

Aus der Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Bedeutung der Mikroglia bei der Transplantation von GDNF-  
exprimierenden Stammzellen im Parkinsonmodell der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Maidhof

aus Berlin

Datum der Promotion: 03.12.2021

## Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis .....	III
II.	Abbildungsverzeichnis .....	VI
III.	Tabellenverzeichnis .....	VII
1.	Abstract (Deutsch).....	1
2.	Abstract (English).....	2
3.	Einleitung .....	4
3.1.	Parkinson-Syndrome .....	4
3.2.	Zellbasierte Therapieansätze beim Parkinson-Syndrom .....	8
3.3.	GDNF .....	10
3.4.	6-OHDA .....	13
3.5.	Immunreaktion beim Parkinson-Syndrom.....	14
3.6.	Mikroglia .....	16
4.	Zielsetzung der Arbeit .....	22
5.	Materialien und Methoden .....	24
5.1.	Materialien:.....	24
5.2.	Methoden .....	30
5.2.1.	Zellkultur .....	30
5.2.2.	In vivo Experimente .....	33
5.2.3.	Histologie .....	35
5.2.4.	Statistische Analyse.....	37
5.2.5.	Literaturrecherche .....	37
6.	Ergebnisse .....	38
6.1.	Verteilung der Mikroglia .....	38
7.	Diskussion .....	46
7.1.	Mikrogliaantwort .....	46
7.2.	GDNF-Wirkung auf Mikroglia.....	48
7.3.	Targeting Neuroinflammation .....	57
7.4.	Limitationen der Studie .....	59
7.5.	Fazit .....	63
8.	Literaturverzeichnis .....	65
9.	Eidesstattliche Versicherung .....	81
10.	Lebenslauf .....	82
11.	Danksagung .....	83

## I. Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
ABC	Avidin biotin complex
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
ASC	adipose tissue-derived mesenchymal stem cells
A $\beta$	$\beta$ -Amyloid
bGH	bovine growth hormone
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BHV-1	Bovines Herpes Virus 1
BM-MSC	bone marrow derived mesenchymal stem cell
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA FV	bovine serum albumine fraction V
BVD-MD	bovine Virusdiarrhoe/ Mucosal Disease
CD	cluster of differentiation
CE	coefficient of error
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CMV	Cytomegalovirus
COX2	Cyclooxygenase 2
CPS	Cryoprotectant solution
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAMPS	danger-associated molecular patterns
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EF-1 $\alpha$	elongation factor 1-alpha 1
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
Fc $\gamma$	fragment crystallizable $\gamma$
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDNF	glial cell-derived neurotrophic factor
GDNF-ASC	transfected adipose tissue-derived mesenchymal stem cells
GFR $\alpha$ 1	GDNF family receptor alpha-1
GLP1	glucagon-like peptide-1
GLP1R	glucagon-like peptide-1 receptor
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
GvHD	graft-versus-host disease
HLA	human leucocyte antigen
HMGB1	high mobility group protein 1
i.p.	intraperitoneal

Iba1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IgG	Immunglobulin Typ G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
iPSC	induced pluripotent stem cells
JAK	Januskinase
KGaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KGW	Körpergewicht
L-DOPA	Levodopa
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
miRNA	micro ribonucleic acid
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSC	mesenchymal stem cells
nASC	naive adipose tissue-derived mesenchymal stem cells
NCAM	neural cell adhesion molecule
NF- $\kappa$ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	non steroid anti-inflammatory drug
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphat buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PI3	Parainfluenza Virus 3
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PRR	pattern recognition receptor
qPCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
REM	rapid eye movement
RET	rearranged during transfection
ROS	reactive oxygen species
s.c.	subkutan
SB100X	sleeping beauty transposase 100X
SHH	sonic hedgehog
SNC	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
SOD	Superoxiddismutase
Src	sarcoma tyrosine kinase
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
STN	Nucleus subthalamicus
SV40	simian vacuolating virus 40

TGF- $\beta$  .....transforming growth factor  $\beta$   
TLR ..... toll-like receptor  
TNF- $\alpha$  ..... Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$   
TREM2 ..... triggering receptor expressed on myeloid cells 2  
VL ..... Nucleus ventralis lateralis  
 $\alpha$ -syn .....  $\alpha$ -Synuclein

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologisches Modell der Basalganglien beim Parkinson-Syndrom ...	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion von GDNF .....	11
Abbildung 3: Krankheitsmodell und Wirkprinzip der Transplantation.....	14
Abbildung 4: Mikrogliaaktivierung beim Parkinson-Syndrom .....	19
Abbildung 5: Beispielbild eines 4-Tagestieres der NaCl + NaCl Gruppe. ....	38
Abbildung 6: Relative Anzahl der Mikroglia im Striatum 4 Tage postoperativ .....	39
Abbildung 7: Mikroglia im Striatum 4 Tage postoperativ .....	40
Abbildung 8: Morphologie der Mikroglia im Striatum 4 Tage postoperativ .....	41
Abbildung 9: Relative Anzahl der Mikroglia im Striatum 4 Wochen postoperativ .....	42
Abbildung 10: Relative Anzahl der Mikroglia im Striatum 6 Monate postoperativ .....	43
Abbildung 11: ipsilaterales Striatum 6 Monate postoperativ .....	44
Abbildung 12: DAB/ DAPI-Kofärbung 4-Tagestieres der GDNF-ASC-Gruppe.....	61

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Geräte</b> .....	24
<b>Tabelle 2: Software</b> .....	25
<b>Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien</b> .....	25
<b>Tabelle 4: Chemikalien/Medikamente/Kits</b> .....	26
<b>Tabelle 5: Lösungen/Puffer</b> .....	29
<b>Tabelle 6: Antikörper</b> .....	30
<b>Tabelle 7: Einteilung der Gruppen nach Injektion</b> .....	34
<b>Tabelle 8: Überblick über Studien zur Wirkung von GDNF auf Mikroglia</b> .....	49

## 1. Abstract (Deutsch)

*Einleitung:* Das Parkinson-Syndrom ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen und es wird geschätzt, dass sich die Anzahl der Patientinnen und Patienten in den nächsten 20 Jahren weltweit verdoppeln wird. Bisherige Therapien fokussieren sich vor allem auf die Linderung der auftretenden Symptome. Die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe (ASC), ebenso wie der Botenstoff *glial cell-derived neurotrophic factor* GDNF, haben im Tiermodell bereits vielversprechende Ergebnisse gezeigt. Die Kombination dieser beiden Therapieansätze könnte ein neues Konzept für die Regeneration dopaminerger Neurone darstellen, deren Schädigung bei der Entstehung des Parkinson-Syndroms eine wesentliche Rolle spielt. Der Einfluss von vermehrt GDNF sekretierenden ASC auf das Immunsystem sowie insbesondere die Mikroglia ist bislang kaum erforscht und soll in dieser Arbeit am 6-OHDA (6-Hydroxydopamin) Modell der Ratte untersucht werden.

*Methoden:* Männliche Wistar Ratten erhielten eine einseitige intrastriatale Injektion von 6-OHDA und eine gleichzeitige Transplantation von naiven ASC oder ASC, die GDNF vermehrt exprimieren (GDNF-ASC). Als Kontrollgruppen dienten Tiere, die eine Injektion mit 6-OHDA, jedoch nur eine Vektortransplantation erhielten und Tiere, die eine Scheinläsion und eine Vektortransplantation erhielten. Die Population der Mikroglia im Striatum wurde nach 4 Tagen, 4 Wochen und 6 Monaten mittels Iba1-DAB (*ionized calcium-binding adapter molecule 1-3,3'-Diaminobenzidin*) Färbung ermittelt und mit der naiven Hemisphäre verglichen.

*Ergebnisse:* Die Mikrogliapopulation nahm in allen Gruppen mit der Zeit ab. Die Tiere, die GDNF exprimierende Zellen erhielten hatten zu allen Zeitpunkten die höchste Mikrogliapopulation. Der Unterschied zu den Tieren, die naive Stammzellen erhielten war nach 4 Tagen und 6 Monaten signifikant, nicht jedoch nach 4 Wochen. Zusätzlich zu der Anzahl der Mikroglia waren auch vermehrt aktivierte Mikroglia bei den Transplantationstieren und insbesondere bei den GDNF-ASC-Tieren nachweisbar.

