdU Immunhistologie sind keine proliferierenden Zellen auszumachen. Allerdings wird die Beurteilung durch die Läsion während des Färbevorgangs deutlich erschwert, so daß das Präparat nur eine eingeschränkte Aussagekraft enthält. Es können ca. 50% dieses Implantationslokus nicht beurteilt werden. Im einsehbaren Bereich finden sich jedoch keine BrdU positiven Zellen.

Analog dem Tier aus Gruppe 1 ist die Ausprägung von Synapsen innerhalb des Grafts sehr gering. Dies zeigt sich in der Synaptophysin Färbung. Dort sind nahezu keine roten Dots zu identifizieren, die darauf hinweisen, daß Zellinteraktionen stattfinden. Die Zellkontakte sind scharf vom Transplantat abgegrenzt und zeigen sich erst in der Umgebung, nicht aber innerhalb des Grafts. Dieses bleibt von einer relevanten Synapsenbildung ausgespart.

Das Tier aus Gruppe 3 hat 20 Wochen gelebt und erhielt mit der Glaskapillare Zellen später Passage in das Striatum implantiert.

Ähnlich dem Tier aus Gruppe 1 fällt die Nestin-Färbung sehr kräftig aus. Das implantierte Volumen verteilt sich über eine Ausdehnung von ca.  $350\mu\text{m}$  in der kraniokaudalen und ca.  $120\mu\text{m}$  in der mediolateralen Richtung. Über das gesamte Graft sind intensiv rot angefärbte Fasern und Perikaryen auszumachen, die sich bis ca.  $250\mu\text{m}$  radiär in die Peripherie erstrecken. Migrationstendenzen sind in dieser Färbung ebenfalls in Betracht zu ziehen. Vereinzelt Zellen in der Peripherie scheinen sich möglicherweise von der Implantationsstelle entfernt zu haben. Innerhalb des Grafts sind zusätzlich hell-grüne bis braune vakuolenartige Strukturen zu detektieren, die vermutlich Residuen des Injektionssystems darstellen (z.B. Paraffinöl). Die native Umgebung, d.h. nicht unmittelbar an die Implantationsstelle grenzend, weist keine Nestinpositivität auf.

Die TH Färbung fällt bei diesem Tier, anders als beim Tier aus der Gruppe 1, positiver aus. Im Implantationslokus selbst und in der Umgebung sind deutlich TH-positive Zellen zu erkennen. Diese zeigen sich durch eine Rotfärbung der Perikaryen. Der größte Anteil positiver Zellen befindet sich direkt im Graft, in der Peripherie sind ebenfalls deutlich positive Zellen zu detektieren. Sie befinden sich ca.  $200\mu\text{m}$  vom Zentrum der Implantation entfernt.

In der BrdU Färbung fallen zunächst massiv rötlich braun gefärbte Areale auf, die vermutlich residuelle Bestandteile des Injektionssystems darstellen und somit die Beurteilung erschweren. Jedoch erscheinen die Zellen im Gegensatz zu den voranbeschriebenen Tieren eine deutliche Proliferationstendenz, die sich auch in der Fluoreszenzbildgebung widerspiegelt. Die BrdU-positiven Zellen konzentrieren sich auf

das Zentrum des Grafts. In der näheren Umgebung sind keine immunhistologisch detektierbaren Zellen zu finden.

In der GFAP Färbung zeigen sich v.a. in den kaudalen und kranialen Abschnitten des Grafts deutlich positive Fasern. Diese stellen sich intensiv rot dar. Der mittlere Abschnitt bleibt ausgespart. Bei diesem Tier fällt auf, daß GFAP v.a. innerhalb des Grafts auszumachen ist, wohingegen die Umgebung nur sehr schwach auf diese Umgebung reagiert. Die native Umgebung zeigt sich ebenfalls deutlich rot angefärbt, im Verhältnis zur Transplantatstelle aber schwächer.

In der Synaptophysin Färbung gibt es innerhalb des Transplantats nur wenige Synapsenverbindungen. Diese zeigen sich durch rote Dots. Es fällt jedoch eine deutliche Reduzierung der Zellverbindungen an der Lokalisation des Implantats auf. In unmittelbarer Angrenzung zum Graft zeigen sich jedoch deutlich positive Areale, die eine hohe Synapsendichte aufweisen. Vereinzelt Ausläufer, die v.a. im kranialen Abschnitt zu erkennen sind, weisen auf eine mögliche Zellinteraktion hin. Diese zeigt sich morphologisch in vereinzelt „Straßen“, die in das Graft hineinziehen. Außerdem erscheint in der Hellfeldmikroskopie eine höhere Synapsendichte direkt an der Grenze zum Graft als in der Umgebung.

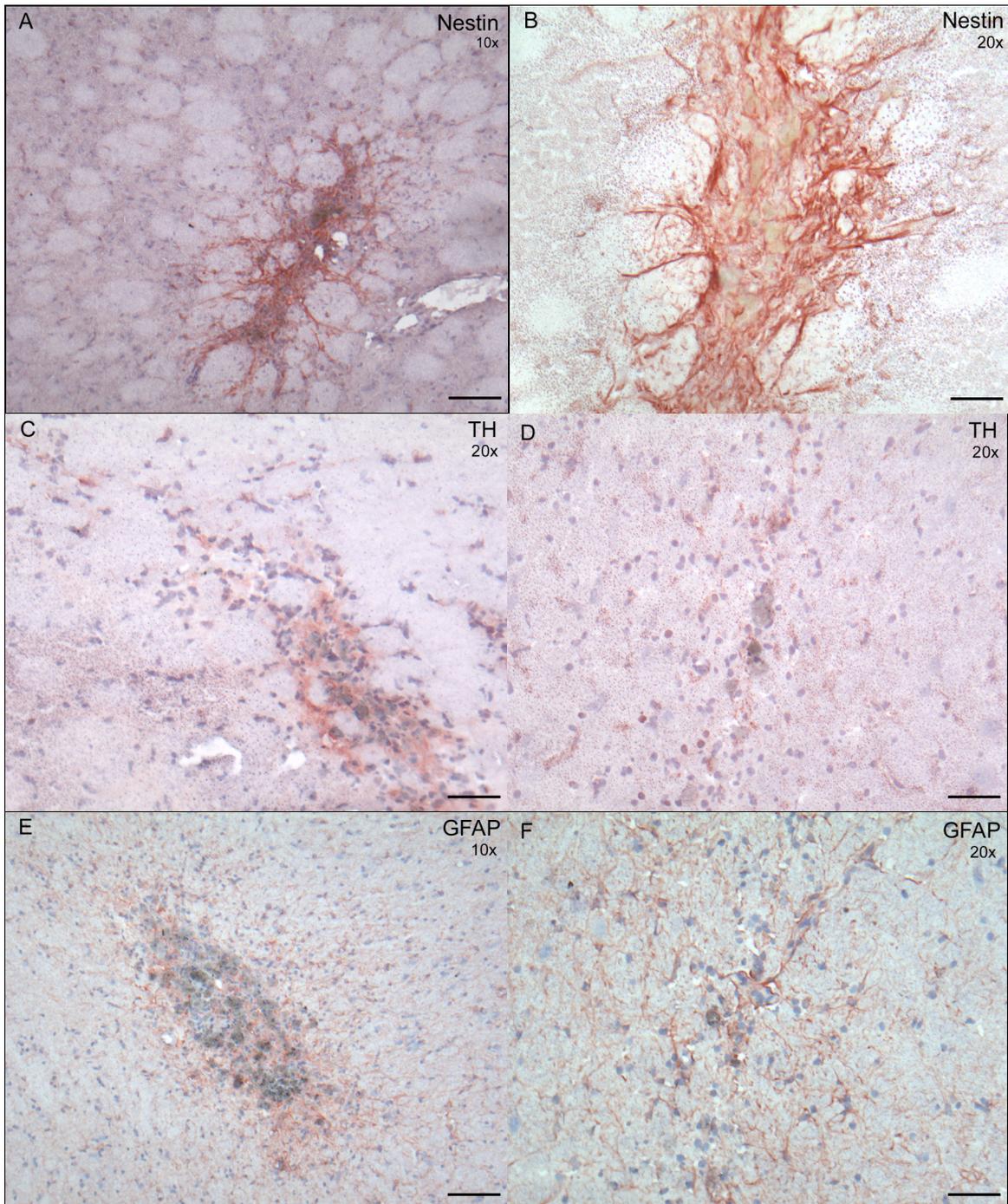
Prinzipiell scheint eine gewisse Proliferationstendenz vorhanden zu sein. Dies läßt sich an vereinzelt BrdU-positiven Zellen innerhalb des Grafts bestätigen. Die Anzahl dieser proliferierenden Zellen scheint jedoch sehr begrenzt. In der Peripherie sind keine BrdU-positiven Zellen zu entdecken.

Somit werden die Ergebnisse, die das Tier in Gruppe 1 erbracht hat, bestätigt. Unterschiede bestehen in der Ausprägung einzelner Marker. Dabei sticht bei dem Tier aus Gruppe 3 v.a. die TH Färbung heraus, die eine potentielle Dopaminproduktion indiziert, aber für ein motorisches Benefit noch unzulänglich erscheint.

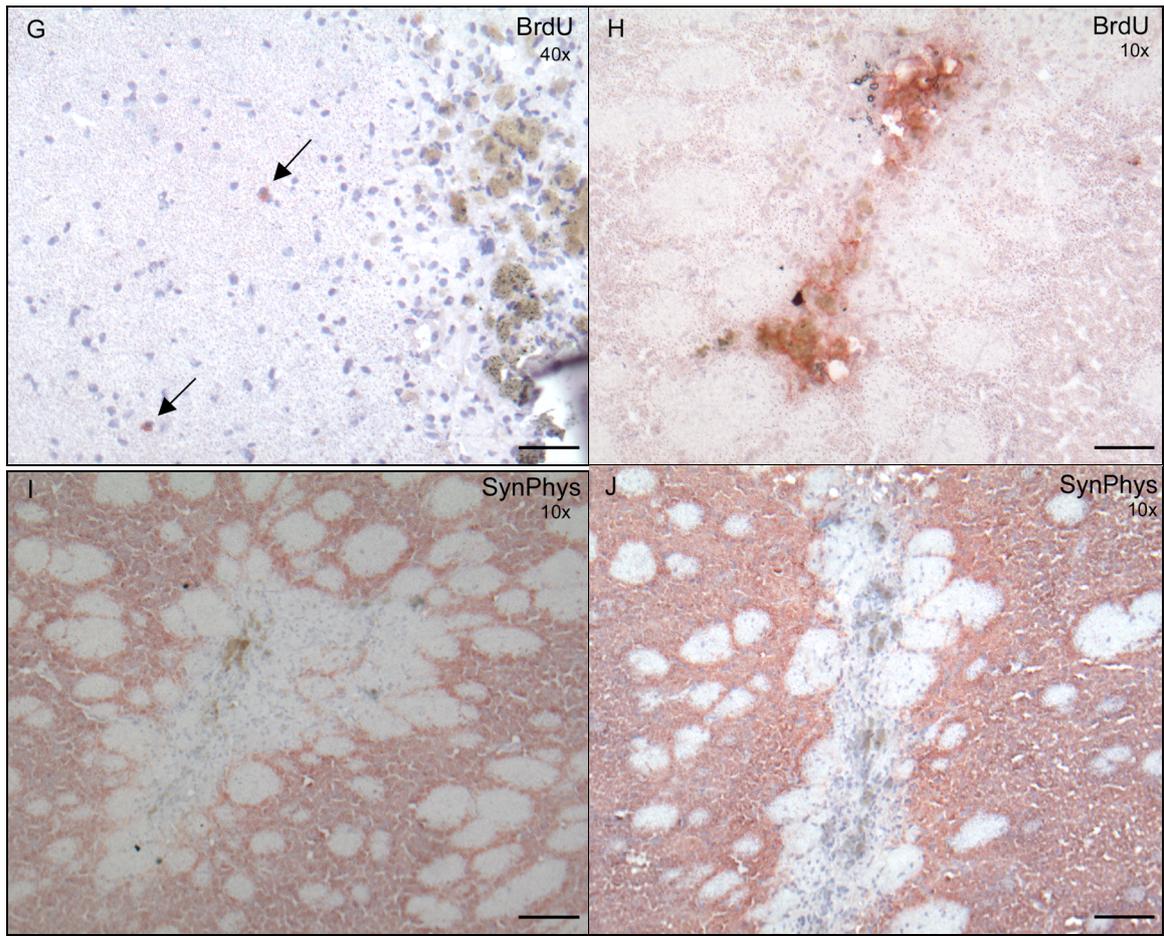
Der Vollständigkeit halber werden die Ergebnisse des Tieres aus der Gruppe 4 aufgeführt, da es sich bei den gefärbten Arealen nicht um die Implantationsstelle an sich handelt, sondern um den Einstichkanal, wie sich im nachhinein zeigte. Dennoch sind auch hier einzelne interessante Aspekte zu bemerken.

Das Tier aus dieser Gruppe hat sechs Wochen gelebt und sollte Zellen später Passage in die Substantia nigra implantiert bekommen. Diese wurden mit der Glaskapillare appliziert. Die Nestin-, Synaptophysin-, TH- und BrdU- Färbungen fallen negativ bis sehr schwach aus, da es sich bei dem gefärbten Areal nicht um den Implantationslokalus handelt und hier gar keine oder nur vereinzelt implantierte Zellen zu finden sind, die beim Herunterlassen oder Zurückziehen der Kapillare ausgetreten sind.

Die GFAP Färbung, die in diesem Fall interessant ist, fällt ebenfalls relativ schwach aus. Dies spricht für eine geringe Astrogliareaktion und unterstützt die These, daß die Applikation mit der Glaskapillare relativ atraumatisch wirkt und keine großen Läsionen bei der Operation hinterläßt. Das Neuropil und das Gewebe, das den Stichkanal umgibt, wirken ebenfalls kompakt und zeigen nur geringe artifizielle Schädigungen auf.



**Abb. 19 Nestin-, TH- und GFAP -positive Grafts im Striatum.** Dargestellt sind Schnitte von Tieren aus der Gruppe 1 (A), Gruppe 2 (E) Gruppe 3 (B,C) und Gruppe 4 (D,F). Deutlich zu erkennen sind nestin+ Fasern in A und B bei unterschiedlicher Vergrößerung. Die Verteilung der Zellen ist relativ scharf begrenzt, es ist keine Differenzierung zwischen den unterschiedlichen Implantationslokalisationen zu machen. Tendenziell zu erkennen ist eine TH-Positivität, die innerhalb eines Grafts stattfindet (C), das Bild D zeigt eine TH-Färbung von Zellen, die sich im Injektionskanal befinden und unzureichend in das Gewebe integriert sind. Die TH-Färbung fällt nahezu negativ aus. Bild E zeigt eine deutlichere Positivität für GFAP als Bild F. Zum einen weist es daraufhin, daß eine stärkere Entzündungsreaktion stattfindet, da das Tier in Bild E mit der Metallkanüle implantiert wurde, Zum anderen können sich die implantierten Zellen zu Gliazellen differenziert haben. Scale bar bei 10x Vergrößerung: 50 µm, bei 20x Vergrößerung: 25 µm



**Abb. 19 (Fortsetzung) BrdU-, und Synaptophysin-Immunhistochemie in der Hellfeldmikroskopie.** Dargestellt sind mikroskopische Schnitte von Tieren aus der Gruppe 1 (H, I), Gruppe 2 (G) und Gruppe 3 (J). Die Proliferationstendenz der implantierten Zellen ist an sich vorhanden (G, schwarze Pfeile) bzw. eingeschränkt beurteilbar, wenn Fremdmaterial wie z.B. Paraffinöl miteingebracht wird (H). Implantierte Grafts stellen sich als helle Areale dar. Die Ausbildung einer interzellulären Kommunikation fällt nahezu negativ aus (I, J). Eine hohe Synapsendichte ist in der angrenzenden Umgebung zu verzeichnen, die an den roten Abschnitten zu erkennen ist. Innerhalb des Grafts sind kaum rote Dots zu sehen, die für synaptische Verbindungen charakteristisch wären. Zu verzeichnen sind singuläre „Synapsenstraßen“, die aus der Umgebung in das Graft hineinragen und vom bestandenem Neuropil sein können.

### 3.2.2 DOPPELIMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE

Durch die Doppelimmunfluoreszenz können die Ergebnisse aus der Hellfeldmikroskopie bestätigt werden. Die vor der Implantation mit Fast blue markierten Zellen zeigen bei dem Tier aus Gruppe 1 eine deutliche Positivität in der Nestinfärbung (s. Bilder unten). Nestin zeigt sich dabei als granulomatös bis haarförmige Struktur bzw. in Schollenform innerhalb des Perikaryons, wie es typisch für Intermediärfilamente ist. Die Färbung zeigt sich dabei in nahezu allen Zellen identisch. Vereinzelt scheint das Fast blue von der Intensität her leicht abgeschwächt. Dies beruht darauf, daß der Marker bei proliferierenden Zellen an die nachfolgende Zellgeneration abgegeben und somit aufgeteilt wurde. Im unteren Abschnitt des Bildes zeigen sich wolkige Artefakte, die vermutlich vom Injektionssystem (z.B.