*Schlussfolgerung:* Die Transplantation von ASC führte zu einer anhaltenden Inflamationsreaktion im Striatum, die jedoch kontinuierlich abnahm. Dieser Effekt wurde durch die Sekretion von GDNF durch die transplantierten Zellen noch verstärkt. Auch wenn die Rekrutierung von Mikroglia nach sechs Monaten nur geringfügig erhöht war, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass GDNF über die Modulation von Mikroglia anhaltende inflammatorische und somit potenziell schädliche Effekte haben kann. Dies könnte über die unterschiedliche Aktivierung des ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) und des PI3K/AKT (Phosphatidylinositol-3-kinase/ Proteinkinase B) Signalweges bedingt sein. Weitere

Forschung zur besseren Differenzierung der funktionellen Eigenschaften in vivo der hier rekrutierten Mikroglia ist daher nötig, um die von ihnen hervorgerufenen Effekte näher zu untersuchen und ihre potenziellen therapeutischen oder schädigenden Einflüsse zu verstehen.

## **2. Abstract (English)**

*Objective:* Parkinson's Disease is one of the most common neurodegenerative disorders and it is estimated that the number of worldwide patients will be doubling in the upcoming years. Nonetheless, there is a lack of disease modulating therapies. The transplantation of fat tissue derived mesenchymal stem cells (ASC) as well as the glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) have shown promising results in animal studies. The combination of these two strategies might provide a new concept to target the regeneration of dopaminergic neurons. However, the influence of these gene modified stem cells on the immune system and specifically on the microglia population has not been investigated before and will be addressed in this study with a 6-OHDA dopamine depletion model.

*Methods:* Male Wistar rats received a unilateral intrastriatal injection of 6-OHDA and transplantation of naïve ASC or ASC overexpressing GDNF. Animals receiving either 6-OHDA injection and sham transplantation or sham lesion served as control animals. The microglia population was identified through Iba1-DAB staining of the caudoputamen at 4 days, 4 weeks or 6 months post lesion.

*Results:* The microglia population declined in all groups over time. The animals receiving GDNF overexpressing ASC had the highest number of microglia at each timepoint. The difference to the animals receiving naïve ASC was significant after 4 days and 6 months, but not after 4 weeks. In addition to the higher number of microglia there were also more activated microglia, characterized by a rounded cell soma with shorter and fewer dendrites, present at the transplantation site in both the transplantation groups. This was even more predominant in the GDNF overexpressing group.

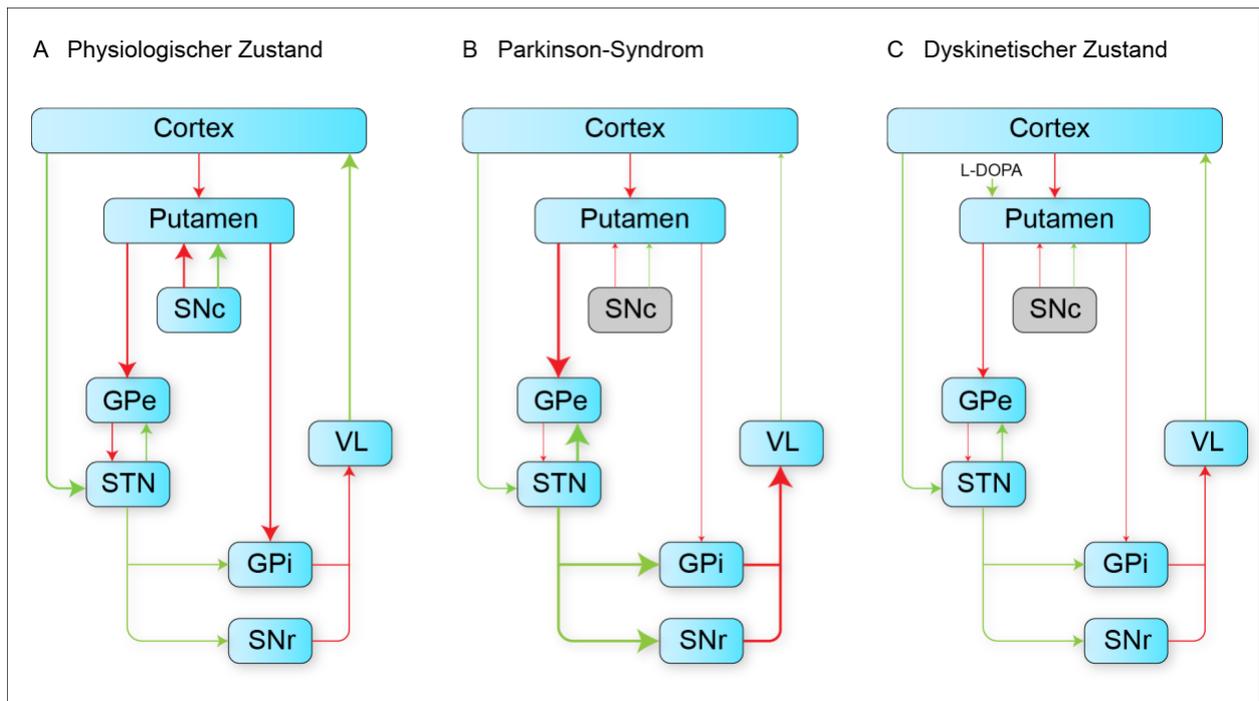
*Conclusion:* This study showed an ongoing inflammatory reaction in the caudoputamen after the transplantation of ASC. An effect that was amplified by the secretion of GDNF of the transplanted cells. Even though the recruitment of microglia in the long-term was only raised marginally these results show that GDNF might have potential deleterious effects through the modulation of the striatal microglia response. This might be due to differential activation of the ERK1/2- and the PI3K/AKT-signalling pathways. However, further research is needed to better define the

functional properties of the recruited microglia *in vivo* and to better understand their potential therapeutic or damaging effects in this regenerative approach.

### 3. Einleitung

#### 3.1. Parkinson-Syndrome

Neurologische Erkrankungen sind der häufigste Grund für eine Behinderung weltweit (1). Unter den neurodegenerativen Erkrankungen ist das Parkinson-Syndrom nach dem Morbus Alzheimer die zweithäufigste Erkrankung bei über 65-Jährigen (1). Unterschieden werden das idiopathische Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson), als häufigste Erscheinungsform, von den atypischen Parkinson-Syndromen, bei denen die Patientinnen und Patienten zusätzlich zu den charakteristischen Parkinsonsymptomen weitere Symptome aufweisen. Des Weiteren unterscheidet man genetische und sekundäre Parkinson-Syndrome, die beispielsweise toxisch- oder ischämisch-induziert zu einem ähnlichen klinischen Bild führen können wie das idiopathische Parkinson-Syndrom. Das Kardinalsymptom der Parkinson-Syndrome ist die Brady- oder Akinese. Als weitere Symptome können dann in unterschiedlicher Ausprägung Rigor, Tremor und posturale Instabilität auftreten, die das klinische Bild auch dominieren können. Fakultativ ist das Vorhandensein nicht-motorischer Begleitsymptome möglich. Diese beinhalten sensorische (Dysästhesien, Schmerzen, Hyposmie) und vegetative Symptome (Dysregulation von Blutdruck, Blasen- und Darmtätigkeit, sexuelle Dysfunktion, REM (*rapid eye movement*)-Schlafverhaltensstörung) sowie psychische (Depression, Affektlabilität, Angststörung) und kognitive Beeinträchtigungen (Demenz) (2, 3). Die Prävalenz des Parkinson-Syndroms liegt bei ca. 251- 571/ 100.000 Einwohner mit einer Zunahme im höheren Alter (4). Damit ist das Parkinson-Syndrom die einzige neurologische Erkrankung, deren altersstandardisierte Werte für Prävalenz, Tod und *disability-adjusted life years* seit 1990 deutlich zugenommen haben (1). Aufgrund zukünftig weiter steigender Lebenserwartung und damit einhergehend einem Wandel der Altersverteilung wird sich nach Schätzungen die Anzahl der Erkrankten in den nächsten zwei Jahrzehnten weltweit mehr als verdoppeln (5, 6). Obwohl das Parkinson-Syndrom bereits 1817 das erste Mal von James Parkinson, damals noch als Schüttellähmung, beschrieben wurde (7), ist die Ätiologie des idiopathischen Parkinson-Syndroms bisher noch immer nicht hinreichend geklärt. Funktionell steht die neuronale Dysregulation aufgrund eines Untergangs bestimmter Zellpopulationen im Mittelpunkt. Der zunehmende Verfall der dopaminergen Neurone insbesondere in den Basalganglien bzw. der Substantia nigra pars compacta ist dabei für die definierenden motorischen Symptome verantwortlich (2, 8). Unter physiologischen Umständen üben die dopaminergen Neurone einen regulatorischen Einfluss auf die Neurone des Putamens aus. Diese führen über die Aktivierung des direkten Signalwegs zu einer reduzierten Aktivität des Globus pallidus internus und der Substantia nigra pars reticulata und damit zu einer Enthemmung