Paraffinpartikel) herrühren. Die Beurteilung der markanten Morphologien der Marker Fast Blue und Nestin wird dadurch teilweise eingeschränkt.

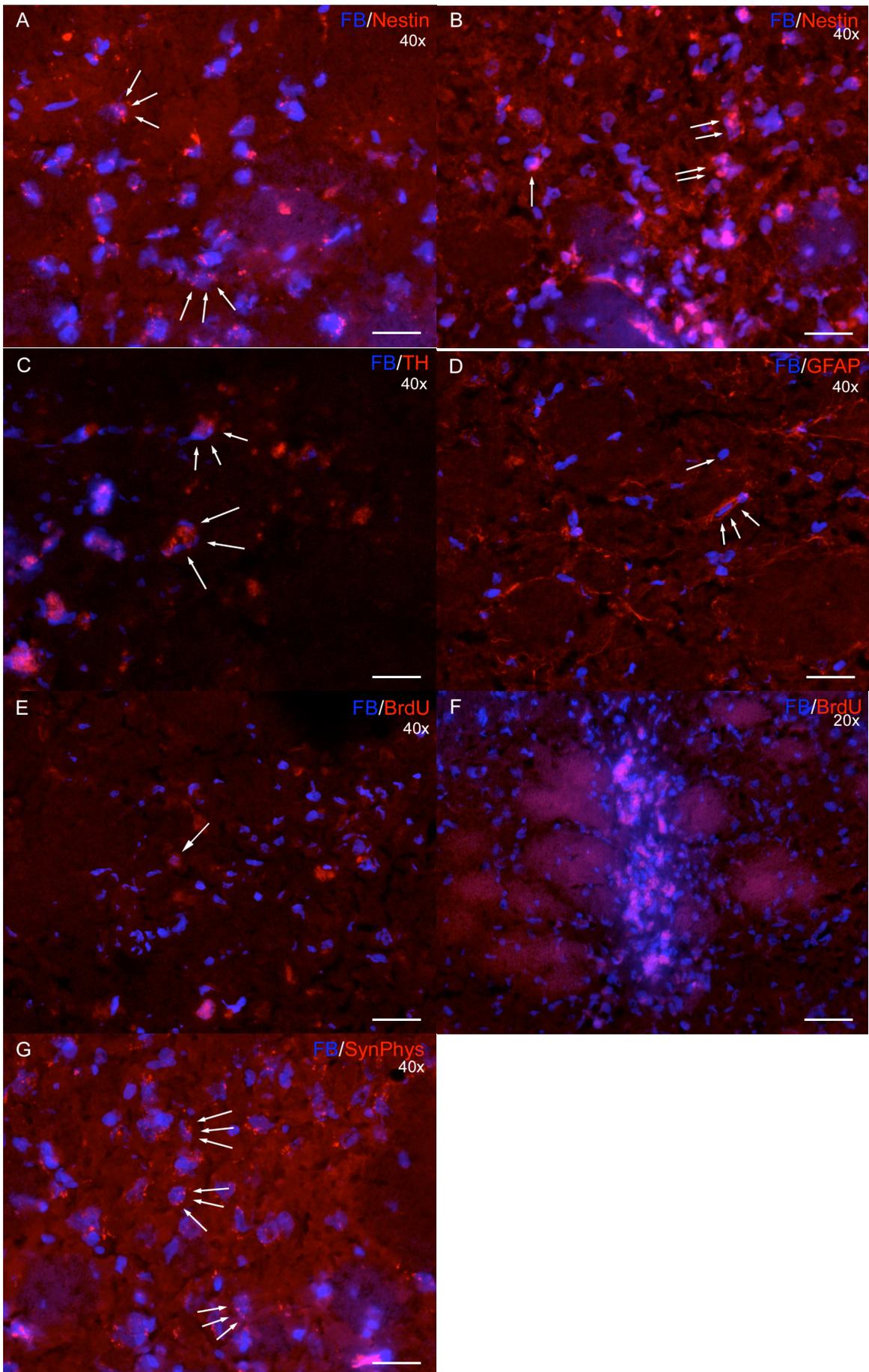
Das Tier aus Gruppe 3 bestätigt die o.g. Ergebnisse des Tieres aus Gruppe 1, wenn auch nicht so deutlich. Im aufgeführten Bild zeigen sich v.a. im Zentrum Zellen, die zwar Fast blue, aber kein Nestin aufweisen. Möglicherweise sind sie in der Entwicklung schon weiter fortgeschritten und weisen deshalb kein Nestin mehr auf. Dies wird v.a. durch die relativ schwache Fast blue Färbung dieser Zellen indiziert. In den Zellen, in denen beide Marker exprimiert werden, erscheint dasselbe morphologische Bild wie bei der Färbung des o.g. Tieres aus Gruppe 1.

In der TH Färbung zeigen sich bei dem Tier aus Gruppe 1 deutlich positive Zellen. Sie sind in ihrer Anzahl jedoch stark begrenzt und unterstreichen somit die Ergebnisse, die in der Immunhistochemie gewonnen wurden. Die TH Intensität zeigt sich v.a. in den Perikaryen, wohingegen sich das Fast Blue noch auf die Faser verteilt. Eine für die vorliegende Arbeit bestehende Schlüsselfrage, nämlich die nach der TH-Produktion in den implantierten Zellen läßt sich somit tendenziell mit Ja beantworten. Um ein motorisches Benefit zu erzielen, ist die Anzahl der dopaminproduzierenden Zellen jedoch zu niedrig. Diese Tatsache wird im Abschnitt „Diskussion“ noch weiter ausgeführt.

In der GFAP Färbung lassen sich positive Zellen bei dem Tier aus Gruppe 1 feststellen. Das GFAP stellt sich als rote Gewebestruktur dar, die dem Faserverlauf folgt. Durch simultane Fast Blue Positivität sind die markanten Zellen eindeutig dem Implantat zuzuordnen. Die Anzahl der FB/GFAP positiven Zellen ist jedoch sehr gering, wodurch eine geringe Differenzierung der implantierten Zellen in Glia impliziert wird.

Die deutliche Positivität, die in der BrdU Immunhistologie bei dem Tier aus Gruppe 1 vorhanden ist, läßt sich in der Fluoreszenz nicht bestätigen. In dem gewonnenen Abschnitt fallen höchsten 5-6 offensichtlich proliferierende Zellen auf (40fache Vergrößerung). Dies wird durch die schwächer werdende Fast Blue Intensität unterstrichen, die nach Zellteilungen abnimmt, da der Marker auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Bei dem Tier aus Gruppe 3 bietet sich dagegen ein anderes Bild: innerhalb des Grafts sind deutlich BrdU-positive Zellen zu detektieren, wie sie auch schon in der Histologie aufgefallen waren. Da sie ebenfalls Fast Blue positiv sind, lassen sie sich dem implantierten Graft zuordnen.

Eine Immunfluoreszenzuntersuchung für Synaptophysin wurde von dem Tier aus Gruppe 1 durchgeführt. In dem untersuchten Material kann eine deutliche Bildung dieses Glykoproteins nachgewiesen werden. Dies wird anschaulich für die simultane Positivität für Fast Blue und Synaptophysin, so daß die Intensitäten eindeutig den implantierten Zellen zugeordnet werden können. Die Proteinkomplexe erscheinen ebenso wie in der Immunhistochemie als rote Dots, die v.a. in der Zellmembran lokalisiert erscheinen.



**Abb. 20 Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie.** Dargestellt sind die Grafts eines Tieres aus Gruppe 1 und aus Gruppe 3 mit Implantationslokalisierung in das Striatum. Mit jeweils weißen Pfeilen markiert sind implantierte Nestin-positive Zellen, die vor der Applikation mit Fast blue markiert worden sind (A, B). Vereinzelt zu erkennen sind TH-positive Fasern (C, weiße Pfeile), die ebenfalls vereinzelt Proliferationstendenz zeigen (E, weißer Pfeil) und interzelluläre Kontakte auszubilden scheinen (G, weiße Pfeilgruppen). Die Differenzierungstendenz in Gliazellen, darstellbar durch eine GFAP-Immunhistochemie, scheint gering ausgeprägt zu sein (B, Pfeilgruppe). Der einzelne Pfeil in B zeigt eine implantierte Zelle (Fastblue +), die kein GFAP exprimiert. Schwierigkeiten in der Beurteilung der Differenzierungstendenzen ergeben sich, wenn Zellen in Clustern zusammenliegen (F); die Beurteilung, ob in diesem Bild BrdU+ Zellen vorhanden sind, ist kaum möglich. Dennoch sind viele implantierte, Fast blue+ Zellen zu erkennen, die bis an den Rand des Bildes reichen. Scale bar bei 20x Vergrößerung: 25 µm, bei 40x Vergrößerung: 12,5 µm

### 3.2.3 AUTORADIOGRAPHIE

Die <sup>123</sup>I-BCIT-Autoradiographiebilder dienen dazu, einerseits die neurale Dopamindepletion, andererseits die Lokalisation von Transplantatgewebe zu veranschaulichen. Dazu wurden rostrale, mediale und dorsale Schnitte von der Substantia nigra und dem Striatum angefertigt. Zur Dekapitation und Entnahme der Hirne verweise ich auf den Abschnitt Material und Methoden.

Für die Anfertigung von Substantia nigra Schnitten am Kryotom diente zur Orientierung und Detektion der Struktur die Hippocampusformation, die makroskopisch deutlich zu erkennen ist. Insbesondere der Gyrus dentatus wurde dabei als Leitstruktur herangezogen, der makroskopisch ebenfalls gut auszumachen ist. Als Quelle diente der Rattenatlas von G. Paxinos und C. Watson (rat brain atlas fig. 38-44).

In den rostralen Abschnitten sieht man eine deutliche Depletion, die sich v.a. auf die Pars compacta erstreckt. Trotz der teilweise schwachen Kontrastverhältnisse der Präparate läßt sich eine Differenz zwischen der intakten linken und der lädierten rechten Seite ausmachen. Erschwert wird die Beurteilung durch den relativ geringen Anteil der Pars compacta an der gesamten Substantia nigra. Dennoch fällt in allen Abschnitten, die angefertigt wurden, gerade in dem Areal, in dem der kompakte Teil angelegt ist, im Vergleich zur Gegenseite eine Intensitätsabblassung auf, die auch durch das transplantierte Gewebe nicht kompensiert werden kann.

Vergleicht man die Bilder der Tiere, die Zellen unterschiedlicher Passage (früh-spät) erhalten haben, sind in der Reinnervation dem Bild nach keine eindeutigen Unterschiede auszumachen. In den Bildern sind die oben beschriebenen Seitenunterschiede vorhanden und in beiden Fällen ist eine ausreichende Kompensierung durch die implantierten Grafts ausgeblieben, wie auch anhand der motorischen Tests deutlich wird. Desweiteren zeigen die beiden Bilder unterschiedliche Abschnitte der Substantia nigra.

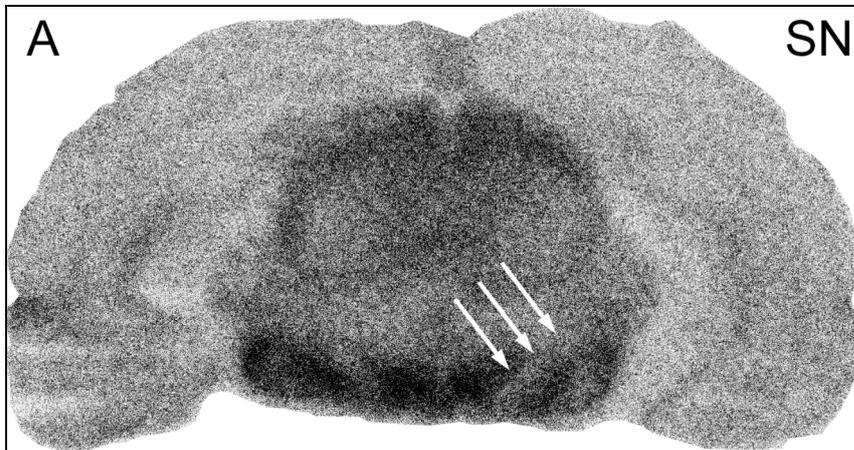
Anhand der Schnitte eines Tieres konnte gezeigt werden, wie der Verlauf des Stichkanals und die definitive Position eines Grafts ist. Hierbei ist zu erwähnen, daß dieses Tier mit einer Metallkanüle implantiert wurde. Dennoch verdeutlicht dieses Bild, daß anhand der stereotaktischen Koordinaten gezielt Gewebe an den Zielort gebracht werden konnte.

Zur Anfertigung der Striatumschnitte wurde ebenfalls der Rattenatlas herangezogen. Das Striatum an sich ist so groß, das es makroskopisch eindeutig zu erkennen ist und keine Leitstrukturen benötigt werden (rat brain atlas fig. 10-35).

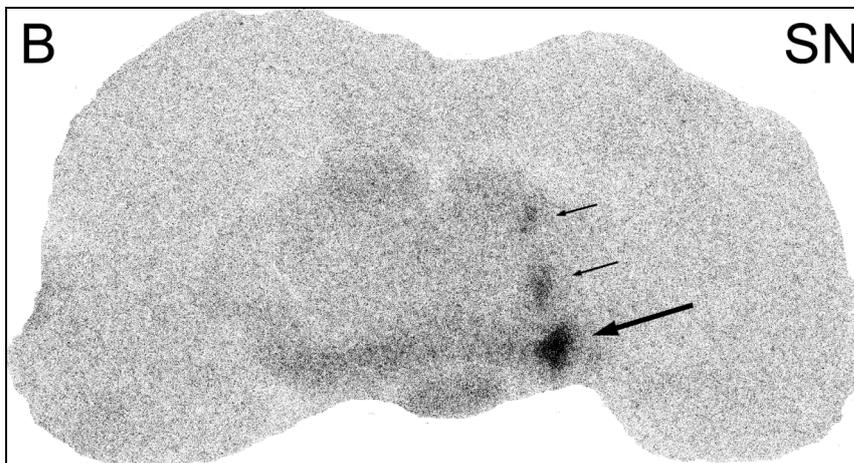
Die Darstellung der Dopamindepletion läßt sich anhand des Striatums ungleich deutlicher darstellen als mit Substantia nigra Schnitten. Sowohl in den rostralen, als auch in den medialen und dorsalen Bereichen ist eine deutliche Abblassung auf der lädierten Seite zu erkennen, wenn man die intakte Seite als Referenz hinzuzieht. Desweiteren fällt auf, dass der latero-craniale Teil des Striatums teilweise geschädigter und denervierter erscheint als

der medio-caudale Abschnitt. Dies gilt sowohl für die medialen als auch für die dorsalen Areale.

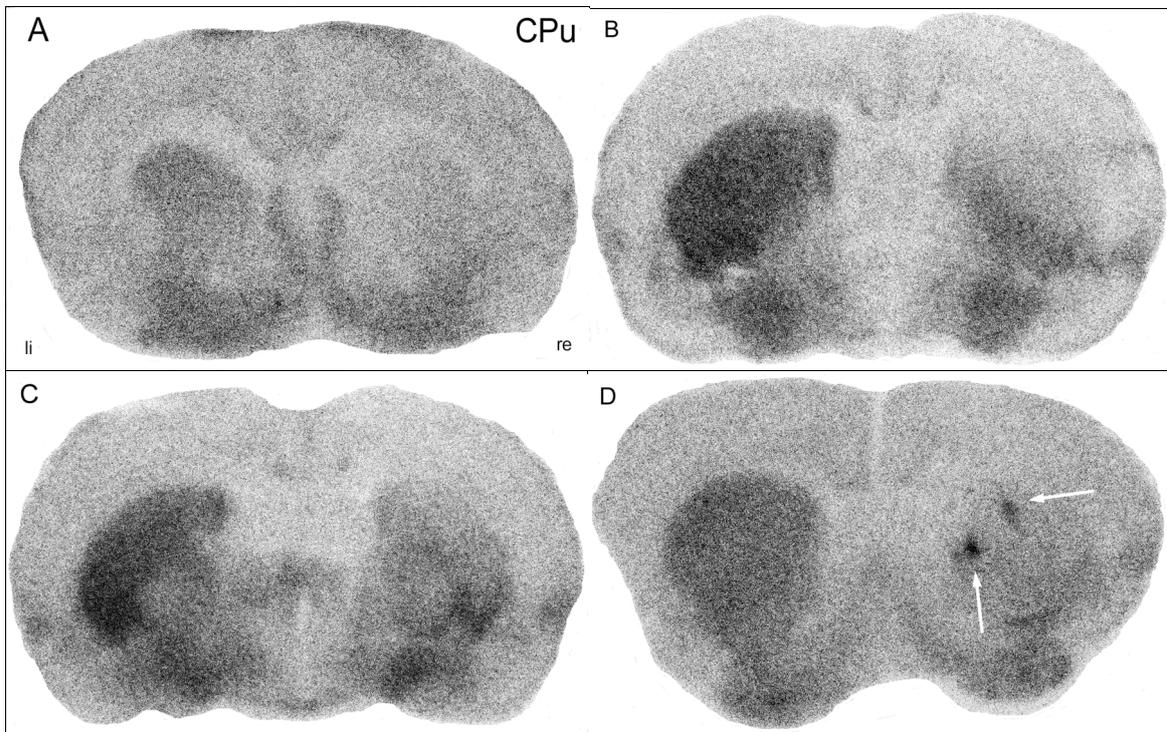
Auch hier konnte gezeigt werden, daß Transplantatgewebe an den Zielort gebracht werden kann.