**Abbildung 1: Pathophysiologisches Modell der Basalganglien beim Parkinson-Syndrom**

(A) Der motorische Cortex projiziert mit glutamatergen Neuronen auf das Putamen. Dieses erhält zudem Input von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta. Auf diese Weise wird der monosynaptische direkte Signalweg aktiviert, der über GABAerge Neurone den Globus pallidus internus und die Substantia nigra pars reticulata hemmt. Es kommt nachfolgend zu einer erleichterten Bewegungsausführung. Zudem üben dopaminerge Neurone der Substantia nigra pars compacta einen hemmenden Einfluss auf den indirekten Signalweg aus. Dementsprechend gibt es eine verringerte Hemmung des Globus pallidus externus, der wiederum den subthalamischen Nucleus hemmt. Entsprechend kommt es zu keiner Aktivierung des Globus pallidus internus und der Substantia nigra pars reticulata. (B) Durch die zunehmende Degeneration der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra pars compacta kommt es zu einer reduzierten Aktivierung des direkten Signalweges und zu einer reduzierten Hemmung des indirekten Signalweges. Dies führt beides zu einer gesteigerten Aktivität des Globus pallidus internus und der Substantia nigra pars reticulata mit nachfolgender Hemmung des ventrolateralen Nucleus und der resultierenden Bewegungsausführung. Klinisch beeindruckt eine Brady- oder sogar Akinesie. (C) Durch exogen zugeführtes L-DOPA, Dopaminagonisten oder andere Pharmakotherapien kommt es zu einer Hyperaktivität des direkten und einer Hypoaktivität des indirekten Signalweges mit resultierender enthemmter Bewegungsausführung. Grüne Pfeile stellen aktivierende Verbindungen, rote Pfeile hemmende Verbindungen dar. GABA=  $\gamma$ -Aminobuttersäure GPe= Globus pallidus externus, GPi= Globus pallidus internus, L-DOPA= Levodopa, STN= Nucleus subthalamicus, SNc= Substantia nigra pars compacta, SNr= Substantia nigra pars reticulata, VL= Nucleus ventralis lateralis. Abbildung nach Rodriguez- Oroz et al.

(2)

der Bewegungsausführung. Die Blockade des indirekten Signalwegs über den Globus pallidus externus führt zudem zu einer Hemmung des nachgeschalteten Nucleus subthalamicus, der wiederum ebenfalls auf den Globus pallidus internus und die Substantia nigra pars reticulata projiziert (2). Durch die Degeneration der dopaminergen Neurone entfällt der hemmende Einfluss auf den Globus pallidus internus und die Substantia nigra pars reticulata und es kommt zu einer verstärkten Hemmung der Bewegungsausführung (2) (siehe Abbildung 1). Begleitend zum Untergang der Neurone kommt es zur intrazytoplasmatischen Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein ( $\alpha$ -syn) und zur Ausbildung von sogenannten Lewy-Körperchen. Aktuell werden verschiedene Theorien bezüglich der Entstehung und der Bedeutung dieser histopathologischen Merkmale diskutiert. Eine Hypothese geht davon aus, dass es sich beim Parkinson-Syndrom um eine prionenähnliche Erkrankung handelt (9). Braak et al. beschrieben 2003 sechs Stadien des Parkinson-Syndroms, die gekennzeichnet sind durch die fortschreitende Ausbreitung von Lewy-Körperchen in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns (10). Mit zunehmender Erkrankungsdauer kommt es demnach zur sequenziellen Ausbreitung der Lewy-Körperchen beginnend in den dorsalen motorischen Nuklei der Hirnnerven IX und X oder im anterioren olfaktorischen Nucleus und nachfolgender Ausbreitung über die Substantia nigra und den Meso- bis in den Neocortex (10). Zwar ist es nicht möglich die longitudinale Ausbreitung am Menschen nachzuverfolgen, gestützt wird diese Theorie jedoch durch die Beobachtung, dass  $\alpha$ -syn von Neuronen nach extrazellulär abgegeben und von anderen Neuronen aufgenommen werden kann (11). Über axonalen Transport innerhalb der Zellen kann es sich so im Gehirn ausbreiten und auf andere Populationen von Neuronen übertragen werden (12-14).  $\alpha$ -syn kann dabei unterschiedlich geformte Oligomere und Fibrillen bilden, die in den Empfänger-Neuronen als Vorlage für die Produktion weiterer gleich geformter  $\alpha$ -syn Oligomere dienen (11, 15). Es wird vermutet, dass unterschiedlich geformte  $\alpha$ -syn Monomere dabei für die individuelle Ausbreitung und klinische Symptomatik bei Parkinsonpatientinnen und -patienten verantwortlich sind (16).

Jedoch gibt es auch einige widersprüchliche Aspekte dieser Prionenhypothese (17). So ist nur bei ungefähr der Hälfte der Parkinsonpatientinnen und -patienten eine Verteilung der Lewy-Körperchen nachweisbar, die kongruent ist mit den von Braak et. al beschriebenen Stadien (18). Des Weiteren ist die Bildung von Lewy-Körperchen auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen zu beobachten und sogar bei asymptomatischen Patientinnen und Patienten zu finden (19) und die Ausbreitung korreliert nicht zwangsläufig mit dem neuronalen Verlust (17, 20). Wenn es sich beim Parkinson-Syndrom um eine Prionenerkrankung handelt, sollte sich die Ausbreitung der Lewy-Körperchen zudem entweder entsprechend der synaptischen Verbindungen im Gehirn oder in lokaler Nachbarschaft der betroffenen Strukturen ausbreiten. Dies scheint

jedoch zumindest im Mausmodell nicht zuzutreffen und eine zusätzliche Vulnerabilität der Nervenzellen gegenüber der Formierung von Lewy-Körperchen und der Neurodegeneration zusätzlich zur synaptischen Verbindung oder lokalen Nachbarschaft ist daher anzunehmen (17). Oxidativer Stress durch den Dopaminstoffwechsel, mitochondriale Dysregulation und Neuroinflammation werden daher als wichtige Aspekte für den fortschreitenden Zelltod diskutiert (21). Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch L-Typ Kanäle während der autonomen Schrittmacherdepolarisation der dopaminergen Neurone könnte diese anfälliger für oxidativen Stress machen als andere Neurone (22). Dopaminerge Neurone sind zusätzlich in besonderem Maße durch Redoxpotenziale gefährdet, da Dopaminmetabolite zelltoxisch wirken können (23) und das für die Synthese von Dopamin benötigte Eisen (24) ebenfalls ein hohes Redoxpotenzial besitzt. Zudem können Dopamin, Eisen und Sauerstoff miteinander reagieren und das Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) bilden (25), das auf katecholaminproduzierende Zellen toxisch wirkt (siehe 3.4). Demnach könnte der zunehmende Verfall der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra und anderen klassischerweise degenerierenden Regionen, wie dem Locus caeruleus, auf die Ausbreitung der Lewy-Körperchen, verbunden mit einer erhöhten Vulnerabilität dieser Neuronenpopulationen zurückzuführen sein (17). Neuere Hypothesen postulieren daher die Betrachtung des Parkinson-Syndroms anhand von Triggern, unterstützenden und aggravierenden Faktoren, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erkrankung zum Tragen kommen (26). Es wird dabei von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen, bei der verschiedene Faktoren für die Entstehung prädisponieren und an vulnerablen Zeitpunkten das Fortschreiten der Erkrankung beschleunigen (26).