**Abb. 21 Schnitt durch die dorsale Substantia nigra.** Deutlich zu sehen ist die Abblassung der Struktur nach Läsion mit 6-OHDA (weiße Pfeile).



**Abb. 22 Autoradiographische Markierung des Grafts.** Deutlich zu erkennen ist die Lokalisation der implantierten Zellen in der Substantia nigra (großer Pfeil), zwei weitere Zellcluster befinden sich weiter kranial und markieren den Injektionsstrakt der Kapillare.



**Abb. 23 Autoradiographie des Striatums.** Dargestellt sind Schnitte des ventralen (A), medialen (B) und dorsalen Striatums (C). In allen Abschnitten ist eine deutliche Seitendifferenz im dopamindepletierten Ncl. caudatus und Putamen zu verzeichnen, v.a. im vorderen und mediolateralen Teil. Im dorsalen Striatum fällt die Differenz weniger ausgeprägt aus. In einem weiteren Bild ist die Lokalisation implantierter Grafts zu erkennen (D), regelrecht platziert in der Zielstruktur. Sie scheint relativ scharf abgegrenzt. Eine dopaminerge Reinnervation läßt sich anhand dieser Darstellung nicht festmachen,

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Studie sollte geklärt werden, ob und inwieweit adulte neuronale Stammzellen in die Zielstrukturen Striatum und Substantia nigra eingebracht werden können.

Ursprünglich entwickelt wurde das Implantationsmodell von A. Björklund et al., bei dem eine Zellsuspension in das Zielgewebe eingebracht wurde und damit kleine homogene Zellnester entstanden. Modifiziert wurde dieses Verfahren 1994 von einer Arbeitsgruppe um G. Nikkhah, die neurales Gewebe in Suspension mit Hilfe einer Glaskapillare applizierten und somit wesentlich schonender transplantieren konnten (Nikkhah et al., 1994c).

Wir orientierten uns an dieser Vorgehensweise. Uns gelang es, mit Hilfe einer Handpumpe, einem mit Paraffinöl entlüfteten Schlauchsystems, an dessen Ende sich eine Glaskapillare aus eigener Herstellung befand, Einzelzellsuspensionen in das Striatum und in die Substantia nigra einzubringen. Dabei wurden ca. 450000 adulte Progenitorzellen an

sechs verschiedene Loci im Striatum und ca. 300000 Zellen, verteilt auf 4 Loci, in die Substantia nigra eingebracht.

Wie schon in vorhergehenden Studien mit embryonalen neuronalen Vorläuferzellen konnte mit diesen Materialien das Operationstrauma reduziert werden; zudem wurde das Graft deutlich besser in das Empfängergewebe integriert. Dies spiegelte sich in einer homogenen Morphologie und einer ansatzweisen Verbesserung in den sensomotorischen Tests wider.

Im Folgenden sollen nun einzelne Aspekte aus unserer Arbeit erörtert werden, die im Hinblick auf unsere zukünftigen Experimente optimiert werden können.

## **4.1 OPERATIONSprotokoll**

### *4.1.1 TRAUMA*

Mit dem immunhistochemischen Nachweis von glial fibrillary acidic protein (GFAP) ist es möglich, eine Aussage darüber zu treffen, in welchem Ausmaß sich eine Entzündungsreaktion anschließt, initiiert von Astrozyten des Empfängergehirns.

In den Bildern in der Hellfeldmikroskopie läßt sich erkennen, daß eine mäßige Entzündungsreaktion stattfindet. Diese findet vornehmlich innerhalb des Grafts statt und nur zu geringen Anteilen in der Umgebung. Zieht man nun die Bilder der Immunhistochemie hinzu, in denen sichtbar wird, daß die implantierten Zellen sich nur vereinzelt zu Astrozyten differenzieren zu scheinen, muß diese Reaktion von dem Empfängergewebe ausgehen. Bei Betrachtung des Einstichkanals ist nur eine leichte Entzündungsreaktion sechs Wochen nach Transplantation zu erkennen. Diese scheint auch vom Empfängergewebe auszugehen, wie es in der Immunhistochemie deutlich wird.

Desweiteren kann man als Vergleich ein Tier hinzuziehen, welches mit Metallkanüle implantiert worden ist. Bei diesem Tier zeigt sich auch eine deutliche Entzündungsreaktion in der Umgebung des Grafts; diese entsteht möglicherweise aus dem ca. siebenfach größeren Durchmesser der Injektionskanüle und zum anderen durch eingebrachte Artikel von Paraffin/Staub oder ähnlichem.

Obwohl schon deutlich geringer als bei der Implantation mit einer Metallkanüle, scheint sich eine Affektion des umgebenden Gewebes trotz mikrotraumatischer Applikation mit einer Glaskapillare nicht vollständig vermeiden zu lassen. Dennoch lassen sich die Ergebnisse zuvor gemachter Studien bestätigen, daß eine deutlich geringere Traumatisierung gemacht wird. Und dies sowohl in den Implantationsloci selbst als auch im Einstichkanal.

### *4.1.2 DIE LÄSION MIT 6-OHDA*

Die Operationen verliefen problemlos. Die Narkoseeinleitung mit Ketamin und Xylazin verlief komplikationslos. Auch die weiteren Schritte wie die Trepanation und die Injektion des Toxins in die Zielstrukturen verliefen ohne Probleme. Größere Blutungen, z.B. nach Verletzung des Sinus sagittalis superior, konnten stets mit geringen Mengen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gestillt werden.

Wie aus unserem Studiendesign hervorgeht, erfolgt die Injektion des Toxins in das nigrostriatale und mediale Vorderhirnbündel. Somit handelt es sich um eine unselektive Degeneration der dopaminführenden Afferenzen. Eine selektivere Destruktion z.B. durch direkte intrastriatale Injektion in Hinsicht auf das Outcome nach Implantation der Grafts ist

möglicherweise aussagekräftiger, weil eine geringere Läsion auftritt und intrastriatale Implantate somit einen höheren Effekt aufweisen. Dies würde vielleicht eher einem früheren klinischen Stadium der Parkinson'schen Erkrankung entsprechen.

#### *4.1.3 TRANSPLANTATION DER PROGENITORZELLEN*

Probleme ergaben sich im Rahmen der Anästhesie, da die Tiere ca. 90-120 Minuten narkotisiert werden müssen; da die Halbwertszeit vor allem des Ketamins deutlich kürzer ist, mußte nachappliziert werden, was teilweise zu Narkosezwischenfällen mit Versterben des Tieres endete.

#### *4.1.4 INJEKTIONSSYSTEM*

Wir benutzten ein Injektionssystem, welches per Hand über eine Pumpe betrieben wurde. Probleme traten vor allem in der Hinsicht auf, daß die Injektion der Suspension vereinzelt ruckartig erfolgte. Dies liegt vermutlich an einer gewissen Inkongruenz zwischen der Pumpe und dem Paraffinöl. Dabei wurde bei einer bestimmten Anzahl von Umdrehungen an der Pumpe nicht die dementsprechende Menge injiziert. Sobald man weiterdrehte, erfolgte dann eine relativ rasche Injektion in das Gewebe, nachdem dessen Druck bzw. Widerstand überwunden war. Dadurch ließ sich die Applikation der Suspension erschwert durchführen, wodurch sich die Menge des injizierten Gewebes auch teilweise nur schätzen ließ. Dieser Umstand erschwerte vor allem die Injektionen in die tieferen Loci der Trakte vornehmlich der Substantia nigra. Bei den oberflächlicher gelegenen Loci war das Gewebe schon durch die Injektionskanüle auseinandergedrängt worden und der Widerstand im Gewebe somit geringer.

Die Aspiration der Zellsuspension ist nur nach guter, aber vorsichtiger Durchmischung in einem Eppendorfgesäß möglich.

#### *4.1.5 GLASKAPILLAREN*

Die überwiegende Anzahl der Kapillarspitzen hatte einen Durchmesser von 70-80 µm, gemessen unter einem Mikroskop mit Eichskala.

Die Länge des sich verjüngenden Abschnitts, der in das Gewebe hinabgelassen wird, ist problematisch. Diese Komplikation zeigte sich vor allem bei der Implantation von Zellen in die Substantia nigra, da die Kapillarenspitze teilweise kürzer war als der Implantationstrakt (~ 8mm); dies führte zu einer Verdrängung oberflächlicher kortikaler Strukturen durch den zunehmenden Durchmesser des Konus der Kapillare.

Es gibt unterschiedliche Erklärungsansätze für die bestehenden Probleme und die unzureichenden Ergebnisse im Tiermodell und in der klinischen Erprobung. Zunächst ist die stereotaktische Operation mit der Eröffnung der Blut-Hirn-Schranke verbunden, so daß dadurch eine erhöhte Infektionsgefahr besteht. Ratten bieten sich deshalb als Versuchsobjekte an, weil sie sehr resistent in bezug auf Entzündungen sind. Das Einführen der Injektionskanüle stellt einen sehr traumatischen Eingriff dar. Der äußere Durchmesser beträgt ungefähr 500µm und hinterläßt somit einen großen Einstichkanal.

Desweiteren führt die mechanische Beanspruchung und das Einbringen von allogenen Transplantaten zu einer astrozytären Reaktion und zu einer „Narbenbildung“, die jedoch nicht zwangsläufig zum Untergang des implantierten Gewebes führen muß. Dennoch wird die Überlebensrate der Grafts dadurch sehr dezimiert, so daß möglicherweise nur 5-10%

der ursprünglich implantierten Zellzahl überlebt (Abrous et al., 1988; Brundin et al., 1989; Barker et al., 1996).

#### 4.2 IST EINE AUSSAGE ÜBER DIE ANZAHL DEGENERIERTER NEURONE MÖGLICH?

Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die Tiere erkrankt sind, kann man die Daten der Apomorphin- und Amphetamin- Rotation heranziehen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kommt es zu einem gerichteten Drehverhalten kontralateral zur lädierten Seite bei Apomorphinapplikation. Dies geschieht, wenn die Dopaminmenge um mindestens 90% der ursprünglichen Konzentration reduziert wurde. Nach Amphetaminapplikation rotieren die Tiere nach ipsilateral. Dabei ist ca. 50-70% der ursprünglichen striatalen Transmitterkonzentration depletiert. Das Verhalten der Tiere unter Apomorphin ist nach den beschriebenen Fakten somit aussagekräftiger, weil hier auf eine komplette Läsion hingewiesen wird.

Wir haben die Tiere erstmals vier Wochen nach der 6-OHDA-Läsion auf ihr Verhalten hin getestet. Einschlußkriterium für die nachfolgende Transplantation war die Amphetaminrotation, bei der die Tiere mindestens sechs Umdrehungen pro Minute zu vollführen hatten. Somit können wir davon ausgehen, daß alle Ratten zumindest eine partielle Läsion hatten, d.h. also, daß ein mindestens 50%-iger einseitiger Dopaminverlust vorliegt.

Diese Tatsache spiegelt sich auch in den Autoradiographiebildern wider. Anhand dieser Methode ließen sich die striatale und nigrale Dopamindepletion erfassen. Der Dopamingehalt im Striatum solcher Tiere mit vollständiger Läsion des nigrostriatalen Systems, die über das Rotationsverhalten nach Apomorphin- und Amphetaminapplikation detektiert werden konnten, liegt laut früheren Studien bei weniger als 2% im Striatum und 1-4% im Ncl. accumbens (Nikkhah et al., 1994b; Olsson et al., 1995).

#### 4.3 BETRACHTUNG DER IMPLANTATIONSLOKALISATIONEN

##### 4.3.1 INTRASTRIATALE TRANSPLANTATION

In der vorliegenden Studie haben wir Verhaltensmuster von Tieren mit rechtsseitiger Läsion dopaminergischer nigrostriataler Trakte untersucht. Dabei konnten stabile Verhaltensänderungen in verschiedenen Tests gefunden werden. Die Ratten zeigten Apomorphin- und Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten. Außerdem konnte eine ausgeprägte Hypo-/Akinesie der Vorderpfoten in mehreren Tests festgestellt werden. Von der Läsion nicht beeinträchtigt war die Spontanaktivität.

Einen Monat nach Läsion zeigten die Tiere etwa 10 Körperumdrehungen pro Minute nach Applikation von Amphetamin. Rotationsverhalten tritt auf, wenn die Dopaminkonzentration und die Rezeptordichte interhemisphärische Unterschiede aufweist (Dunnett und Robbins, 1992). Dabei liegt ein unilateraler Dopaminverlust von mindestens 50% vor. Allerdings ist die Korrelation zwischen dem Ausmaß der Läsion und der Anzahl der Umdrehungen gering (Hudson et al., 1993).

Apomorphininduziertes Verhalten ist bedingt durch eine Hochregulation striataler postsynaptischer Dopaminrezeptoren auf der ipsilateralen Seite der Läsion und tritt auf

nach Degeneration von über 90 % der dopaminergen Neurone in der SNc. Nach Applikation von Apomorphin ausgelöstes Rotationsverhalten korreliert mit dem Ausmaß der Degeneration und tritt auch auf nach kompletter Läsion des medialen Vorderhirnbündels, wie es in dieser Studie durchgeführt wurde und teilweise zu beobachten ist (Nikkhah et al., 1994a, b und 1998).

In den Tests zur Einschätzung der kontralateralen Vorderpfotenbeweglich- und geschicklichkeit traten zum Teil erhebliche Defizite auf.

Im Side Stepping Test waren in der Vorhandrichtung die Anzahl der Schritte um bis zu 90 % des Ausgangswerts reduziert, für die Rückhand wurden etwa 60-70 % des Ausgangswerts gemessen.

Auch im Side Falling Test konnten für alle Gruppen deutlich geringere Werte für die kontralaterale Vorderpfote gemessen werden.

Olsson et al. beschrieben 1995 die auch in dieser Arbeit verwendeten Versuche, um eine Einschätzung der Vorderpfotenakinesie vornehmen zu können. Die Arbeitsgruppe beschrieb ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Studie. Auch dort wurde eine starke Verminderung der Ausgleichsschritte im Side Falling Test beschrieben. Die Tiere sind ebenfalls einseitig mit 6-OHDA behandelt worden. War der Läsion eine Test- und Übungsserie vorangegangen, konnten sogar noch grössere Defizite detektiert werden. Dementsprechend muß bei diesen Tieren davon ausgegangen werden, daß ca. 60-70 % der TH-positiven Fasern im mittleren und lateralen Striatum degeneriert sind. Eine derartige Läsion und Degeneration ist notwendig, damit oben beschriebene Defizite in den genannten Tests auftreten (Nikkhah et al., 1998; Kirik et al., 1998; Olsson et al., 1995).

Wesentlich entscheidend hierfür ist die Wahl der Injektionsorte. Wie auch in dieser Arbeit durchgeführt, kann mit Injektion des Toxins 6-OHDA in die Substantia nigra und in das mediale Vorderhirnbündel eine fast komplette Depletion der dopaminergen Zellen in der SN erreicht werden. Das Resultat ist eine deutlich verminderte Dopaminkonzentration im Striatum (Schmidt et al., 1983).

Alternativ hierzu kann man auch direkt das Toxin in das Striatum applizieren. Auch hierbei kommt es zu einem konsekutiven striatalen Dopaminmangel und einer Degeneration der nigrostriatalen Fasern und zu einem Untergang der Neurone in der SNc. Entscheidend hierfür ist vor allem die Verteilung des Toxins auf mehrere Lokalisationen unter Einschluß des kaudalen Striatums und einer Mindestmenge an Toxin von 28µg. Führt man die Läsion unter diesen Prämissen durch, werden bis zu 90 % der striatalen TH- positiven Fasern zerstört (Kirik et al., 1998; Sauer und Oertel, 1994).

Ein weiterer Test zur Einschätzung der Vorderpfotengeschicklichkeit stellt der sog. Staircase Test dar. Wie auch in dieser Studie beschrieben, kommt es nach unilateraler Läsion mit 6-OHDA zu einer deutlichen Einschränkung der Geschicklichkeit, die auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wird (Nikkhah et al., 1998). Bei Defiziten in diesem Test muß man mit einem Verlust von ca. 80-95 % der lateralen TH-positiven Fasern rechnen, was einer Reduktion der striatalen Dopaminkonzentration von ungefähr 80-90 % entsprechen würde. Und verschiedene Arbeiten zur Beschreibung der funktionellen Anatomie der Basalganglien weisen darauf hin, daß das laterale Striatum eine wichtige Rolle in der Geschicklichkeit der Extremitäten zu spielen scheint. Da wir anhand oben beschriebener Tatsachen davon ausgehen können, daß die Tiere in dieser Studie an Parkinson erkrankten, stellt sich die Frage, warum die Implantation der adulten Progenitorzellen zu keiner oder nur ansatzweise, möglicherweise spontanen Verbesserung der Symptomatik führte (Amalric et al., 1995; Nikkhah et al., 1998; Kirik et al., 1998).