Ogleich der enormen epidemiologische Bedeutung des Parkinson-Syndroms fehlt es noch immer an krankheitsmodulierenden Therapien. Bisher in der Praxis eingesetzte medikamentöse Therapien führen nur zu einer Symptomkontrolle, können ein Fortschreiten der Erkrankung jedoch nicht verhindern. Insbesondere im fortgeschrittenen Krankheitsstadium sind bisherige Therapien aufgrund einer abnehmenden Wirksamkeit und starken Wirkungsfluktuation unzureichend und schlecht modulierbar und können auch zur Ausbildung von psychiatrischen Nebenwirkungen führen (27, 28). Zudem zielen diese Therapien größtenteils auf die Verbesserung der dopaminergen Neurotransmission ab. Vegetative, sensorische und psychokognitive Symptome, die zu großem Teil auch auf die Dysregulation nicht-dopaminergem Transmittersysteme (noradrenerg, serotonerg, cholinerg, glutamaterg und GABAerg) zurückzuführen sind, bleiben von diesen Therapiestrategien meist unbeeinflusst (29, 30). Diese Symptome stellen für die betroffenen Patientinnen und Patienten jedoch eine erhebliche Beeinträchtigung der Lebensqualität dar (31). Eine Sonderstellung in der Therapie hat die tiefe Hirnstimulation mittels in das Hirn eingebrachter

Elektroden bei fortgeschrittener Erkrankung inne. Meistens dienen dabei der Nucleus Subthalamicus oder der Globus pallidus internus als Zielstruktur. Die durch die Erkrankung gesteigerte Aktivität dieser Strukturen wird mittels intrazerebral eingebrachter Elektroden inhibiert und erlaubt damit eine Symptomkontrolle der motorischen Defizite. Jedoch sind nicht alle Patientinnen und Patienten für diese Form der Therapie geeignet, die Symptomkontrolle ist nicht bei allen Patienten langfristig zufriedenstellend und auch das Fortschreiten der Erkrankung kann nicht verhindert werden (32-34). Dieser Mangel an wirksamen Therapien erfordert daher die verstärkte Erforschung neuer Behandlungsansätze. Ziel ist es dabei, die fortschreitende Degeneration der Neurone zu stoppen und im besten Fall sogar eine Wiederherstellung neuroanatomischer Strukturen und physiologischer Funktionen zu erreichen. Bisher ist noch keine dieser neuen Therapien für den Einsatz in der Klinik zugelassen. Insbesondere die Transplantation humaner Stammzellen zeigt jedoch vielversprechendes Potenzial, wie im nächsten Abschnitt dargestellt wird.

### **3.2. Zellbasierte Therapieansätze beim Parkinson-Syndrom**

Die Zelltransplantation ist eine Möglichkeit degenerierte Neurone zu ersetzen. Bisherige Versuche bei Parkinsonpatientinnen und -patienten konzentrierten sich v.a. auf die Transplantation von embryonalem oder fetalem Gewebe. Hier konnten bei einigen Patientinnen und Patienten eine Symptomverbesserung gezeigt werden, jedoch sind für eine ausreichende Anzahl an transplantierbaren Zellen die ventralen Mesencephala von mindestens drei humanen Föten pro Hemisphäre notwendig (35). Die derzeit noch andauernde europäische multizentrische „TRANSNEURO“-Studie untersucht die Wirksamkeit der Transplantation von fetalen dopaminergen Neuronen bei Parkinsonpatientinnen und -patienten (36). Methodische Probleme in der Durchführung der Studie ergaben sich zum einen in der Verfügbarkeit von fetalem Gewebe als Hauptgrund für eine verzögerte Operation (36). Zum anderen sind die transplantierten Zellen sehr heterogen und unterscheiden sich in ihrem genetischen Potenzial und damit auch sicherlich in ihrer Wirksamkeit, die Regeneration der geschädigten Neuronenpopulationen zu beeinflussen. Dies bringt auch das Risiko der Entartung mit sich. Des Weiteren stellt die Transplantation humaner fetaler Zellen ein ethisches Konfliktpotenzial dar. Diesem Problem wurde mit der Entwicklung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) aus humanen Fibroblasten vor einigen Jahren entgangen (37). iPSC besitzen im Vergleich zu fetalem Gewebe eine bessere HLA-Kompatibilität zwischen transplantierten Zellen und Empfänger, eine unbegrenzte Anzahl an Zellen, eine langfristige Lagerungsmöglichkeit, sowie die mögliche vorausgehende Untersuchung in Hinblick auf Sicherheitsaspekte sowie Entartungsgefahr und die Reproduzierbarkeit der Zellen

(38). Jedoch zeigten post mortem Studien in einigen Fällen Einschlusskörperchen in den transplantierten Zellen, die andeuten könnten, dass sich die Erkrankung auf die neuen Zellen ausbreiten kann (39-41). Zudem besitzen embryogene Stammzellen und iPSC immunogenes Potenzial und können zur Entwicklung von Teratomen führen (42). Die genannten Methoden weisen daher einige entscheidende Nachteile auf. Im Gegensatz zu den fetalen und induzierten pluripotenten Stammzellen, die auf die Ausbildung neuer Neurone durch die Transplantate selbst abzielt, beruht die Idee der Transplantation von mesenchymalen Stammzellen (MSC) auf der Sekretion bestimmter Boten- und Signalstoffe, die immunmodulatorisch wirken und zur Bildung eines progenerativen Milieus innerhalb des Gehirns führen (43). Der vorrangige Effekt der transplantierten Zellen soll dieser Idee nach nicht durch die Differenzierung der Stammzellen in dopaminerge Neurone erfolgen, sondern vielmehr durch die Ausschüttung von parakrin aktiven Faktoren, mRNA (*messenger RNA*), regulatorischer miRNA (*micro RNA*) und Proteinen (44-46). Diese Substanzkombination wird als Sekretom bezeichnet und soll die noch vorhandenen endogenen Zellen zu Teilung und Wachstum anregen, antiinflammatorisch wirken, endogene Reparaturmechanismen aktivieren und so die Regeneration des geschädigten Gewebes fördern (44, 46). Die Differenzierung der MSC in Osteoblasten, Chondrozyten, Myozyten und Adipozyten (47) spielt dabei für die Regeneration des Gehirns keine Rolle. Zwar wurde auch die Differenzierung von MSC in neuronale Zellen in einzelnen Studien gezeigt (48), die Funktionalität dieser Zellen wird allerdings in Frage gestellt (49). Mesenchymale Stammzellen sind gegenüber den fetalen oder embryonalen Stammzellen einfacher zu gewinnen, bieten geringeres ethisches Konfliktpotenzial, wirken immunmodulatorisch und besitzen ein geringeres Entartungsrisiko (50, 51). Bisherige Studien zur Effektivität von MSC-Transplantation bei Parkinsonmodellen der Ratte zeigten positive Effekte auf die Neurogenese (52-54) und eine Verbesserung im D-Amphetamin induzierten Rotationstest nach einseitiger nigrostriateller Schädigung, entsprechend einer Reduktion der Asymmetrie dopaminerger Innervation (55). Zusätzlich konnte durch die Injektion von konditioniertem Medium von MSC in die Substantia nigra und das Striatum die Koordination und die unilateralen motorischen Defizite im Rattenmodell verbessert werden (56), was die regenerativen Eigenschaften des Sekretoms der MSC unterstreicht. Die Verträglichkeit beim Menschen konnte in einer offenen Phase-I Studie belegt werden, bei der Parkinsonpatientinnen und -patienten autologe MSC aus dem Knochenmark transplantiert wurden, ohne dass dabei schwerwiegende Nebenwirkungen auftraten (57). In früheren Studien wurden meist MSC aus dem Knochenmark gewonnen (*bone marrow derived mesenchymal stem cells* BM-MSC). Seit einiger Zeit hat sich jedoch auch Fettgewebe als Quelle mesenchymaler Stammzellen bewährt. Die *adipose tissue-derived mesenchymal stem cells* (ASC) sind einfacher zu gewinnen als MSC aus

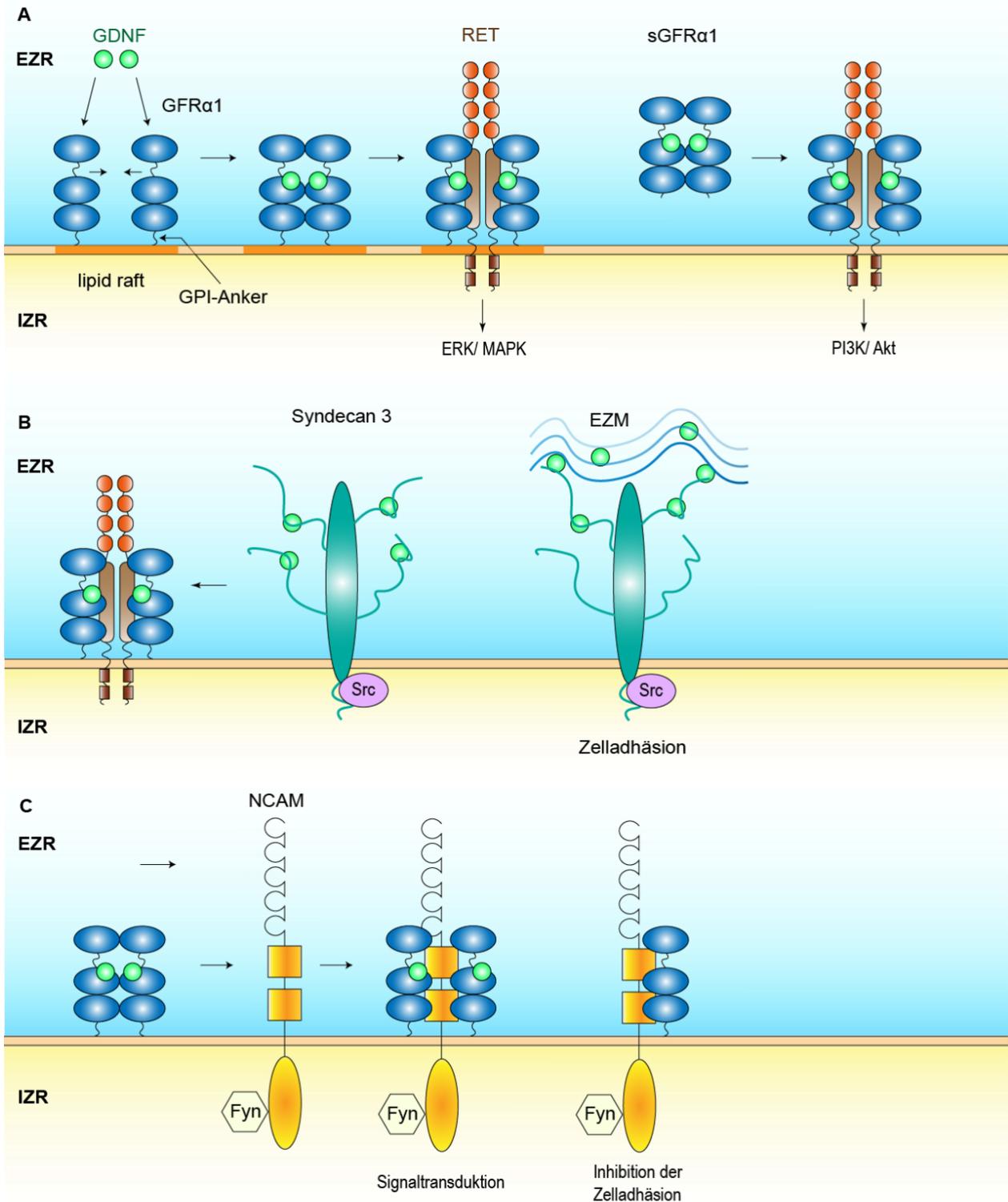
dem Knochenmark und weisen ein stärkeres immunmodulatorischen Potenzials auf (58, 59). Da MSC unter physiologischen Bedingungen nur wenige MHC-Klasse-I- (*major histocompatibility complex*) und keine MHC-Klasse-II-Moleküle oder Kofaktoren ausbilden, besitzen sie zudem eine gewisse immunogene Toleranz (60). Trotz ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften sind MSC jedoch nicht immunprivilegiert und können vom Immunsystem erkannt und abgestoßen werden (60). So führen sie zu einer Vermehrung von B-, T- und NK-Zellen im Blut und zur Bildung von Autoantikörpern nach allogener intrakranieller Transplantation beim Rhesusaffen. Diese Reaktion, wenn auch kurzfristig, ist abhängig vom Haplotyp und der Menge der transplantierten Zellen (61, 62). Das immunogene Potenzial der MSC ist abhängig von der phylogenetischen Nähe von Spender und Empfänger. Bei xenogener Transplantation wird die inflammatorische Reaktion dabei vor allem durch NK- und T-Zellen sowie Mikroglia hervorgerufen (63).

Die therapeutischen Effekte und die immunmodulatorischen Effekte, die durch die Beeinflussung des Mikromilieus durch die MSC entstehen, können mit Hilfe genetischer Manipulation noch weiter verstärkt werden. So ist es möglich die Expression bestimmter Botenstoffe zu induzieren oder zu modifizieren, um so die gewünschten proregenerativen Effekte noch weiter zu steigern.

### 3.3. GDNF

Unter den vielen möglichen Substanzen, die eine neuroregenerative Wirkung auf dopaminerge Neurone zeigen, imponiert insbesondere der 1993 von Lin et al. beschriebene Wachstumsfaktor *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) (64, 65). GDNF entfaltet seine Wirkungen über verschiedene molekulare Mechanismen mit Hilfe seines Rezeptors *GDNF family receptor alpha-1* (GFR $\alpha$ 1). Dieser kann sowohl über einen GPI-Anker (*glycosyl phosphatidylinositol anchor*) an *lipid rafts* der Zellmembran gebunden oder als lösliche Form als GDNF/GFR $\alpha$ 1-Dimer vorliegen. Bindet GDNF an membrangebundenes GFR $\alpha$ 1, kommt es zur Dimerisierung dieses Ligand-Rezeptor-Komplexes und zur Bindung von zwei RET (*rearranged during transfection*) Rezeptor-Tyrosinkinase-Molekülen und dadurch zur cis-Stimulierung und Aktivierung des ERK/MAPK-Signalweges (*extracellular-signal-regulated kinase/ mitogen-activated protein kinase*). Bindet hingegen ein löslicher GDNF/GFR $\alpha$ -1-Komplex an RET kommt es zur trans-Stimulierung mit nachfolgender Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges (Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B) (66). Alternativ kann der GDNF-GFR $\alpha$ 1-Komplex auch RET-unabhängig an das *neural cell adhesion molecule* NCAM binden und intrazellulär die Src Kinase Fyn und die *focal adhesion kinase* (FAK) aktivieren. Die Bindung von GDNF an NCAM ist auch unabhängig von GFR $\alpha$ 1 möglich, allerdings ist diese Bindung weniger affin als die Bindung zwischen einem GDNF-GFR $\alpha$ 1-Dimer und NCAM (67). Zudem kann GDNF von Syndecan-3 gebunden werden,

einem transmembranösen Proteoglykan, das mit Hilfe von Heparansulfatketten GDNF binden und so lokal konzentrieren kann. Auf diese Weise kann es als Korezeptor für GFR $\alpha$ 1 wirken oder selbst intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren (68) (siehe auch Abbildung 2). Die Möglichkeit eines