Die angewandte Technik der Mikrotransplantation bietet die Möglichkeit, neuronales Gewebe an unterschiedliche, multiple Lokalisationen einzubringen. Durch kleine, sich gut in das Empfängergewebe integrierende Implantate kann sowohl die Vitalität der Grafts sichergestellt als auch eine umfassende Reinnervation großer Teile des Striatums erreicht

werden. In dieser Studie wurden ca. 450000 adulte neuronale Progenitorzellen in das Striatum und ca. 300000 Zellen in die Substantia nigra implantiert. Identische Mengen wurden in anderen Studien verwendet. Das Resultat war, daß eine Steigerung der Dopaminkonzentration von  $\leq 1\%$  post laesionem auf ca. 30 % post transplantationem bei Verwendung von fetalem neuronalem Gewebe erzielt werden konnte. In Studien, in denen die Menge der implantierten Zellzahl verdoppelt wurde, konnte zwar eine höhere Reinnervation von 45-80 % erzielt werden. Die Ergebnisse der Verhaltenstests spiegelten allerdings einen nahezu identischen funktionellen Effekt wider, d.h. es wurde kein besseres outcome erzielt (Nikkhah et al., 1993).

Aus der Literatur geht hervor, daß ab einer striatalen Dopaminkonzentration bzw. dopaminergen Reinnervation von 30 % Verbesserungen in den Verhaltenstests erzielt werden können. Erreicht man einen Reinnervationsgrad von mindestens 50 %, kann man bei den betroffenen Tieren von einem nahezu normalen Verhalten ausgehen. Dennoch scheint es so, daß zwischen Verhalten und Reinnervation keine lineare Korrelation bestünde, wenn bei zunehmender Reinnervation keine besseren funktionellen Effekte erzielt werden (Nikkhah et al., 1993).

Für diesen Zusammenhang wurden unterschiedliche Erklärungsversuche unternommen. Verschiedene Studien überprüften die Hypothese, ob für eine ausreichende Therapie der komplexen Verhaltensweisen noch weitere, auch ursprünglich dopaminerg innervierte Regionen außerhalb des Striatums reinnerviert werden müssen. Denn bei der Injektion von 6-OHDA in das MFB und die Substantia nigra, wie in der vorliegenden Arbeit auch durchgeführt, könnten auch andere Areale, z.B. limbische und kortikale Regionen, denerviert werden, was Einfluß auf Sensomotorik und Motivation der Tiere haben könnte. In Studien mit striataler 6-OHDA-Injektion wurde dieser Behauptung nachgegangen. Das Resultat widerspricht aber der genannten Hypothese. Denn durch die selektive striatale Injektion bleiben die limbischen und kortikalen Regionen intakt oder werden nur partiell lädiert. Es wurden multiple Implantate in das Striatum eingebracht. Es zeigten sich daraufhin zwar Verbesserungen in den Verhaltenstests, eine komplette Normalisierung war jedoch nicht zu verzeichnen. Daraus läßt sich schließen, daß die Dopamindenervation in den limbischen und kortikalen Regionen nicht der entscheidende Faktor ist, der in Tieren mit kompletter 6-OHDA-Läsion eine vollständige Normalisierung unterbindet (Lewis und Sesack, 1997; Rodter et al., 2000).

Ein weiterer Aspekt, der in Betracht gezogen werden sollte, ist die heterotope Implantation der Grafts. Bei zwei Gruppen in dieser Arbeit (Gr. 1 und 3) wurde das Gewebe in das Striatum eingebracht, d.h. potentiell dopaminerge Neurone befinden sich entfernt von ihrer ursprünglichen Position in der SNc. Das bedeutet, daß sie möglicherweise anderen Regulationsmechanismen unterliegen als in ihrer ursprünglichen Umgebung. Dort wird die Aktivität durch Afferenzen aus dem Globus pallidus, dem Ncl. subthalamicus, aber auch aufsteigender Bahnen vom Ncl. pedunculopontinus und den Raphekernen reguliert (Lewis und Sesack, 1997).

Eine geringe Dopaminausschüttung findet demnach aus den Neuronen der Substantia nigra konstant statt. Bei Bedarf kann die Sekretion „geboostert“ werden. Bei ektopt platzierten Neuronen stellt sich die Frage, ob sie diesem gleichen Mechanismus unterliegen.

Verschiedene Studien konnten zeigen daß heterotop implantiertes Gewebe einer Autoregulation unterliegt, die dazu führt, daß Dopamin in einem tonischen Zyklus sezerniert wird. Dies weist daraufhin, daß die Zellen vital sind und in das umgebende Empfängergewebe integriert worden. Zusätzlich konnte noch nachgewiesen werden, daß die Grafts efferente und afferente synaptische Verbindungen mit dem Empfängergewebe bilden (Freund et al., 1985; Strecker et al., 1987; Clarke et al., 1988; Rioux et al., 1991).

Oben aufgeführte Aspekte wurden in Studien erarbeitet, in denen fast nur embryonales und fetales neuronales Gewebe verwendet wurde. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, liegen

für embryonale und fetale Transplantate wesentlich mehr Erfahrungsberichte vor. In einzelnen Arbeitsgruppen konnte jedoch nachgewiesen werden, daß adulte neuronale Progenitorzellen sich in das Empfängergewebe integrieren lassen, die Zellen vital sind und tendenziell Dopamin produzieren (Svendsen et al., 1996; Yang et al., 2002; Burnstein et al., 2004). Diese Ergebnisse können wir anhand der vorliegenden Studie tendenziell bestätigen. Vor allem die Gruppen 1 und 3 zeigen dies.

Wie auch bei embryonalem Gewebe, scheint bei der Implantation von adulten Zellen die Umgebung eine maßgebliche Rolle zu spielen (Vicario-Abejon et al., 1995; Gage et al., 1995).

Betrachtet man nun die beiden wesentlichen Mechanismen, die der Dopaminausschüttung in tonischer Form und die Integration der Zellen in die Umgebung mit Ausbildung interzellulärer Kommunikation, scheint es so zu sein, daß eine alleinige Dopaminsubstitution nicht für eine Wiederherstellung des Verhaltens ausreichend ist. Dieses kommt vor allem bei komplexen Tests wie dem Side Stepping und Staircase Test zu tragen, bei denen auch in dieser Studie keine signifikanten Verbesserungen eingetreten sind.

Eine Wiederherstellung des normalen Verhaltens in komplexen sensomotorischen Tests wäre prinzipiell erst dann zu erwarten, wenn das implantierte Gewebe denselben Regulationsmechanismen unterworfen wäre, wie sie in der Substantia nigra vorherrschten. Weiterhin muß in Betracht gezogen werden, daß in Studien mit partiell lädierten Tieren, d.h. striatale 6-OHDA- Injektion oder ein Rotationsverhalten nach Amphetamin- nicht aber nach Apomorphinapplikation, Kompensationsmechanismen auftreten, die ein vermeintliches Benefit durch implantiertes Gewebe vorgeben.

Dabei kann zum einen das kontralaterale nigrostriatale System über Kommissurenfasern Einfluß nehmen. Dies resultiert in einer erhöhten Dopaminfreisetzung oder in einem erhöhten Dopaminumsatz (Nieoullon et al., 1977; Rodriguez et al., 1990).

Zum anderen kann es ipsilateral zu einem erhöhten Dopaminstoffwechsel der verbliebenen dopaminergen Neurone kommen. Daraufhin können trotz vorangegangener Läsion fast normale Dopaminkonzentrationen im Striatum nachgewiesen werden (Hefti et al., 1980; Garris et al., 1997). In der vorliegenden Studie könnte man diesen Umstand in Betracht ziehen z.B. für das Rotationsverhalten nach Apomorphin nach 20 Wochen Beobachtung in der Gruppe 1 oder die Rotation unter Amphetamin in der Gruppe 2 nach 20 Wochen. Auch in den komplexeren Verhaltenstests kann man diese Beobachtung machen.

Ein weiterer Aspekt, der in der Einleitung angerissen wurde und hier berücksichtigt werden soll, ist die Rolle von Neuropeptiden wie Dynorphin, Enkephalin und Substanz P.

Nach Implantation von fetalem Gewebe aus dem ventralen Mesencephalon konnte eine partielle Normalisierung der zum Teil kompensatorisch hochregulierten Peptidexpression nachgewiesen werden. Im indirekten Weg (SNc  $\Rightarrow$  CPu  $\Rightarrow$  GPe  $\Rightarrow$  STN  $\Rightarrow$  GPi  $\Rightarrow$  Thalamus) konnte nach Implantation der Grafts ein Rückgang der Dopamin D2- und der Enkephalinexpression registriert werden, die nach der Läsion hochreguliert waren. Im direkten Weg (SNc  $\Rightarrow$  CPu  $\Rightarrow$  GPi  $\Rightarrow$  Thalamus) blieb die Expression von Substanz P nach der Transplantation unverändert. Somit wäre zu überlegen, ob die implantierten Gewebe im indirekten Weg einen größeren Effekt erzielen als im direkten Weg. Damit stellt sich die Frage, ob genau dieser Unterschied in den beiden Projektionswegen der Schlüssel ist, der verhindert, daß trotz ausreichender Dopaminkonzentration, aber unzureichender interzellulärer Konnektivität eine vollständige Normalisierung des Verhaltens erreicht wird. Wie in den verschiedenen Studien gezeigt wurde, hängt die Normalisierung der Peptidexpression auch von der Menge der implantierten Zellen ab. Ist bei der Enkephalinexpression schon ein Rückgang bei relativ geringen Mengen an intrastriatalem Gewebe zu verzeichnen, ändert sich die Expression von Substanz P im direkten Weg auch bei relativ großen Mengen nur geringfügig bis gar nicht (Cenci et al.,

1993). Im Umkehrschluß würde man sagen können, daß Enkephalin bei autoregulatorischer tonischer Freisetzung und unzureichender Integration des Gewebes normalisiert werden kann, wohingegen für die Regulation von Substanz P eine weiterreichende Ausbildung von Afferenzen und Efferenzen stattfinden müßte.

#### 4.3.2 INTRANIGRALE TRANSPLANTATION

In der vorliegenden Studie haben wir ca. 300000 adulte neuronale Progenitorzellen in die Substantia nigra implantiert. Vorteil dieser Vorgehensweise ist, daß die Zellen homotop eingebracht werden und somit die Möglichkeit besteht, daß die Zellen in die Regulationsmechanismen integriert werden, denen zuvor die degenerierten Neurone unterworfen waren.

Nachteil dieser Methode ist, daß die Substantia nigra eine relativ kleine und tiefliegende Struktur im Mittelhirn darstellt. Die Implantation wird dadurch ungemein schwieriger als bei dem Einbringen von Transplantaten in das Striatum.

Die autoradiographisch untersuchten Tiere zeigten in den Präparaten, daß eine Depletion im Vergleich zur kontralateralen Seite zu erkennen war, obwohl sie schwieriger zu detektieren ist als bei dem Vergleich der beiden Striatumhälften. Alle Tiere hatten immunhistochemisch vitale Zellen, die ohne größere Entzündungszeichen oder Narbenherde in die Umgebung integriert worden waren und zum Teil TH-Positivität zeigten. Eine Beurteilung des Faserwachstums kann nur unzureichend gemacht werden, da das Schnittverfahren dieser enge Grenzen setzt. Aus vorhergehenden Studien mit fetalem Gewebe kann aber davon ausgegangen werden, daß ein Auswachsen von Fasern bis in das Striatum unwahrscheinlich ist.

Wie auch in anderen Studien, sind in der vorliegenden Arbeit keine Verbesserungen im Amphetamin-induzierten Rotationsverhalten aufgetreten (Bjorklund et al., 1983; Nikkhah et al., 1994b; Mendez et al., 1996). Dies gilt auch für Apomorphin-induziertes Verhalten. In einer Studie von 1994 konnte gezeigt werden, daß eine Verbesserung im Apomorphin-induzierten Verhalten dann zu erwarten ist, wenn eine ausreichend große Anzahl an vitalem dopaminergem Gewebe vorhanden ist, die über einem bestimmten Grenzwert liegen muß, bevor eine Änderung im Verhalten sichtbar wird (Nikkhah et al., 1994b). Da bei unseren Tieren aufgrund der Werte in der Apomorphinrotation teilweise eine unvollständige Läsion anzunehmen ist, ist auch von einer möglichen spontanen Verbesserung der Tiere auszugehen. Und, wie bereits erwähnt, waren z.B. in Gruppe 1 und 4 nur noch zwei Tiere nach 20 Wochen beurteilbar. Dennoch sollte man die Erfolgsergebnisse, die eine mögliche Verbesserung der Motorik darstellen würden, beachten. Insgesamt müssen die Einschlußkriterien aber strenger gewählt werden, um eine befriedigende Aussage machen zu können.

Im Gegensatz zu Untersuchungen mit fetalem Gewebe konnten wir in unserer Studie keine graftvermittelten Verbesserungen in den komplexen Verhaltenstests festhalten. Dies trifft sowohl für Tiere zu, die Zellen unterschiedlicher Entwicklungsstufe (früh/spät) in das Striatum bekamen, als auch für Tiere, die Implantate in die Substantia nigra erhielten. Maßgeblich entscheidend ist das schwierige Implantationsprotokoll, das möglicherweise zu wenige Loci vorsieht und die Menge der eingebrachten Zellen unzureichend erscheint; dies spielt eine umso wichtigere Rolle, wenn besagter Grenzwert an vitalem Gewebe überschritten werden muß, um eine Veränderung im Verhalten herbeiführen zu können.

Die Ergebnisse der 20-Wochen Tiere deuten jedoch auf eine mögliche Besserung der Koordination der linken Extremität hin. Hierbei fällt v.a. die Gruppe 3 (späte

Zellpassage/Striatum) im Staircase Test auf, bei der fünf Tiere beobachtet werden konnten, die nach der Rotation auch eine vollständige Läsion gehabt haben müssen. Obwohl nur leicht erhöhte Werte nach 20 Wochen auftreten, deuten sie daraufhin, daß ein längerer Beobachtungszeitraum bessere Ergebnisse hervorbringen könnte.

Ein weiterer Umstand, der zu einer beschränkten Beurteilung der Grafts führte, ist, daß das immunhistochemisch untersuchte Tier mit einer Metallkanüle implantiert wurde, was, wie unter Material und Methoden aufgeführt, ein größeres Operationstrauma bewirkt. Dies führt zu einer stärkeren Entzündungsreaktion und zu einer Narbenbildung, welches sich auch in der GFAP-Reaktion der Präparate widerspiegelt. Die Zellen scheinen dennoch vital zu sein, zeigen bei negativer BrdU-Färbung aber keine Proliferationstendenz.

## **5. Zusammenfassung und Beurteilung**

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, daß es uns möglich war, eigens für diese Studie kultivierte adulte neurale Progenitorzellen unterschiedlicher Entwicklungsstufen in die Zielstrukturen Striatum bzw. in die Substantia nigra einzubringen.

Zusätzlich konnten wir zeigen, daß die immunhistochemisch untersuchten Gehirne vitale Transplantate zeigten, die ansatzweise Proliferationstendenzen aufwiesen. Die Ausführungen im Diskussionsabschnitt sollen dazu beitragen, die Ergebnisse von unterschiedlichen Blickpunkten und im Kontext des aktuellen wissenschaftlichen Stands aus zu betrachten. Positiv herauszustellen ist dabei die Tatsache, daß als Transplantatgewebe ethisch unbedenkliche adulte Neuronen verwendet wurden, die sowohl in wissenschaftlichen Kreisen als auch in der Öffentlichkeit weitgehend akzeptiert werden.

Ein Aspekt verbreiteter Therapiemodelle, der in zahlreichen Ländern eine öffentliche Diskussion angeregt hatte, ist der Umstand, daß Zellen von abgetriebenen Föten verwendet werden. Da jede einzelne Zelle bis zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Befruchtung durch die Totipotenz zu einem Menschen heranreifen könnte, sind heftige Kontroversen entfacht worden, die in Deutschland unter anderem zum Embryonenschutzgesetz geführt haben. Bis heute wird in Kirchen, Institutionen und öffentlichen Veranstaltungen diskutiert, wie mit diesem Wissenschaftszweig zu verfahren ist und es wird hinsichtlich der Historie in Deutschland dauern, bis ein Konsens gefunden sein wird. Nicht zuletzt die Erforschung adulter neuronaler Stammzellen trägt dazu bei, Ruhe und Rationalität in die unterschiedlichen politischen Lager zu bringen, weil weitere Therapieoptionen aufgetan werden.