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion von GDNF**

(A) GDNF bindet an seinen Rezeptor GFR $\alpha$ 1. Da dieser keine intrazytoplasmatischen Anteile besitzt, erfolgt die Signalübertragung über weitere Rezeptoren. GFR $\alpha$ 1 ist mit einem GPI-Anker in lipid rafts gebunden. Nach der Dimerisierung von GDNF/GFR  $\alpha$ 1 Komplexen werden zwei RET Rezeptormoleküle gebunden und es kommt zur intrazellulären Signaltransduktion über ERK/ MAPK. Zudem kommt GFR $\alpha$ 1 auch als lösliche Form ohne GPI-Anker vor und kann so über eine trans-Signalübertragung seine intrazellulären Effekte vermitteln. Dabei kommt es zur Aktivierung außerhalb der lipid rafts und zur Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges. (B) Das Proteoglykan Syndecan 3 kann über seine Heparansulfatketten GDNF binden, lokal konzentrieren und so als Korezeptor fungieren oder selbst über die Tyrosinkinase Src intrazelluläre Signalkaskaden auslösen. Die Bindung von in der Extrazellulärmatrix (EZM) immobilisiertem GDNF an Syndecan 3 führt zudem zur Zelladhäsion und zum Zellwachstum. (C) RET-unabhängig kann die Signalübertragung über NCAM erfolgen. Ein GDNF/GFR $\alpha$ 1-Dimer bindet NCAM mit hoher Affinität und aktiviert so die intrazelluläre Tyrosinkinase Fyn. NCAM ist ein Zelladhäsionsmolekül für Neuronen. In Abwesenheit von GDNF kann GFR $\alpha$ 1 an NCAM binden und so die Zelladhäsion verhindern. AKT= Proteinkinase B, ERK= extracellular signal-regulated kinase, EZM= Extrazellulärmatrix, EZR= Extrazellulärraum, GDNF= Glial cell-derived neurotrophic factor, GFR $\alpha$ 1= GDNF family receptor alpha-1, GPI= glycosyl phosphatidylinositol, IZR= Intrazellulärraum, MAPK= mitogen-activated protein kinase, NCAM= neural cell adhesion molecule, src= sarcoma tyrosine kinase, PI3K= Phosphatidylinositol-3-kinase; Abbildung in Anlehnung an Sariola et al. (69)

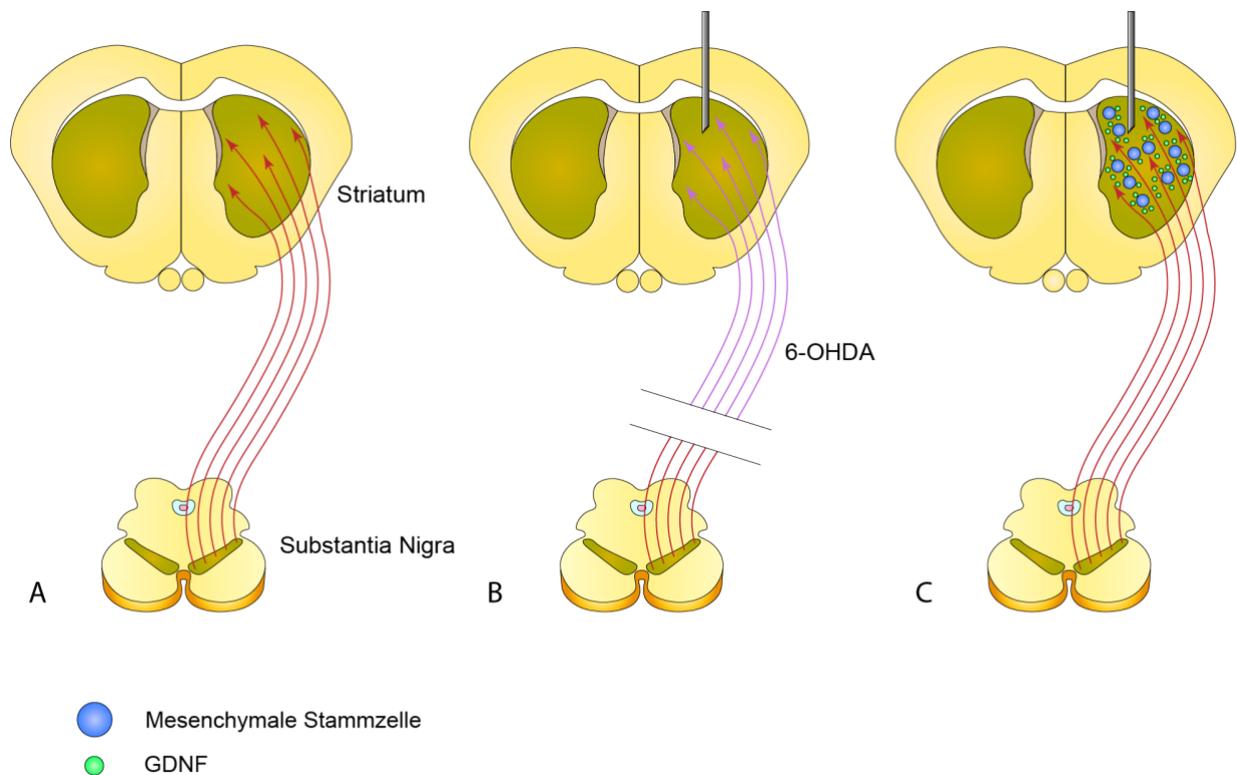
weiteren GDNF-Rezeptors wurde postuliert, bisher jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen (70). Bisher ist noch kein geeigneter Applikationsweg beim Menschen etabliert. GDNF kann die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht passieren und muss somit intrazerebral appliziert werden. Zudem ist die Halbwertszeit von GDNF sehr kurz und eine kontinuierliche oder repetitive Freisetzung ist für einen andauernden Effekt notwendig (71). Insbesondere der Ort und die Art der GDNF-Freisetzung haben eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit. Kirik et al. (72) untersuchten den geeignetsten Applikationsort von GDNF im intrastriatalen 6-OHDA Modell der Ratte (Erläuterung des Modells siehe 3.4). Eine Injektion von GDNF ins Striatum konnte hier sowohl die nigrostriatale Funktion als auch die dopaminerge Innervation des Striatum bewahren, während eine Injektion von GDNF in die Substantia nigra zwar dopaminerge Neurone schützen, jedoch weder die dopaminerge Innervation noch die funktionelle Integrität erhalten konnte. Intraventrikuläre Injektionen zeigten hingegen keinerlei Effekt auf die striatale Innervation und die nigrostriatalen motorischen Funktionen (72). Diese fehlende Wirksamkeit bei ventrikulärer Applikation bestätigte sich auch bei ersten Untersuchungen am Menschen. Intraventrikulären Injektionen von GDNF bei einem Parkinsonpatienten zeigten weder eine Besserung der klinischen Symptomatik noch einen Erhalt der dopaminergen Neurone. Es kam jedoch zum Auftreten von

unerwünschten Nebenwirkungen (73). Eine Phase II Studie, die die Injektion von GDNF in das dorsale Putamen bei Parkinsonpatientinnen und -patienten untersuchte, konnte nach sechs Monaten keine Verbesserung der *Unified Parkinson Disease Rating Scale* (UPDRS) zeigen. Bei neun Studienteilnehmern traten schwerwiegender Nebenwirkungen, wie intrakranielle Blutungen, Infektionen oder Fehlplatzierungen auf und bei drei Studienteilnehmern war sogar die Neuplatzierung bzw. Entfernung notwendig (74). Striatale GDNF-Messungen bei Rhesusaffen nach Applikation mit Hilfe des gleichen Kathetersystems legen nahe, dass nur in ca. 2-9% des menschlichen Striatum bei dieser Applikationsform eine ausreichende Konzentration von GDNF erreicht wurde (75). Dies macht deutlich, dass andere Freisetzungsmechanismen für eine ausreichende Wirkung von GDNF nötig sind. Insbesondere die Transplantation von modifizierten mesenchymalen Stammzellen bietet sich dafür an. Durch das Einbringen geeigneter Plasmide in die Stammzelle (vgl. 5.2.1) kann die Expression von neuroprotektiven Substanzen wie GDNF verstärkt werden. Nach der Transplantation in das Striatum geben die Zellen GDNF und andere Botenstoffe in das Parenchym ab. Dabei können sie dauerhaft im Gewebe verbleiben, ohne jedoch die Risiken eines implantierten Kathetersystems mit sich zu bringen.