Kritisch zu betrachten ist, daß nur ansatzweise funktionelle Verbesserungen in den von uns durchgeführten Verhaltenstests erreicht werden konnten. Deshalb müssen alle Arbeitsprozesse von der Kultivierung der Zellen über die Durchführung und Auswertung der Tests bis hin zu den Operationsprotokollen näher beleuchtet und gegebenenfalls überarbeitet werden. Einer besonderen Bedeutung kommt offensichtlich der Transplantation zu. Dabei scheint die Anzahl der implantierten Zellen und speziell die gleichmäßige Verteilung über die Zielstrukturen Striatum und Substantia nigra ausschlaggebend zu sein. In unserem Modell wurden adulte neuronale Progenitorzellen mithilfe einer Mikrotransplantationstechnik in o.g. Strukturen eingebracht. Hierbei wurden verschiedene Injektionsstrakte gewählt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Grafts zu gewährleisten. Mit Hilfe der gewählten Technik ist eine deutlich schonendere Implantation der Zellen möglich. Dies spiegelt sich zum einen in einer gesteigerten Vitalität der Zellen wider, zum anderen erhofft man sich hierdurch v.a. eine verstärkte

Funktionalität der Zellen, was sich in einer reduzierten Symptomatik ausdrücken sollte. Eine hinreichende Regredienz des klinischen Erscheinungsbildes ist jedoch weder in unserem Modell mit adulten Stammzellen noch mit fetalem Gewebe erzielt worden. Hierbei scheinen multiple Faktoren eine Rolle zu spielen: die Umgebung der Grafts nehmen essentiell Einfluß auf deren Dopaminproduktions- und Sekretionsmechanismen, Neuropeptide wie Dynorphin, Enkephalin bestimmen die Integration in die Umgebung. Durch eine unvollständige Läsion treten Kompensationsmechanismen, die eine exakte Aussage über die Funktion der Grafts deutlich erschweren. Und nicht zuletzt ist durch eine heterotope Implantation gezeigt worden, daß eine Integration auch in atypischer Lokalisation möglich ist, die Datenlage für adulte Stammzellen jedoch noch nicht ausreichend ist, um hinreichende Aussagen über Vitalität und Funktionalität treffen zu können.

### *5.1 KLINISCHE BEDEUTUNG UND ZUKÜNFTIGE FRAGESTELLUNGEN*

In überwiegend experimentellen Studien konnte nachgewiesen werden, daß bei fortgeschrittenen Parkinson-Erkrankungen funktionelle Verbesserungen durch Implantation neuronalen Gewebes erzielt werden konnte. Die vorliegende Studie soll dazu beitragen, klären zu können, ob sich adultes neurales Gewebe als weitere therapeutische Option eignet. Es hätte den Vorteil, aufgrund der ethischen Aspekte besser verfü- und einsetzbar zu sein und bei Versagen anderer Therapien eine Alternative darzustellen.

Die Anwendung von embryonalem Gewebe aus dem ventralen Mesencephalon hat schon gezeigt, daß die Substitution dopaminerger Neurone funktionelle Benefits hervorrufen kann. Dies wurde in klinischen Studien getestet. Dennoch sind die Ergebnisse noch für beide, für embryonale und adulte Gewebequellen unbefriedigend und starken inter- und intraindividuellen Schwankungen unterworfen. Daher ergeben sich neue experimentelle Fragestellungen, die in zukünftigen Studien geklärt werden könnten und im Einzelnen kurz aufgeführt werden:

Verhält sich adultes Gewebe wie embryonale Zellen?

Welche und inwieweit werden immunologische und regulatorische Prozesse induziert und beeinflußt?

In welcher Form findet eine Interaktion zwischen Graft und Empfänger statt?

Wann und wie findet die Sekretion von Dopamin statt und welche Faserbahnen sind daran beteiligt?

Wie kann die Integration der Grafts optimiert werden, z.B. durch Applikation von Wachstumsfaktoren oder modifizierte OP-Verfahren?

Welche Zielstruktur ist am ehesten geeignet, um funktionelle Effekte zu erzielen?

Mit diesen Fragen ist die Liste nur sehr unvollständig und gefundene Antworten werden neue Fragestellungen aufwerfen. Dennoch könnte die Beantwortung auch nur einer einzelnen Frage weitreichende Konsequenzen in der Behandlung des Morbus Parkinson haben. Zusätzlich könnten durch neuerworbene anatomische und physiologische Kenntnisse (z.B. die Ausbildung von interzellulären Afferenzen und Efferenzen) auch neue Therapieansätze für andere neurodegenerative Erkrankungen aufgetan werden.

## Literaturverzeichnis

1. Abrous, N., Guy, J., Vigny, A., Calas, A., Le Moal, M., Herman, J. P. Development of intracerebral dopaminergic grafts: a combined immunohistochemical and autoradiographic study of its time course and environmental influences. *J Comp Neurol* 273, 26-41 (1988).
2. Agid, Y., Chase, T., Marsden, D. Adverse reactions to levodopa: drug toxicity or progression of disease? *Lancet* 351, 851-2 (1998).
3. Agostino, R., Berardelli, A., Curra, A., Accornero, N., and Manfredi, M. Clinical impairment of sequential finger movements in Parkinson's disease. *Mov Disord* 13, 418-21 (1998).
4. Albanese, A., Colosimo, C., Bentivoglio, A.R., Fenici, R., Melillo, G., Colosimo, C., and Tonali, P. Multiple system atrophy presenting as parkinsonism: clinical features and diagnostic criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59, 144-51 (1995).
5. Altman, J., and Das, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-35 (1965).
6. Altman, J., and Das, G.D. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126, 337-89 (1966).
7. Amalric, M., Moukhles, H., Nieoullon, A., and Daszuta, A. Complex deficits on reaction time performance following bilateral intrastriatal 6-OHDA infusion in the rat. *Eur J Neurosci* 7, 972-80 (1995).
8. Anglade, P., Vyas, S., Hirsch, E.C., and Agid, Y. Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol Histopathol* 12, 603-10 (1997a).
9. Anglade, P., Vyas, S., Javoy-Agid, F., Herrero, M.T., Michel, P.P., Marquez, J., Mouatt-Prigent, A., Ruberg, M., Hirsch, E.C., and Agid, Y. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 12, 25-31 (1997b).
10. Antonini, A., Schwarz, J., Oertel, W.H., Beer, H.F., Madeja, U.D., and Leenders, K.L. [<sup>11</sup>C]raclopride and positron emission tomography in previously untreated patients with Parkinson's disease: Influence of L-dopa and lisuride therapy on striatal dopamine D2-receptors. *Neurology* 44, 1325-9 (1994).
11. Aoyama, S., Kase, H., and Borrelli, E. Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. *J Neurosci* 20, 5848-52 (2000).
12. Augood, S.J., and Emson, P.C. Adenosine A2a receptor mRNA is expressed by enkephalin cells but not by somatostatin cells in rat striatum: a co-expression study. *Brain Res Mol Brain Res* 22, 204-10 (1994).
13. Bakay, R.A., Raiser, C.D., Stover, N.P., Subramanian, T., Cornfeldt, M.L., Schweikert, A.W., Allen, R.C., and Watts, R. Implantation of Spheramine in advanced Parkinson's disease (PD). *Front Biosci* 9, 592-602 (2004).
14. Bal, A., Savasta, M., Chritin, M., Mennicken, F., Abrous, D.N., Le Moal, M., Feuerstein, C., and Herman, J.P. Transplantation of fetal nigral cells reverses the increase of preproenkephalin mRNA levels in the rat striatum caused by 6-OHDA lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway: a quantitative in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 18, 221-7 (1993).
15. Barker, R.A., Dunnett, S.B., Faissner, A., and Fawcett, J.W. The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. *Exp Neurol* 141, 79-93 (1996).
16. Barneoud, P., Descombris, E., Aubin, N., and Abrous, D.N. Evaluation of simple and complex sensorimotor behaviours in rats with a partial lesion of the dopaminergic nigrostriatal system. *Eur J Neurosci* 12, 322-36 (2000).
17. Baron, M.S., Vitek, J.L., Bakay, R.A., Green, J., Kaneoke, Y., Hashimoto, T., Turner, R.S., Woodard, J.L., Cole, S.A., McDonald, W.M., and DeLong, M.R. Treatment of advanced Parkinson's disease by posterior GPI pallidotomy: 1-year results of a pilot study. *Ann Neurol* 40, 355-66 (1996).

18. Beal, M.F., Hyman, B.T., and Koroshetz, W. Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci* 16, 125-31 (1993).
19. Bedard, A., Levesque, M., Bernier, P.J., and Parent, A. The rostral migratory stream in adult squirrel monkeys: contribution of new neurons to the olfactory tubercle and involvement of the antiapoptotic protein Bcl-2. *Eur J Neurosci* 16, 1917-24 (2002).
20. Benabid, A.L., Chirossel, J.P., Mercier, C., Louveau, A., Passagia, J.G., Henry, S., de Rougemont, J., and Vrousos, C. Removable, adjustable and reusable implants for stereotactic interstitial radiosurgery of brain tumors. *Appl Neurophysiol* 50, 278-80 (1987).
21. Benabid, A.L., Pollak, P., Gao, D., Hoffmann, D., Limousin, P., Gay, E., Payen, I., and Benazzouz, A. Chronic electrical stimulation of the ventralis intermedius nucleus of the thalamus as a treatment of movement disorders. *J Neurosurg* 84, 203-14 (1996).
22. Benabid, A.L., Pollak, P., Gervason, C., Hoffmann, D., Gao, D.M., Hommel, M., Perret, J.E., and de Rougemont, J. Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet* 337, 403-6 (1991).
23. Benabid, A.L., Pollak, P., Gross, C., Hoffmann, D., Benazzouz, A., Gao, D.M., Laurent, A., Gentil, M., and Perret, J. Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Stereotactic and functional neurosurgery* 62, 76-84 (1994).
24. Benazzouz, A., and Hallett, M. Mechanism of action of deep brain stimulation. *Neurology* 55, S13-6 (2000).
25. Berardelli, A., Dick, J.P., Rothwell, J.C., Day, B.L., and Marsden, C.D. Scaling of the size of the first agonist EMG burst during rapid wrist movements in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49, 1273-9 (1986).
26. Berg, D. Transcranial sonography in the early and differential diagnosis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl*, 249-54 (2006).
27. Bjorklund, A. Dopaminergic transplants in experimental parkinsonism: cellular mechanisms of graft-induced functional recovery. *Curr Opin Neurobiol* 2, 683-9 (1992).
28. Bjorklund, A., Stenevi, U., Schmidt, R.H., Dunnett, S.B., and Gage, F.H. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. II. Survival and growth of nigral cell suspensions implanted in different brain sites. *Acta Physiol Scand Suppl* 522, 9-18 (1983).
29. Blin, O., Desnuelle, C., Rascol, O., Borg, M., Peyro Saint Paul, H., Azulay, J.P., Bille, F., Figarella, D., Coulom, F., Pellissier, J.F., and et al. Mitochondrial respiratory failure in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 125, 95-101 (1994).
30. Bower, J.H., Maraganore, D.M., McDonnell, S.K., and Rocca, W.A. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* 52, 1214-20 (1999).
31. Brandis, A., Kuder, H., Knappe, U., Jodicke, A., Schonmayr, R., Samii, M., Walter, G.F., and Nikkhah, G. Time-dependent expression of donor- and host-specific major histocompatibility complex class I and II antigens in allogeneic dopamine-rich macro- and micrografts: comparison of two different grafting protocols. *Acta Neuropathol (Berl)* 95, 85-97 (1998).
32. Brooks, D.J., Ibanez, V., Sawle, G.V., Playford, E.D., Quinn, N., Mathias, C.J., Lees, A.J., Marsden, C.D., Bannister, R., and Frackowiak, R.S. Striatal D2 receptor status in patients with Parkinson's disease, striatonigral degeneration, and progressive supranuclear palsy, measured with 11C-raclopride and positron emission tomography. *Ann Neurol* 31, 184-92 (1992).
33. Brooks, D.J., Ibanez, V., Sawle, G.V., Quinn, N., Lees, A.J., Mathias, C.J., Bannister, R., Marsden, C.D., and Frackowiak, R.S. Differing patterns of striatal 18F-dopa uptake in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 28, 547-55 (1990).
34. Brown, V.J., and Dunnett, S.B. Comparison of adrenal and foetal nigral grafts on drug-induced rotation in rats with 6-OHDA lesions. *Exp Brain Res* 78, 214-8 (1989).
35. Brown, V.J., Schwarz, U., Bowman, E.M., Fuhr, P., Robinson, D.L., and Hallett, M. Dopamine dependent reaction time deficits in patients with Parkinson's disease are task specific. *Neuropsychologia* 31, 459-69 (1993).

36. Brundin, P., Nilsson, O.G., Gage, F.H., and Bjorklund, A. Cyclosporin A increases survival of cross-species intrastriatal grafts of embryonic dopamine-containing neurons. *Exp Brain Res* 60, 204-8 (1985).
37. Brundin, P., Nilsson, O.G., Strecker, R.E., Lindvall, O., Astedt, B., and Bjorklund, A. Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 65, 235-40 (1986).
38. Brundin, P., Strecker, R.E., Widner, H., Clarke, D.J., Nilsson, O.G., Astedt, B., Lindvall, O., and Bjorklund, A. 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, 192-208 (1988).
39. Brundin, P., Widner, H., Nilsson, O.G., Strecker, R.E., and Bjorklund, A. Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res* 75, 195-207 (1989).
40. Burn, D.J., Sawle, G.V., and Brooks, D.J. Differential diagnosis of Parkinson's disease, multiple system atrophy, and Steele-Richardson-Olszewski syndrome: discriminant analysis of striatal 18F-dopa PET data. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57, 278-84 (1994).
41. Burnstein, R.M., Foltynie, T., He, X., Menon, D.K., Svendsen, C.N., and Caldwell, M.A. Differentiation and migration of long term expanded human neural progenitors in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 702-13 (2004).
42. Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S., and Gould, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-44 (1993).
43. Camp, D.M., Loeffler, D.A., and LeWitt, P.A. L-DOPA does not enhance hydroxyl radical formation in the nigrostriatal dopamine system of rats with a unilateral 6-hydroxydopamine lesion. *J Neurochem* 74, 1229-40 (2000).
44. Cenci, M.A., Campbell, K., and Bjorklund, A. Neuropeptide messenger RNA expression in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat striatum reinnervated by fetal dopaminergic transplants: differential effects of the grafts on preproenkephalin, preprotachykinin and prodynorphin messenger RNA levels. *Neuroscience* 57, 275-96 (1993).
45. Chaudhuri, K.R., Hu, M.T., and Brooks, D.J. Atypical parkinsonism in Afro-Caribbean and Indian origin immigrants to the UK. *Mov Disord* 15, 18-23 (2000).
46. Chen, J.F., Moratalla, R., Impagnatiello, F., Grandy, D.K., Cuellar, B., Rubinstein, M., Beilstein, M.A., Hackett, E., Fink, J.S., Low, M.J., Ongini, E., and Schwarzschild, M.A. The role of the D(2) dopamine receptor (D(2)R) in A(2A) adenosine receptor (A(2A)R)-mediated behavioral and cellular responses as revealed by A(2A) and D(2) receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1970-5 (2001).
47. Clarke, D.J., Brundin, P., Strecker, R.E., Nilsson, O.G., Bjorklund, A., and Lindvall, O. Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: ultrastructural evidence for synapse formation using tyrosine hydroxylase immunocytochemistry. *Exp Brain Res* 73, 115-26 (1988).
48. Colosimo, C., Albanese, A., Hughes, A.J., de Bruin, V.M., and Lees, A.J. Some specific clinical features differentiate multiple system atrophy (striatonigral variety) from Parkinson's disease. *Arch Neurol* 52, 294-8 (1995).
49. Cooper, I.S., and Bravo, G. Chemopallidectomy and chemothalamectomy. *J Neurosurg* 15, 244-50 (1958).
50. Costanzo, R.M., and Graziadei, P.P. A quantitative analysis of changes in the olfactory epithelium following bulbectomy in hamster. *J Comp Neurol* 215, 370-81 (1983).
51. Damier, P., Hirsch, E.C., Zhang, P., Agid, Y., and Javoy-Agid, F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52, 1-6 (1993).
52. Datla, K.P., Blunt, S.B., and Dexter, D.T. 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, 424-34 (2001).
53. Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., and Kopin, I.J. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res* 1, 249-54 (1979).

54. Dawson, T.M., Dawson, V.L., Gage, F.H., Fisher, L.J., Hunt, M.A., and Wamsley, J.K. Functional recovery of supersensitive dopamine receptors after intrastriatal grafts of fetal substantia nigra. *Exp Neurol* *111*, 282-92 (1991).
55. de Lau, L.M., and Breteler, M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet neurology* *5*, 525-35 (2006).
56. Defer, G.L., Geny, C., Ricolfi, F., Fenelon, G., Monfort, J.C., Remy, P., Villafane, G., Jeny, R., Samson, Y., Keravel, Y., Gaston, A., Degos, J.D., Peschanski, M., Cesaro, P., and Nguyen, J.P. Long-term outcome of unilaterally transplanted parkinsonian patients. I. Clinical approach. *Brain* *119* (Pt 1), 41-50 (1996).
57. DGN/Kompetenznetz. Leitlinie Parkinson-Syndrome, <http://leitlinien.net> (Tag des Zugriffs: 13.1.2010).
58. Dixon, A.K., Gubitz, A.K., Sirinathsinghji, D.J., Richardson, P.J., and Freeman, T.C. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* *118*, 1461-8 (1996).
59. Dluzen, D.E., and J.L., M. Gender Differences in Neurotoxicity of the Nigrostriatal Dopaminergic System: Implications for Parkinson's Disease. *The Journal of Gender-Specific Medicine*, 36-42 (2000).
60. Dravid, A., Jatton, A.L., Enz, A., and Frei, P. Spontaneous recovery from motor asymmetry in adult rats with 6-hydroxydopamine-induced partial lesions of the substantia nigra. *Brain Res* *311*, 361-5 (1984).
61. Driver, J.A., Kurth, T., Buring, J.E., Gaziano, J.M., Logroscino, G. Parkinson disease and risk of mortality: a prospective comorbidity-matched cohort study. *Neurology* *70*, 1423-30 (2008).
62. Dunnett, S.B., Bjorklund, A., Schmidt, R.H., Stenevi, U., and Iversen, S.D. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. IV. Behavioural recovery in rats with unilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions in different forebrain sites. *Acta Physiol Scand Suppl* *522*, 29-37 (1983a).
63. Dunnett, S.B., Bjorklund, A., Schmidt, R.H., Stenevi, U., and Iversen, S.D. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. V. Behavioural recovery in rats with bilateral 6-OHDA lesions following implantation of nigral cell suspensions. *Acta Physiol Scand Suppl* *522*, 39-47 (1983b).
64. Dunnett, S.B., and Robbins, T.W. The functional role of mesotelencephalic dopamine systems. *Biological review of the Cambridge Philosophical Society* *67*, 491-518 (1992).
65. Dunnett, S.B., Whishaw, I.Q., Rogers, D.C., and Jones, G.H. Dopamine-rich grafts ameliorate whole body motor asymmetry and sensory neglect but not independent limb use in rats with 6-hydroxydopamine lesions. *Brain Res* *415*, 63-78 (1987).
66. Elizan, T.S., Hirano, A., Abrams, B.M., Need, R.L., Van Nuis, C., and Kurland, L.T. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam. Neurological reevaluation. *Arch Neurol* *14*, 356-68 (1966).
67. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* *4*, 1313-7 (1998).
68. Evarts, E.V., Teravainen, H., and Calne, D.B. Reaction time in Parkinson's disease. *Brain* *104*, 167-86 (1981).
69. Fearnley, J.M., and Lees, A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* *114* (Pt 5), 2283-301 (1991).
70. Fine, J., Duff, J., Chen, R., Chir, B., Hutchison, W., Lozano, A.M., and Lang, A.E. Long-term follow-up of unilateral pallidotomy in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* *342*, 1708-14 (2000).
71. Foley, P., and Riederer, P. Pathogenesis and preclinical course of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* *56*, 31-74 (1999).
72. Forno, L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I., and Langston, J.W. Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease. Neuropathologic considerations. *Adv Neurol* *60*, 600-8 (1993).

73. Franco, R., Ferre, S., Agnati, L., Torvinen, M., Gines, S., Hillion, J., Casado, V., Lledo, P., Zoli, M., Luis, C., and Fuxe, K. Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization. *Neuropsychopharmacology* 23, S50-9 (2000).
74. Fray, P.J., Dunnett, S.B., Iversen, S.D., Bjorklund, A., and Stenevi, U. Nigral transplants reinnervating the dopamine-depleted neostriatum can sustain intracranial self-stimulation. *Science* 219, 416-9 (1983).
75. Freed, C.R., Breeze, R.E., Rosenberg, N.L., Schneck, S.A., Wells, T.H., Barrett, J.N., Grafton, S.T., Huang, S.C., Eidelberg, D., and Rottenberg, D.A. Transplantation of human fetal dopamine cells for Parkinson's disease. Results at 1 year. *Arch Neurol* 47, 505-12 (1990).
76. Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai, W.Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D., and Fahn, S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344, 710-9 (2001).
77. Freed, C.R., Leehey, M.A., Zawada, M., Bjugstad, K., Thompson, L., and Breeze, R.E. Do patients with Parkinson's disease benefit from embryonic dopamine cell transplantation? *Journal of neurology* 250 Suppl 3, III44-6 (2003).
78. Freeman, T.B., Olanow, C.W., Hauser, R.A., Nauert, G.M., Smith, D.A., Borlongan, C.V., Sanberg, P.R., Holt, D.A., Kordower, J.H., and Vingerhoets, F.J. Bilateral fetal nigral transplantation into the postcommissural putamen in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 38, 379-88 (1995).
79. Freund, T.F., Bolam, J.P., Bjorklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B., Powell, J.F., and Smith, A.D. Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J Neurosci* 5, 603-16 (1985).
80. Gaenslen, A., Unmuth, B., Godau, J., Liepelt, I., Di Santo, A., Schweitzer, K.J., Gasser, T., Machulla, H.J., Reimold, M., Marek, K., and Berg, D. The specificity and sensitivity of transcranial ultrasound in the differential diagnosis of Parkinson's disease: a prospective blinded study. *Lancet neurology* 7, 417-24 (2008).
81. Gage, F.H., Bjorklund, A., Stenevi, U., and Dunnett, S.B. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. VIII. Survival and growth of implants of nigral and septal cell suspensions in intact brains of aged rats. *Acta Physiol Scand Suppl* 522, 67-75 (1983).
82. Gage, F.H., Coates, P.W., Palmer, T.D., Kuhn, H.G., Fisher, L.J., Suhonen, J.O., Peterson, D.A., Suhr, S.T., and Ray, J. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11879-83 (1995).
83. Gagnon, C., Bedard, P.J., Rioux, L., Gaudin, D., Martinoli, M.G., Pelletier, G., and Di Paolo, T. Regional changes of striatal dopamine receptors following denervation by 6-hydroxydopamine and fetal mesencephalic grafts in the rat. *Brain Res* 558, 251-63 (1991).
84. Garris, P.A., Walker, Q.D., and Wightman, R.M. Dopamine release and uptake rates both decrease in the partially denervated striatum in proportion to the loss of dopamine terminals. *Brain Res* 753, 225-34 (1997).
85. Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Jr., and Sibley, D.R. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429-32 (1990).
86. Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290, 985-9 (2000).
87. Gibb, W.R., Scaravilli, F., and Michund, J. Lewy bodies and subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 53, 710-1 (1990).
88. Glinka, Y., Gassen, M., and Youdim, M.B. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 50, 55-66 (1997).
89. Glinka, Y., Tipton, K.F., and Youdim, M.B. Mechanism of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-hydroxydopamine and its prevention by desferrioxamine. *Eur J Pharmacol* 351, 121-9 (1998).
90. Goldman, S.A., and Nottebohm, F. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2390-4 (1983).

91. Gorell, J.M., Rybicki, B.A., Cole Johnson, C., and Peterson, E.L. Occupational metal exposures and the risk of Parkinson's disease. *Neuroepidemiology* 18, 303-8 (1999).
92. Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A., and Fuchs, E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17, 2492-8 (1997).
93. Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, G., and Fuchs, E.. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3168-71 (1998).
94. Group, P.S. Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. *Jama* 287, 1653-61 (2002).
95. Group, T.D.-B.S.f.P.s.D.S. Deep-brain stimulation of the subthalamic nucleus or the pars interna of the globus pallidus in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 345, 956-63 (2001).
96. Guttman, M., and Seeman, P. L-dopa reverses the elevated density of D2 dopamine receptors in Parkinson's diseased striatum. *J Neural Transm* 64, 93-103 (1985).
97. Hallett, M., and Khoshbin, S. A physiological mechanism of bradykinesia. *Brain* 103, 301-14 (1980).
98. Hauser, R.A., Freeman, T.B., Snow, B.J., Nauert, M., Gauger, L., Kordower, J.H., and Olanow, C.W. Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol* 56, 179-87 (1999).
99. Hefti, F., Melamed, E., and Wurtman, R.J. Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* 195, 123-37 (1980).
100. Hely, M.A., Morris, J.G., Traficante, R., Reid, W.G., O'Sullivan, D.J., and Williamson, P.M. The sydney multicentre study of Parkinson's disease: progression and mortality at 10 years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 67, 300-7 (1999).
101. Henderson, J.M., Lu, Y., Wang, S., Cartwright, H., and Halliday, G.M. Olfactory deficits and sleep disturbances in Parkinson's disease: a case-control survey. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 956-8 (2003).
102. Herzog, J., Weiss, P.H., Assmus, A., Wefer, B., Seif, C., Braun, P.M., Pinsker, M.O., Herzog, H., Volkmann, J., Deuschl, G., and Fink, G.R. Improved sensory gating of urinary bladder afferents in Parkinson's disease following subthalamic stimulation. *Brain* 131, 132-45 (2008).
103. Hinds, J.W. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb. II. Cell proliferation and migration. *J Comp Neurol* 134, 305-22 (1968).
104. Hirsch, E.C., Hunot, S., Faucheux, B., Agid, Y., Mizuno, Y., Mochizuki, H., Tatton, W.G., Tatton, N., and Olanow, W.C. Dopaminergic neurons degenerate by apoptosis in Parkinson's disease. *Mov Disord* 14, 383-5 (1999).
105. Hirsch, E.C., Mouatt, A., Faucheux, B., Bonnet, A.M., Javoy-Agid, F., Graybiel, A.M., and Agid, Y. Dopamine, tremor, and Parkinson's disease. *Lancet* 340, 125-6 (1992).
106. Hoehn, M.M., and Yahr, M.D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17, 427-42 (1967).
107. Hudson, J.L., van Horne, C.G., Stromberg, I., Brock, S., Clayton, J., Masserano, J., Hoffer, B.J., and Gerhardt, G.A. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626, 167-74 (1993).
108. Hughes, A.J., Ben-Shlomo, Y., Daniel, S.E., and Lees, A.J. What features improve the accuracy of clinical diagnosis in Parkinson's disease: a clinicopathologic study. *Neurology* 42, 1142-6 (1992a).
109. Hughes, A.J., Daniel, S.E., Kilford, L., and Lees, A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55, 181-4 (1992b).
110. Hunot, S., and E.C., H. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 53, 49-58 (2003).

111. Ichitani, Y., Okamura, H., Matsumoto, Y., Nagatsu, I., and Iyata, Y. Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. *Brain Res* 549, 350-3 (1991).
112. Ichitani, Y., Okamura, H., Nakahara, D., Nagatsu, I., and Iyata, Y. Biochemical and immunocytochemical changes induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in the rat nigrostriatal dopamine neuron system: evidence for cell death in the substantia nigra. *Exp Neurol* 130, 269-78 (1994).
113. Izzo, P.N., and Bolam, J.P. Cholinergic synaptic input to different parts of spiny striatonigral neurons in the rat. *J Comp Neurol* 269, 219-34 (1988).
114. Jacques, D.B., Kopyov, O.V., Eagle, K.S., Carter, T., and Lieberman, A. Outcomes and complications of fetal tissue transplantation in Parkinson's disease. *Stereotactic and functional neurosurgery* 72, 219-24 (1999).
115. Jankovic, J., McDermott, M., Carter, J., Gauthier, S., Goetz, C., Golbe, L., Huber, S., Koller, W., Olanow, C., Shoulson, I. Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology* 40, 1529-34 (1990).
116. Jellinger, K., Linert, L., Kienzl, E., Herlinger, E., and Youdim, M.B. Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 46, 297-314 (1995).
117. Jenner, P., and Olanow, C.W. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44, S72-84 (1998).
118. Johnson, M.T., Kipnis, A.N., Lee, M.C., Loewenson, R.B., and Ebner, T.J. Modulation of the stretch reflex during volitional sinusoidal tracking in Parkinson's disease. *Brain* 114 ( Pt 1B), 443-60 (1991).
119. Joyce, J.N. Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine. III. Results in Parkinson's disease cases. *Brain Res* 600, 156-60 (1993).
120. Kalra, J., Rajput, A.H., Mantha, S.V., and Prasad, K. Serum antioxidant enzyme activity in Parkinson's disease. *Mol Cell Biochem* 110, 165-8 (1992).
121. Kennea, N.L., and Mehmet, H. Neural stem cells. *J Pathol* 197, 536-50 (2002).
122. Kirik, D., Rosenblad, C., and Bjorklund, A. 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, 259-77 (1998).
123. Kirschenbaum, B., Doetsch, F., Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. Adult subventricular zone neuronal precursors continue to proliferate and migrate in the absence of the olfactory bulb. *J Neurosci* 19, 2171-80 (1999).
124. Kish, S.J., Shannak, K., and Hornykiewicz, O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med* 318, 876-80 (1988).
125. Kishi, K., Peng, J.Y., Kakuta, S., Murakami, K., Kuroda, M., Yokota, S., Hayakawa, S., Kuge, T., and Asayama, T. Migration of bipolar subependymal cells, precursors of the granule cells of the rat olfactory bulb, with reference to the arrangement of the radial glial fibers. *Arch Histol Cytol* 53, 219-26 (1990).
126. Koller, W., Pahwa, R., Busenbark, K., Hubble, J., Wilkinson, S., Lang, A., Tuite, P., Sime, E., Lazano, A., Hauser, R., Malapira, T., Smith, D., Tarsy, D., Miyawaki, E., Norregaard, T., Kormos, T., and Olanow, C.W. High-frequency unilateral thalamic stimulation in the treatment of essential and parkinsonian tremor. *Ann Neurol* 42, 292-9 (1997).
127. Koller, W.C., Vetere-Overfield, B., and Barter, R. Tremors in early Parkinson's disease. *Clinical neuropharmacology* 12, 293-7 (1989).
128. Kordower, J.H., Emborg, M.E., Bloch, J., Ma, S.Y., Chu, Y., Leventhal, L., McBride, J., Chen, E.Y., Palfi, S., Roitberg, B.Z., Brown, W.D., Holden, J.E., Pyzalski, R., Taylor, M.D., Carvey, P., Ling, Z., Trono, D., Hantraye, P., Deglon, N., and Aebischer, P. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. *Science* 290, 767-73 (2000).

129. Kordower, J.H., Styren, S., Clarke, M., DeKosky, S.T., Olanow, C.W., and Freeman, T.B. Fetal grafting for Parkinson's disease: expression of immune markers in two patients with functional fetal nigral implants. *Cell Transplant* 6, 213-9 (1997).
130. Kornack, D.R., and Rakic, P. The generation, migration, and differentiation of olfactory neurons in the adult primate brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4752-7 (2001).
131. Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H., and Gage, F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027-33 (1996).
132. Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L.B., O'Brien, T.F., Kusakabe, M., and Steindler, D.A. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156, 333-44 (1999).
133. Kumar, R., Lozano, A.M., Kim, Y.J., Hutchison, W.D., Sime, E., Halket, E., and Lang, A.E. Double-blind evaluation of subthalamic nucleus deep brain stimulation in advanced Parkinson's disease. *Neurology* 51, 850-5 (1998).
134. Kuopio, A.M., Marttila, R.J., Helenius, H., and Rinne, U.K. Changing epidemiology of Parkinson's disease in southwestern Finland. *Neurology* 52, 302-8 (1999).
135. Kurokawa, M., Kirk, I.P., Kirkpatrick, K.A., Kase, H., and Richardson, P.J. Inhibition by KF17837 of adenosine A2A receptor-mediated modulation of striatal GABA and ACh release. *Br J Pharmacol* 113, 43-8 (1994).
136. Laitinen, L.V., Bergenheim, A.T., and Hariz, M.I. Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosurg* 76, 53-61 (1992).
137. Landwehrmeyer, B., and Palacios, J.M. Alterations of neurotransmitter receptors and neurotransmitter transporters in progressive supranuclear palsy. *J Neural Transm Suppl* 42, 229-46 (1994).
138. Lannuzel, A., Michel, P.P., Caparros-Lefebvre, D., Abaul, J., Hocquemiller, R., and Ruberg, M. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov Disord* 17, 84-90 (2002).
139. Lee, C.S., Schulzer, M., Mak, E.K., Snow, B.J., Tsui, J.K., Calne, S., Hammerstad, J., and Calne, D.B. Clinical observations on the rate of progression of idiopathic parkinsonism. *Brain* 117 ( Pt 3), 501-7 (1994).
140. Lee, M.S., Rinne, J.O., and Marsden, C.D. The pedunculo-pontine nucleus: its role in the genesis of movement disorders. *Yonsei medical journal* 41, 167-84 (2000).
141. Lee, R.G., and Tatton, W.G. Motor responses to sudden limb displacements in primates with specific CNS lesions and in human patients with motor system disorders. *The Canadian journal of neurological sciences* 2, 285-93 (1975).
142. Lee, T., Seeman, P., Rajput, A., Farley, I.J., and Hornykiewicz, O. Receptor basis for dopaminergic supersensitivity in Parkinson's disease. *Nature* 273, 59-61 (1978).
143. Leenders, K.L., Palmer, A.J., Quinn, N., Clark, J.C., Firnau, G., Garnett, E.S., Nahmias, C., Jones, T., and Marsden, C.D. Brain dopamine metabolism in patients with Parkinson's disease measured with positron emission tomography. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49, 853-60 (1986).
144. Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-95 (1990).
145. Lennox, G., Lowe, J., Morrell, K., Landon, M., and Mayer, R.J. Anti-ubiquitin immunocytochemistry is more sensitive than conventional techniques in the detection of diffuse Lewy body disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52, 67-71 (1989).
146. Lewis, D.A., and Sesack, D.R. Handbook of chemical neuroanatomy. The primate nervous system, part I., 263-75 (1997).
147. Li, S.J., Jiang, H.K., Stachowiak, M.S., Hudson, P.M., Owyang, V., Nanry, K., Tilson, H.A., and Hong, J.S. Influence of nigrostriatal dopaminergic tone on the biosynthesis of dynorphin and enkephalin in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 8, 219-25 (1990).