### **3.4. 6-OHDA**

6-OHDA ist ein Neurotoxin, das aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu endogenen Katecholaminen von Dopamin- und Noradrenalintransportern in die Zelle aufgenommen wird und über die Bildung von Sauerstoffradikalen zu oxidativem Stress und letztendlich zur Zellschädigung führt (76). Das 6-OHDA Modell ist eines der am häufigsten verwendeten Tiermodelle für das Parkinson-Syndrom. Da 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, ist eine intrakranielle Injektion des Neurotoxins nötig. Eine Reduktion bestimmter Zellpopulationen ist dabei abhängig vom intrakraniellen Applikationsort. Bei Applikation in das Striatum oder in die Substantia nigra kommt es zum Absterben von dopaminergen Neuronen und dadurch zu motorischen Einschränkungen, die das Parkinson-Syndrom imitieren. Es kommt dabei nur zur lokalen Ausbreitung in der jeweiligen Hemisphäre, die kontralaterale Seite bleibt unbeeinflusst (77). Dies hat den Vorteil, dass die unbeeinträchtigte Seite als gesunde Vergleichsseite betrachtet werden kann, während es in anderen Tiermodellen wie dem MPTP-Modell (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) zur systemischen Verteilung und damit Beeinträchtigung beider Hemisphären kommt. Zudem ist 6-OHDA ungefährlicher für den Anwender als MPTP, welches das Parkinson-Syndrom bereits über eine intranasale Gabe hervorrufen kann (77). 6-OHDA wurde daher in den nachfolgend beschriebenen Experimenten verwendet, um ein Parkinsonmodell der Ratte zu induzieren. Das Krankheitsmodell sowie die

verwendete Therapiestrategie mittels GDNF-sekretierender ASC sind in der Abbildung 3 dargestellt.



### Abbildung 3: Krankheitsmodell und Wirkprinzip der Transplantation

(A) Dopaminerge Neurone projizieren mit ihren Axonen in das Striatum und geben dort motorische Befehle an die nachfolgenden Neurone weiter. (B) Nach der Injektion von 6-OHDA in das Striatum kommt es zur Aufnahme des Toxins durch Katecholamintransporter in die Axone der dopaminergen Neurone und zum retrograden Transport. Hier führt 6-OHDA durch die Induktion von ROS und oxidativem Stress zum Absterben der dopaminergen Neurone und zum Verlust der nigrostriatalen Innervation. (C) Die Transplantation von ASC in das Striatum führt zur Regeneration der nigrostriatalen Innervation über die Expression von GDNF und anderen Wachstumsfaktoren, Botenstoffen und messenger- und microRNA. Diese regen die Regeneration der körpereigenen dopaminergen Neurone wieder an und führen zu einer Wiederherstellung bzw. zum Erhalt der funktionellen Eigenschaften. 6-OHDA= 6-Hydroxydopamin, GDNF= Glial cell-derived neurotrophic factor, ASC= mesenchymale Stammzelle aus Fettgewebe; Abbildung in Anlehnung an Winner et al. (78)

### 3.5. Immunreaktion beim Parkinson-Syndrom

Die Rolle des Immunsystems bei der Entstehung, Aufrechterhaltung und dem Fortschreiten des Parkinson-Syndroms war in den letzten Jahren zunehmend Bestandteil aktueller Forschung.

Während die genauen Ursachen für die Entstehung der Erkrankung noch unklar sind, wurde die Konfrontation des Immunsystems in lokaler Nähe zu sensiblen Bereichen des Nervensystems, wie dem Bulbus Olfactorius und dem vegetativen Nervensystem des Darms, als möglicher Trigger propagiert. Entzündungsreaktionen im Colon sind bei Parkinsonpatientinnen und -patienten häufiger zu finden als bei gesunden Vergleichsgruppen (79) und bei Patientinnen und Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) liegt die Inzidenz des Parkinson-Syndroms höher als bei Personen ohne CED (80). Zudem konnte gezeigt werden, dass die orale Verabreichung von *Proteus mirabilis*, eines Enterobakteriums, das vermehrt bei mit Parkinson-Syndrom erkrankten Mäusen im Darm zu finden ist, bei gesunden Mäusen zum selektiven Absterben von dopaminergen Neuronen führt. Es kam hierbei zu einer begleitenden Neuroinflammation in der Substantia nigra und dem Striatum sowie zur Ansammlung von  $\alpha$ -Synuclein sowohl im Gehirn als auch im Colon (81). Ebenso kann eine begleitende Entzündungsreaktion bei Parkinsonpatientinnen und -patienten im Blut nachgewiesen werden. Eine Metaanalyse zeigte höhere Konzentrationen der Zytokine Interleukin 6 (IL-6), Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, C-reaktives Protein und RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) (82). Ob die Entzündung Ursache oder Folge der Erkrankung ist, ist noch ungeklärt (26, 83). Die Hypothese, dass proinflammatorische Zytokine die Entstehung bzw. das Fortschreiten des Parkinson-Syndroms begünstigen wird durch in vitro Studien gestützt, die zeigen, dass IL-6, IL-1 und TNF- $\alpha$  neurotoxisch wirken (84-87). Zwar konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  über die Modulierung der neuronalen Glutamatsekretion unter ischämischen Bedingungen neuroprotektiv wirken kann (88), jedoch scheint die exzessive IL-1 $\beta$  Sekretion über die Schaffung eines hyperinflammatorischen Milieus eher schädigend zu sein (89, 90). Mäuse, die nicht funktionelle Allele für Cyclooxygenase-2 und TNF-Rezeptoren besitzen, zeigen zudem eine geringere Anfälligkeit für Neurotoxizität bei dopaminergen Neuronen (91, 92). Ebenso besitzt das proinflammatorische Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) einen neurotoxischen Einfluss auf dopaminerge Neurone (93), auch wenn dieses Zytokin in der Metaanalyse von Qin et al. nicht erhöht war (82). Die Autoren weisen jedoch darauf hin, dass nur wenige Studien mit kleinen Fallzahlen vorliegen und dies dazu führen könnte, dass geringe Unterschiede nicht erfasst wurden (82).

Das Gehirn gilt als Organ mit einem spezialisierten Immunsystem, da es eine Toleranz des Immunsystems gegenüber in das Gehirn eingebrachten Pathogenen zeigt. Diese Toleranz ist unter anderem bedingt durch die BHS. Jedoch ist diese Toleranz nicht absolut und peripherere Immunisierung kann zu einer zellulären Immunantwort im Parenchym des Gehirns führen (94). Die BHS wird gebildet von Endothelzellen, den Perizyten, einer Basalmembran mit *tight junctions*

sowie den Zellfortsätzen der Astrozyten und limitiert das Eindringen von toxischen Substanzen und Zytokinen sowie das Einwandern von Leukozyten in das Gehirn unter anderem durch die Expression von *sonic hedgehog* (SHH), IL-25 und *CXC motif chemokine 12* (CXCL12) (95, 96). Bakterien und andere Pathogene können die BHS jedoch durchbrechen (97) und das zentrale Nervensystem wird daher kontinuierlich durch Zellen des peripheren Immunsystems im zerebrospinalen Liquor, den Meningen und den Lymphgefäßen des zentralen Nervensystems überwacht (94, 98). Bei Parkinsonpatientinnen und -patienten ist die Funktionalität der BHS gestört (99, 100) und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten können bei Parkinsonpatientinnen und -patienten in die Substantia nigra einwandern (101). Zudem wurde eine vermehrte Anreicherung von Immunglobulin G (IgG) in der Substantia nigra von Parkinsonpatientinnen und -patienten beobachtet (102). Die Ansammlung von IgG kann sowohl über die Aktivierung des Komplementsystems als auch über die Aktivierung von Mikroglia zum Verlust von dopaminergen Neuronen führen (103). So führte IgG, das von Parkinsonpatientinnen und -patienten gewonnen wurde, nach Injektion in die Substantia nigra pars compacta von Mäusen Fc $\gamma$  (*fragment crystallizable*  $\gamma$ )-vermittelt zur Ansammlung von Mikroglia und zum Verlust von dopaminergen Neuronen (104).