148. Limousin, P., Pollak, P., Benazzouz, A., Hoffmann, D., Le Bas, J.F., Broussolle, E., Perret, J.E., and Benabid, A.L. Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345, 91-5 (1995).
149. Lindvall, O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport* 8, iii-x (1997).
150. Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehncrona, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., Marsden, C.D., and et al. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247, 574-7 (1990).
151. Lindvall, O., Rehncrona, S., Brundin, P., Gustavii, B., Astedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Bjorklund, A., Leenders, K.L., Rothwell, J.C., and et al. Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol* 46, 615-31 (1989).
152. Lindvall, O., Sawle, G., Widner, H., Rothwell, J.C., Bjorklund, A., Brooks, D., Brundin, P., Frackowiak, R., Marsden, C.D., Odin, P., and et al. Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann Neurol* 35, 172-80 (1994).
153. Lindvall, O., Widner, H., Rehncrona, S., Brundin, P., Odin, P., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., and et al. Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol* 31, 155-65 (1992).
154. Litvan, I., Agid, Y., Jankovic, J., Goetz, C., Brandel, J.P., Lai, E.C., Wenning, G., D'Olhaberriague, L., Vevy, M., Chaudhuri, K.R., McKee, A., Jellinger, K., Bartko, J.J., Mangone, C.A., and Pearce, R.K. Accuracy of clinical criteria for the diagnosis of progressive supranuclear palsy (Steele-Richardson-Olszewski syndrome). *Neurology* 46, 922-30 (1996).
155. Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-8 (1994).
156. Louis, E.D., Tang, M.X., Cote, L., Alfaro, B., Mejia, H., and Marder, K. Progression of parkinsonian signs in Parkinson disease. *Arch Neurol* 56, 334-7 (1999).
157. Lundblad, M., Vaudano, E., and Cenci, M.A. Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem* 84, 1398-410 (2003).
158. Luskin, M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-89 (1993).
159. Ma, Y., Feigin, A., Dhawan, V., Fukuda, M., Shi, Q., Greene, P., Breeze, R., Fahn, S., Freed, C., and Eidelberg, D. Dyskinesia after fetal cell transplantation for parkinsonism: a PET study. *Ann Neurol* 52, 628-34 (2002).
160. Madhavan, L., Ourednik, V., and Ourednik, J. Neural stem/progenitor cells initiate the formation of cellular networks that provide neuroprotection by growth factor-modulated antioxidant expression. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26, 254-65 (2008).
161. Magerkurth, C., Schnitzer, R., and Braune, S. Symptoms of autonomic failure in Parkinson's disease: prevalence and impact on daily life. *Clin Auton Res* 15, 76-82 (2005).
162. Mann, V.M., Cooper, J.M., Krige, D., Daniel, S.E., Schapira, A.H., and Marsden, C.D. Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 115 (Pt 2), 333-42 (1992).
163. Marek, K.L., Seibyl, J.P., Zoghbi, S.S., Zea-Ponce, Y., Baldwin, R.M., Fussell, B., Charney, D.S., van Dyck, C., Hoffer, P.B., and Innis, R.P. [123I] beta-CIT/SPECT imaging demonstrates bilateral loss of dopamine transporters in hemi-Parkinson's disease. *Neurology* 46, 231-7 (1996).
164. Marttila, R.J., and Rinne, U.K. Disability and progression in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 56, 159-69 (1977).
165. McColl, C.D., Reardon, K.A., Shiff, M., and Kempster, P.A. Motor response to levodopa and the evolution of motor fluctuations in the first decade of treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord* 17, 1227-34 (2002).

166. McNaught, K.S., Shashidharan, P., Perl, D.P., Jenner, P., and Olanow, C.W. Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. *Eur J Neurosci* *16*, 2136-48 (2002).
167. McNaught, K.S., Belizaire, R., Isacson, O., Jenner, P., and Olanow, C.W. Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol* *179*, 38-46 (2003).
168. Mendez, I., Sadi, D., and Hong, M. Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *J Neurosci* *16*, 7216-27 (1996).
169. Mendez, I.M., Naus, C.C., Elisevich, K., and Flumerfelt, B.A. Normalization of striatal proenkephalin and preprotachykinin mRNA expression by fetal substantia nigra grafts. *Exp Neurol* *119*, 1-10 (1993).
170. Meyers, R. The modification of alternating tremors, rigidity and festination by surgery of the basal ganglia. *Archives Research Neurology and Mental Disorders Proc. Archives Research Neurology and Mental Disorders Proc* *21*, 602-55 (1942).
171. Mochizuki, H., Goto, K., Mori, H., and Mizuno, Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* *137*, 120-3 (1996).
172. Montoya, C.P., Campbell-Hope, L.J., Pemberton, K.D., and Dunnett, S.B. The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* *36*, 219-28 (1991).
173. Moon, Y., Lee, K.H., Park, J.H., Geum, D., and Kim, K. Mitochondrial membrane depolarization and the selective death of dopaminergic neurons by rotenone: protective effect of coenzyme Q10. *J Neurochem* *93*, 1199-208 (2005).
174. Morrish, P.K., Sawle, G.V., and Brooks, D.J. An [<sup>18</sup>F]dopa-PET and clinical study of the rate of progression in Parkinson's disease. *Brain* *119* ( Pt 2), 585-91 (1996).
175. Morshead, C.M., and van der Kooy, D. Postmitotic death is the fate of constitutively proliferating cells in the subependymal layer of the adult mouse brain. *J Neurosci* *12*, 249-56 (1992).
176. Mukhida, K., Baker, K.A., Sadi, D., and Mendez, I. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. *J Neurosci* *21*, 3521-30 (2001).
177. Murer, M.G., Dziewczapolski, G., Menalled, L.B., Garcia, M.C., Agid, Y., Gershanik, O., and Raisman-Vozari, R. Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions. *Ann Neurol* *43*, 561-75 (1998).
178. Newcomer, T.A., Rosenberg, P.A., and Aizenman, E. Iron-mediated oxidation of 3,4-dihydroxyphenylalanine to an excitotoxin. *J Neurochem* *64*, 1742-8 (1995a).
179. Newcomer, T.A., Rosenberg, P.A., and Aizenman, E. TOPA quinone, a kainate-like agonist and excitotoxin is generated by a catecholaminergic cell line. *J Neurosci* *15*, 3172-7 (1995b).
180. Nieoullon, A., Cheramy, A., and Glowinski, J. Interdependence of the nigrostriatal dopaminergic systems on the two sides of the brain in the cat. *Science* *198*, 416-8 (1977).
181. Nikkhah, G., Bentlage, C., Cunningham, M.G., and Bjorklund, A. Intranigral fetal dopamine grafts induce behavioral compensation in the rat Parkinson model. *J Neurosci* *14*, 3449-61 (1994a).
182. Nikkhah, G., Cunningham, M.G., Cenci, M.A., McKay, R.D., and Bjorklund, A. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. I. Evidence for anatomical reconstruction of the nigrostriatal pathway. *J Neurosci* *15*, 3548-61 (1995a).
183. Nikkhah, G., Cunningham, M.G., Jodicke, A., Knappe, U., and Bjorklund, A. Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspensions in the rat Parkinson model. *Brain Res* *633*, 133-43 (1994b).
184. Nikkhah, G., Cunningham, M.G., McKay, R., and Bjorklund, A. Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. II. Transplant-induced behavioral recovery. *J Neurosci* *15*, 3562-70 (1995b).
185. Nikkhah, G., Duan, W.M., Knappe, U., Jodicke, A., and Bjorklund, A. Restoration of complex sensorimotor behavior and skilled forelimb use by a modified nigral cell suspension transplantation approach in the rat Parkinson model. *Neuroscience* *56*, 33-43 (1993).

186. Nikkhah, G., Olsson, M., Eberhard, J., Bentlage, C., Cunningham, M.G., and Bjorklund, A. A microtransplantation approach for cell suspension grafting in the rat Parkinson model: a detailed account of the methodology. *Neuroscience* 63, 57-72 (1994c).
187. Nikkhah, G., Rosenthal, C., Falkenstein, G., and Samii, M. Dopaminergic graft-induced long-term recovery of complex sensorimotor behaviors in a rat model of Parkinson's disease. *Zentralbl Neurochir* 59, 97-103 (1998).
188. Nisenbaum, L.K., Crowley, W.R., and Kitai, S.T. Partial striatal dopamine depletion differentially affects striatal substance P and enkephalin messenger RNA expression. *Brain Res Mol Brain Res* 37, 209-16 (1996).
189. Nishino, H., Hida, H., Takei, N., Kumazaki, M., Nakajima, K., and Baba, H. Mesencephalic neural stem (progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than in intact striatum. *Exp Neurol* 164, 209-14 (2000).
190. Nonaka, H., Ichimura, M., Takeda, M., Nonaka, Y., Shimada, J., Suzuki, F., Yamaguchi, K., and Kase, H. KF17837 ((E)-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3-dipropyl-7-methylxanthine), a potent and selective adenosine A2 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 267, 335-41 (1994).
191. Nussbaum, R.L., and Ellis, C.E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N Engl J Med* 348, 1356-64 (2003).
192. Nyholm, D., Lennernas, H., Gomes-Trolin, C., and Aquilonius, S.M. Levodopa pharmacokinetics and motor performance during activities of daily living in patients with Parkinson's disease on individual drug combinations. *Clinical neuropharmacology* 25, 89-96 (2002).
193. Olanow, C.W., Kordower, J.H., and Freeman, T.B. Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 19, 102-9 (1996).
194. Olanow, C.W., and Tatton, W.G. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 22, 123-44 (1999).
195. Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., and Bjorklund, A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci* 15, 3863-75 (1995).
196. Ostefeld, T., Joly, E., Tai, Y.T., Peters, A., Caldwell, M., Jauniaux, E., and Svendsen, C.N. Regional specification of rodent and human neurospheres. *Brain Res Dev Brain Res* 134, 43-55 (2002).
197. Otsuka, M., Ichiya, Y., Hosokawa, S., Kuwabara, Y., Tahara, T., Fukumura, T., Kato, M., Masuda, K., and Goto, I. Striatal blood flow, glucose metabolism and 18F-dopa uptake: difference in Parkinson's disease and atypical parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54, 898-904 (1991).
198. Otsuka, M., Ichiya, Y., Kuwabara, Y., Hosokawa, S., Sasaki, M., Yoshida, T., Fukumura, T., Masuda, K., and Kato, M. Differences in the reduced 18F-Dopa uptakes of the caudate and the putamen in Parkinson's disease: correlations with the three main symptoms. *J Neurol Sci* 136, 169-73 (1996).
199. Ourednik, J., Ourednik, V., Lynch, W.P., Schachner, M., and Snyder, E.Y. Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. *Nature biotechnology* 20, 1103-10 (2002).
200. Ourednik, V., Ourednik, J., Xu, Y., Zhang, Y., Lynch, W.P., Snyder, E.Y., and Schachner, M. Cross-talk between stem cells and the dysfunctional brain is facilitated by manipulating the niche: evidence from an adhesion molecule. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27, 2846-56 (2009).
201. Pakkenberg, B., Moller, A., Gundersen, H.J., Mouritzen Dam, A., and Pakkenberg, H. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54, 30-3 (1991).
202. Palmer, T.D., Takahashi, J., and Gage, F.H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8, 389-404 (1997).
203. Palmer, T.D., Willhoite, A.R., and Gage, F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425, 479-94 (2000).
204. Parkinson, J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14, 223-36; discussion 2 (2002).

205. Parkinson Study Group (Holloway R, p.a. ). Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A randomized controlled trial. *Parkinson Study Group. Jama* 284, 1931-8 (2000).
206. Paulus, W., and Jellinger, K. The neuropathologic basis of different clinical subgroups of Parkinson's disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 50, 743-55 (1991).
207. Paxinos, G., and Watson, C. *The rat brain in stereotactic coordinates*. San Diego: Academic Press (1998).
208. Peschanski, M., Defer, G., N'Guyen, J.P., Ricolfi, F., Monfort, J.C., Remy, P., Geny, C., Samson, Y., Hantraye, P., and Jeny, R. Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain* 117 (Pt 3), 487-99 (1994).
209. Piccini, P., Morrish, P.K., Turjanski, N., Sawle, G.V., Burn, D.J., Weeks, R.A., Mark, M.H., Maraganore, D.M., Lees, A.J., and Brooks, D.J. Dopaminergic function in familial Parkinson's disease: a clinical and 18F-dopa positron emission tomography study. *Ann Neurol* 41, 222-9 (1997).
210. Piccini, P., Pavese, N., Hagell, P., Reimer, J., Bjorklund, A., Oertel, W.H., Quinn, N.P., Brooks, D.J., and Lindvall, O. Factors affecting the clinical outcome after neural transplantation in Parkinson's disease. *Brain* 128, 2977-86 (2005).
211. Plenz, D., and Kital, S.T. A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* 400, 677-82 (1999).
212. Poeck, K., and Hacke, W. *Neurologie*, 10. edn (Heidelberg, Germany, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 1998).
213. Ponsen, M.M., Stoffers, D., Booij, J., van Eck-Smit, B.L., Wolters, E., and Berendse, H.W. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56, 173-81 (2004).
214. Radja, F., el Mansari, M., Soghomonian, J.J., Dewar, K.M., Ferron, A., Reader, T.A., and Descarries, L. Changes of D1 and D2 receptors in adult rat neostriatum after neonatal dopamine denervation: quantitative data from ligand binding, in situ hybridization and iontophoresis. *Neuroscience* 57, 635-48 (1993).
215. Raghavan, R., Khin-Nu, C., Brown, A., Irving, D., Ince, P.G., Day, K., Tyrer, S.P., and Perry, R.H. Detection of Lewy bodies in Trisomy 21 (Down's syndrome). *The Canadian journal of neurological sciences* 20, 48-51 (1993).
216. Rajput, A.H., Offord, K.P., Beard, C.M., and Kurland, L.T. Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality. *Ann Neurol* 16, 278-82 (1984).
217. Rajput, A.H., Rozdilsky, B., and Rajput, A. Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. *The Canadian journal of neurological sciences* 18, 275-8 (1991).
218. Redmond, D.E., Jr., Vinuela, A., Kordower, J.H., and Isacson, O. Influence of cell preparation and target location on the behavioral recovery after striatal transplantation of fetal dopaminergic neurons in a primate model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 29, 103-16 (2008).
219. Riederer, P., and Wuketich, S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 38, 277-301 (1976).
220. Rioux, L., Gagnon, C., Gaudin, D.P., Di Paolo, T., and Bedard, P.J. A fetal nigral graft prevents behavioral supersensitivity associated with repeated injections of L-dopa in 6-OHDA rats. Correlation with D1 and D2 receptors. *Neuroscience* 56, 45-51 (1993).
221. Rioux, L., Gaudin, D.P., Bui, L.K., Gregoire, L., DiPaolo, T., and Bedard, P.J. Correlation of functional recovery after a 6-hydroxydopamine lesion with survival of grafted fetal neurons and release of dopamine in the striatum of the rat. *Neuroscience* 40, 123-31 (1991).
222. Robinson, T.E., Noordhoorn, M., Chan, E.M., Mocsary, Z., Camp, D.M., and Whishaw, I.Q. Relationship between asymmetries in striatal dopamine release and the direction of amphetamine-induced rotation during the first week following a unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra. *Synapse* 17, 16-25 (1994).
223. Rodriguez, M., Castellano, M.A., and Palarea, M.D. Interhemispheric regulation of dopaminergic ascending systems. *Life sciences* 47, 377-84 (1990).

224. Rodter, A., Winkler, C., Samii, M., and Nikkhah, G. Complex sensorimotor behavioral changes after terminal striatal 6-OHDA lesion and transplantation of dopaminergic embryonic micrografts. *Cell Transplant* 9, 197-214 (2000).
225. Rodter, A., Winkler, C., Samii, M., Walter, G.F., Brandis, A., and Nikkhah, G. Comparison of unilateral and bilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine-induced axon terminal lesions: evidence for interhemispheric functional coupling of the two nigrostriatal pathways. *J Comp Neurol* 432, 217-29 (2001).
226. Rothwell, J.C., Obeso, J.A., Traub, M.M., and Marsden, C.D. The behaviour of the long-latency stretch reflex in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 46, 35-44 (1983).
227. Rozov, I. Parkinson's disease – a unique survey launched (Genf, WHO 1998).
228. Saggi, H., Cooksey, J., Dexter, D., Wells, F.R., Lees, A., Jenner, P., and Marsden, C.D. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J Neurochem* 53, 692-7 (1989).
229. Sauer, H., and Oertel, W.H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59, 401-15 (1994).
230. Savasta, M., Mennicken, F., Chritin, M., Arous, D.N., Feuerstein, C., Le Moal, M., and Herman, J.P. Intrastriatal dopamine-rich implants reverse the changes in dopamine D2 receptor densities caused by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway in rats: an autoradiographic study. *Neuroscience* 46, 729-38 (1992).
231. Schapira, A.H. Causes of neuronal death in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86, 155-62 (2001).
232. Schierle, G.S., Hansson, O., Leist, M., Nicotera, P., Widner, H., and Brundin, P. Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med* 5, 97-100 (1999).
233. Schmidt, M.L., Murray, J., Lee, V.M., Hill, W.D., Wertkin, A., and Trojanowski, J.Q. Epitope map of neurofilament protein domains in cortical and peripheral nervous system Lewy bodies. *Am J Pathol* 139, 53-65 (1991).
234. Schmidt, R.H., Bjorklund, A., and Stenevi, U. Intracerebral grafting of dissociated CNS tissue suspensions: a new approach for neuronal transplantation to deep brain sites. *Brain Res* 218, 347-56 (1981).
235. Schmidt, R.H., Bjorklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B., and Gage, F.H. Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. III. Activity of intrastriatal nigral suspension implants as assessed by measurements of dopamine synthesis and metabolism. *Acta Physiol Scand Suppl* 522, 19-28 (1999).
236. Schrag, A., Kingsley, D., Phatouros, C., Mathias, C.J., Lees, A.J., Daniel, S.E., and Quinn, N.P. Clinical usefulness of magnetic resonance imaging in multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65, 65-71 (1998).
237. Schrag, A., Dodel, R., Spottke, A., Bornschein, B., Siebert, U., and Quinn, N.P. Rate of clinical progression in Parkinson's disease. A prospective study. *Mov Disord* 22, 938-45 (2007).
238. Schwab, R.S., Chafetz, M.E., and Walker, S. Control of two simultaneous voluntary motor acts in normals and in parkinsonism. *A M A* 72, 591-8 (1954).
239. Schwartz Levey, M., Chikaraishi, D.M., and Kauer, J.S. Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography. *J Neurosci* 11, 3556-64 (1991).
240. Schwarz, J., Linke, R., Kerner, M., Mozley, P.D., Trenkwalder, C., Gasser, T., and Tatsch, K. Striatal dopamine transporter binding assessed by [<sup>123</sup>I]IPT and single photon emission computed tomography in patients with early Parkinson's disease: implications for a preclinical diagnosis. *Arch Neurol* 57, 205-8 (2000).
241. Seibyl, J.P., Marek, K.L., Quinlan, D., Sheff, K., Zoghbi, S., Zea-Ponce, Y., Baldwin, R.M., Fussell, B., Smith, E.O., Charney, D.S., and et al. Decreased single-photon emission computed tomographic [<sup>123</sup>I]beta-CIT striatal uptake correlates with symptom severity in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 38, 589-98 (1995).

242. Shashidharan, P., Good, P.F., Hsu, A., Perl, D.P., Brin, M.F., and Olanow, C.W. TorsinA accumulation in Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease. *Brain Res* 877, 379-81 (2000).
243. Shindou, T., Mori, A., Kase, H., and Ichimura, M. Adenosine A(2A) receptor enhances GABA(A)-mediated IPSCs in the rat globus pallidus. *J Physiol* 532, 423-34 (2001).
244. Singer, C., Weiner, W.J., and Sanchez-Ramos, J.R. Autonomic dysfunction in men with Parkinson's disease. *European neurology* 32, 134-40 (1992).
245. Soghomonian, J.J. Effects of neonatal 6-hydroxydopamine injections on glutamate decarboxylase, preproenkephalin and dopamine D2 receptor mRNAs in the adult rat striatum. *Brain Res* 621, 249-59 (1993).
246. Soghomonian, J.J. Differential regulation of glutamate decarboxylase and preproenkephalin mRNA levels in the rat striatum. *Brain Res* 640, 146-54 (1994).
247. Soto-Otero, R., Mendez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Munoz-Patino, A.M., and Labandeira-Garcia, J.L. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem* 74, 1605-12 (2000).
248. Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6469-73 (1998).
249. Stefani, A., Lozano, A.M., Peppe, A., Stanzione, P., Galati, S., Tropepi, D., Pierantozzi, M., Brusa, L., Scarnati, E., and Mazzone, P. Bilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine and subthalamic nuclei in severe Parkinson's disease. *Brain* 130, 1596-607 (2007).
250. Stenevi, U., Bjorklund, A., and Svendgaard, N.A. Transplantation of central and peripheral monoamine neurons to the adult rat brain: techniques and conditions for survival. *Brain Res* 114, 1-20 (1976).
251. Strecker, R.E., Sharp, T., Brundin, P., Zetterstrom, T., Ungerstedt, U., and Bjorklund, A. Autoregulation of dopamine release and metabolism by intrastriatal nigral grafts as revealed by intracerebral dialysis. *Neuroscience* 22, 169-78 (1987).
252. Studer, L., Tabar, V., and McKay, R.D. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nature neuroscience* 1, 290-5 (1998).
253. Svendsen, C.N., Clarke, D.J., Rosser, A.E., and Dunnett, S.B. Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol* 137, 376-88 (1996).
254. Swerdlow, R.H., Parks, J.K., Miller, S.W., Tuttle, J.B., Trimmer, P.A., Sheehan, J.P., Bennett, J.P., Jr., Davis, R.E., and Parker, W.D., Jr. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 40, 663-71 (1996).
255. Takahashi, M., and Yamada, T. A possible role of influenza A virus infection for Parkinson's disease. *Adv Neurol* 86, 91-104 (2001).
256. Tanner, C.M., and Aston, D.A. Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. *Current Opinion in Neurology* 13, 427-30 (2000).
257. Tatton, W.G., Chalmers-Redman, R., Brown, D., and Tatton, N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 53 Suppl 3, S61-70; discussion S-2 (2003).
258. Tatton, W.G., and Lee, R.G. Evidence for abnormal long-loop reflexes in rigid Parkinsonian patients. *Brain Res* 100, 671-6 (1975).
259. Testa, C.M., Sherer, T.B., and Greenamyre, J.T. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res Mol Brain Res* 134, 109-18 (2005).
260. Tofaris, G.K., Razaq, A., Ghetti, B., Lilley, K.S., and Spillantini, M.G. Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *J Biol Chem* 278, 44405-11 (2003).
261. Ungerstedt, U., and Arbuthnott, G.W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res* 24, 485-93 (1970).

262. Vicario-Abejon, C., Cunningham, M.G., and McKay, R.D. Cerebellar precursors transplanted to the neonatal dentate gyrus express features characteristic of hippocampal neurons. *J Neurosci* **15**, 6351-63 (1995).
263. Vogels, O.J., Veltman, J., Oyen, W.J., and Horstink, M.W. Decreased striatal dopamine D2 receptor binding in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and multiple system atrophy (MSA): D2 receptor down-regulation versus striatal cell degeneration. *J Neurol Sci* **180**, 62-5 (2000).
264. Volkmann, J., Sturm, V., Weiss, P., Kappler, J., Voges, J., Koulousakis, A., Lehrke, R., Hefter, H., and Freund, H.J. Bilateral high-frequency stimulation of the internal globus pallidus in advanced Parkinson's disease. *Ann Neurol* **44**, 953-61 (1998).
265. Wakabayashi, K., Engelender, S., Yoshimoto, M., Tsuji, S., Ross, C.A., and Takahashi, H. Synphilin-1 is present in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **47**, 521-3 (2000).
266. Ward, C.D., and Gibb, W.R. Research diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Adv Neurol* **53**, 245-9 (1990).
267. Wenning, G.K., Odin, P., Morrish, P., Rehncrona, S., Widner, H., Brundin, P., Rothwell, J.C., Brown, R., Gustavii, B., Hagell, P., Jahanshahi, M., Sawle, G., Bjorklund, A., Brooks, D.J., Marsden, C.D., Quinn, N.P., and Lindvall, O. Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **42**, 95-107 (1997).
268. Victorin, K., Clarke, D.J., Bolam, J.P., and Bjorklund, A. Host Corticostriatal Fibres Establish Synaptic Connections with Grafted Striatal Neurons in the Ibotenic Acid Lesioned Striatum. *Eur J Neurosci* **1**, 189-95 (1989).
269. Victorin, K., Clarke, D.J., Bolam, J.P., and Bjorklund, A. Fetal striatal neurons grafted into the ibotenate lesioned adult striatum: efferent projections and synaptic contacts in the host globus pallidus. *Neuroscience* **37**, 301-15 (1990).
270. Widner, H., Tetrad, J., Rehncrona, S., Snow, B., Brundin, P., Gustavii, B., Bjorklund, A., Lindvall, O., and Langston, J.W. Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N Engl J Med* **327**, 1556-63 (1992).
271. Winkler, C., Sauer, H., Lee, C.S., and Bjorklund, A. Short-term GDNF treatment provides long-term rescue of lesioned nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* **16**, 7206-15 (1996).
272. Yang, M., Stull, N.D., Berk, M.A., Snyder, E.Y., and Iacovitti, L. Neural stem cells spontaneously express dopaminergic traits after transplantation into the intact or 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp Neurol* **177**, 50-60 (2002).

## Verzeichnis der Substanzen und Materialien

Artikel / Produkt	Firma	Sitz der Firma/Vertretung
<b>Ratten</b>	<b>Charles River Lab.</b>	<b>Sulzfeld</b>
Futter	Ssniff Spezialdiäten GmbH	Soest
<b>6-OHDA</b>	<b>Sigma</b>	<b>Deisenhofen</b>
Apomorphin	Sigma	Deisenhofen
<b>Amphetamin</b>	<b>Sigma</b>	<b>Deisenhofen</b>
Iod <sup>123</sup> / β-CIT	Amersham-Buchler	Braunschweig
<b>Rotameter / Software</b>	<b>TSE Systems</b>	<b>Bad Homburg</b>
Hamilton-Spritze	World Precision Instruments	Berlin
<b>Autoradiographieplatten</b>	<b>Sigma</b>	<b>Deisenhofen</b>
Glaskapillaren	Harvard Apparatus	March-Hugstetten
<b>BrdU</b>	<b>Invitrogen</b>	<b>Karlsruhe</b>
TH-Ak	Sigma	Deisenhofen
<b>SZ-Medien</b>	<b>Sigma</b>	<b>Deisenhofen</b>
Stereotaktischer Rahmen	TSE Systems	Bad Homburg

Danksagungen:

Ich möchte mich besonders für die Unterstützung von Herrn Professor Dr. med. V. Tronnier und Herrn Dr. med. M. Bonsanto bedanken. Deren Engagement und Interesse an der Neurotransplantation haben die Grundlage für diese Doktorarbeit geschaffen. Ich möchte mich dafür bedanken, daß ich in der Neurochirurgischen Klinik diese Dissertation anfertigen konnte.

Desweiteren gilt der Deutschen Parkinson Gesellschaft besonderer Dank, die über finanzielle Unterstützung dieses Projekt mit ermöglicht hat und in deren Verantwortung wir stehen. Ich hoffe, wir konnten mit diesem Projekt einen Teil dazu beitragen, neue Wege in der Therapie des Parkinson Syndroms aufzutun.

Ich möchte mich bei meinem Mitdoktoranden Sascha Dreher für seine Spontaneität, Zuverlässigkeit und Unterstützung bedanken. Ich hoffe, wir können weitere Projekte zusammen gestalten.

Besonderer Dank gilt dem molekularbiologischen Labor von Fr. PD Dr. rer. nat. Herold-Mende und Ihrem Team, das uns anhand der neuesten Methoden eindrucksvolle „Einblicke“ in die moderne Molekularbiologie gegeben hat.

Ich möchte mich zudem bei der neuropathologischen Abteilung, speziell bei Fr. Dr. Zoubaa und deren Team bedanken, die uns mit Geduld und Know how zur Seite gestanden hat.

Zusätzlicher Dank sei an die nuklearmedizinische Abteilung des DKFZ gerichtet, die uns mit Konzentration und Geduld in die Kunst der Anfertigung von Hirnschnittpräparaten eingeführt hat.

## Curriculum vitae

### **Persönliche Daten**

---

Name, Vorname: Backhus, Olaf  
Geburtsdatum: 15.04.1977  
Geburtsort: Hannover  
Adresse: Reetwerder 21  
21029 Hamburg  
040-42905549  
obackhus@gmx.net  
Familienstand: verheiratet  
Kinder: Leon Backhus (15.05.2005)  
Tonio Backhus (26.06.2008)  
Karlotta Backhus (25.1.2011)  
Konfession: evangelisch

### **Schulbildung**

---

08.1983 – 07.1987 Grundschule Isernhagen  
08.1987 – 07.1989 Orientierungsstufe Großburgwedel  
08.1989 – 05.1996 Gymnasium Großburgwedel  
Abschluß: Abitur, Note 3,1

### **Zivildienst**

---

08.1996 – 08.1997 Pestalozzi-Stiftung Großburgwedel (Betreuung von Schwerbehinderten in einer Behindertenwerkstatt)

### **Ausbildung**

---

10.1997 – 09.2000 Städtisches Klinikum Hannover  
Abschluß: Krankenpfleger, Note 2

### **Studium**

---

10.2000 – 8.2002 Medizinische Hochschule Hannover  
10.2002 – 11.2007 Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Abschluß: Staatsexamen, Note 2

### **Famulaturen**

---

10.2004 Neurochirurgische Uni-Klinik Heidelberg  
07.2005 Diagnostische und Interventionelle Radiologie Uni-Klinik Hamburg-Eppendorf  
02.2006 Internistische Allgemeinstation und Chest-Pain Unit Uni-Klinik Heidelberg  
03.2006 Allgemeininternistische Praxis Dr. B. Pritzel Hannover

### **Praktisches Jahr**

---

10.2006 – 02.2007 Innere Medizin, Krankenhaus Salem Heidelberg  
02.2007 – 05.2007 Chirurgie/Traumatologie Groote-Schuur-Hospital Kapstadt/Südafrika  
05.2007 – 07.2007 Neurologie, Kurpfalz-Krankenhaus Heidelberg

### **Prüfungsfächer (Mündlich)**

---

09.2006 2. Staatsexamen: Gynäkologie, Neurologie  
3. Staatsexamen: Innere Medizin, Chirurgie, Neurologie, Neurochirurgie

## Beruflicher Werdegang

---

02.2008 – auf weiteres  
Krankenhaus Reinbek -St. Adolf Stift-  
Assistenzarzt in Weiterbildung  
Medizinische Klinik, Chefarzt Prof. Dr. med. S. Jäckle

## Veröffentlichungen

---

03.2005  
4. Deutscher Parkinson Kongress/ Frankfurt am Main (3.-5.3. 2005)  
Postervorstellung I: Backhus O., Dreher S., Bonsanto M.M., Zoubaa S.,  
Habel A., Dictus C., Herold-Mende C., Tronnier V.M. „Anwendung von  
*Verhaltenstest zur Evaluation von Transplantationen adulter neuronaler  
Vorläuferzellen im Parkinson-Modell der Ratte*“  
Popstervorstellung II: Dreher S., Backhus O., Henze M., Zoubaa S., Habel  
A., Dictus C., Herold-Mende C. und Tronnier V.M. „*Autoradiographische  
Befunde (<sup>125</sup>I-FP-CIT) nach Transplantation adulter neuronaler  
Vorläuferzellen im Parkinson-Modell der Ratte*“

## Fachspezifische Tätigkeiten/Zusatzqualifikationen

---

04.2003  
04.2003  
03.2005  
10.2005 – 11.2007  
05.2007  
Kursus „Versuchstierkunde und tierexperimentelle Methoden“  
Teilnahme International Meeting of the Stem Cell Network NRW  
Teilnahme und Postervorstellung auf dem Deutschen Parkinson Kongreß  
Frankfurt/Main  
Nachtwachen neurologische und internistische Allgemeinstation Kurpfalz-  
Krankenhaus Heidelberg  
Kursus „Advanced Trauma Life Support“ am Tygerberg Hospital  
Kapstadt/Südafrika

**Sprachkenntnisse:** Englisch (in Wort und Schrift), Latein (Großes Latinum)

**EDV-Kenntnisse:** Grundlagen für Microsoft Windows und Apple Macintosh  
11.2006 10-Finger-Schreibkurs VHS Heidelberg

**Interessen/ Aktivitäten:** Fahrradfahren, Literatur, Schwimmen, Kochen