### 3.6. Mikroglia

Mikroglia sind parenchymatöse Zellen des zentralen Nervensystems, die sich bereits früh in der embryonalen Entwicklung aus erythromyeloiden Vorläuferzellen des Dottersacks entwickeln (105). Sie gelten als die primären Zellen des angeborenen Immunsystems im zentralen Nervensystem und tasten mit ihren Fortsätzen kontinuierlich ihre Umgebung nach Schädigungen, abgestorbenen Zellen oder Pathogenen ab (106). Mit Hilfe von *pattern recognition receptors* (PRRs) können sie Pathogene (*pathogen-associated molecular patterns* PAMPs) oder *danger-associated molecular patterns* DAMPs wie *high mobility group protein 1* (HMGB1), Adenosintriphosphat (ATP), Bestandteile der Extrazellulärmatrix, mitochondriale DNS und Hitzeschockproteine (107-111) in ihrer Umgebung erkennen. Dies führt zur Aktivierung, Teilung und Ansammlung von Mikroglia und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Botenstoffen und zytotoxischen Substanzen wie reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* ROS) (112). Des Weiteren sind Mikroglia auch an weiteren Prozessen im Gehirn wie beispielsweise der Auflösung, Modulation und Neuentstehung von Synapsen beteiligt (112, 113). Die Beobachtung, dass sich Mikroglia vermehrt in der Substantia nigra von Parkinsonpatientinnen und -patienten anreichern, führte zur Erforschung der Bedeutung dieser Zellen in der Pathogenese des Parkinson-Syndroms (114). Ihre Beteiligung am Krankheitsgeschehen ist inzwischen

allgemein anerkannt, auch wenn die Kausalität in der Pathogenese noch nicht geklärt ist (115). Genassoziationsstudien legen jedoch eine ursächliche Beteiligung nahe (116, 117). So sind Mutationen in dem Gen der Serin-/Threoninkinase *Leucine-rich repeat kinase 2* (LRRK2), auch bekannt als Dardarin, einer der häufigsten Gründe für die Entstehung von genetischen Parkinson-Syndromen. Untersuchungen nordafrikanischer Araber zeigen, dass eine LRRK2-Mutation bis zu 37% der familiären und 41% der sporadischen Parkinsonformen ausmacht (116). Patientinnen und Patienten mit LRRK2-Mutationen weisen dabei einen ähnlichen Phänotyp auf wie Patientinnen und Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom, was diese Mutation besonders interessant für die Erforschung der Pathogenese macht (118). Es wird angenommen, dass LRRK2-Mutationen zu einem gestörten Gleichgewicht und zu einer veränderten Antwort der Mikroglia auf das vermehrt anfallende  $\alpha$ -syn führen (119). Dies wird gestützt durch neue Daten, die zeigen, dass LRRK2-Knockout-Mäuse eine geringere Anfälligkeit für dopaminerge Degeneration zeigen, möglicherweise begründet durch eine reduzierte Mikrogliaaktivierung (120). Ein anderes Beispiel für ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung des Parkinson-Syndroms sind Mutationen im Gen von TREM2 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) (117), einem Mikrogliazephor, der für die Gewebsreparatur durch die Beseitigung von apoptotischen Zellen und die Unterdrückung von Neuroinflammation verantwortlich ist (121). Funktionell beeinträchtigende Mutationen im TREM2-Gen können zu einer Übersekretion proinflammatorischer Zytokine durch Mikroglia führen (121).

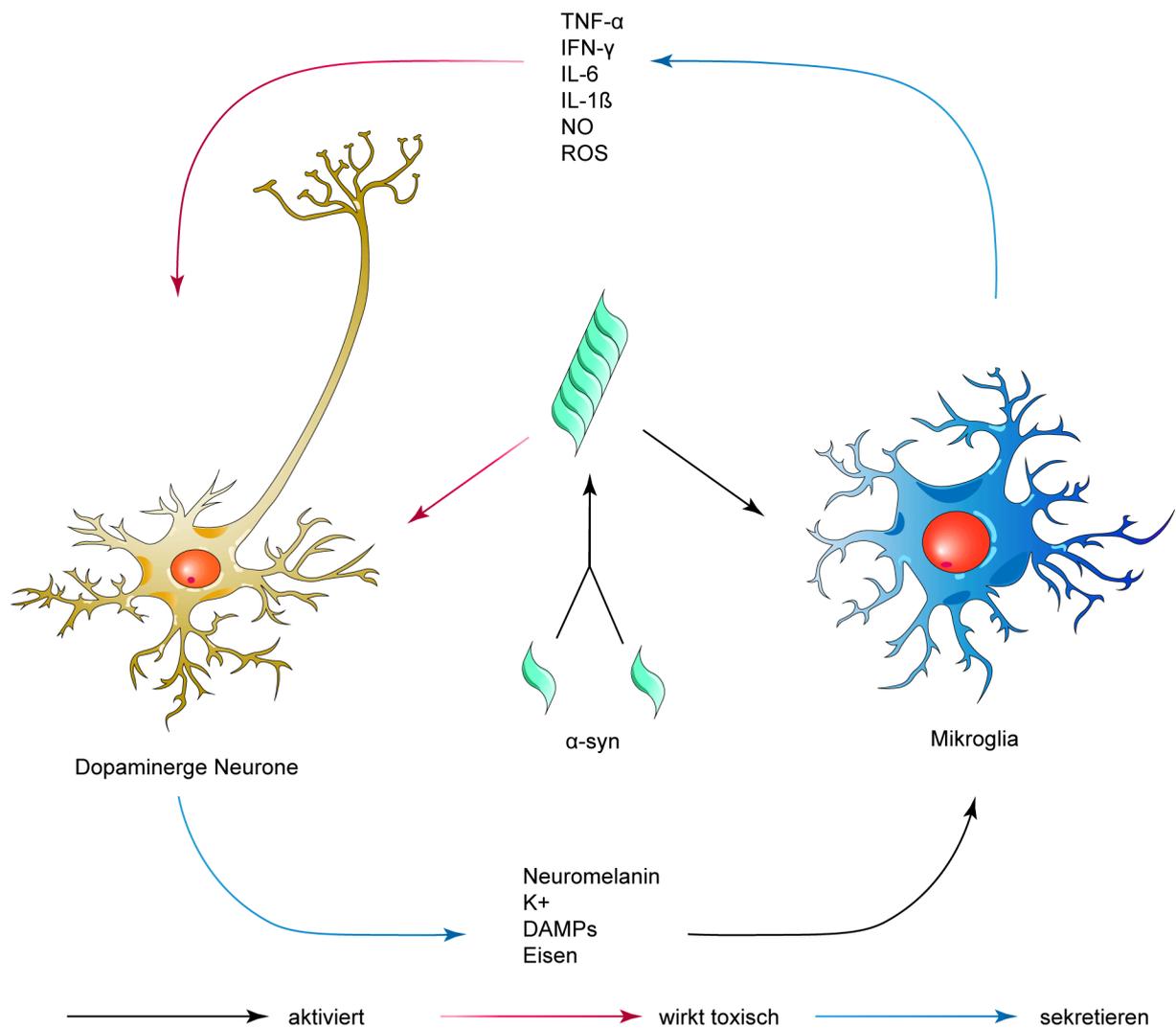
Ein Konzept, das im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen vorgeschlagen wurde, ist Mikroglia priming: Mit zunehmendem Alter und systemischer niederschwelliger Inflammation werden Mikroglia empfänglicher für inflammatorische Reize und reagieren mit einer verstärkten und länger anhaltenden proinflammatorischen Immunantwort (122-124). Auch extrazelluläres  $\alpha$ -syn kann Mikroglia für systemische inflammatorische Reize empfänglicher machen, so dass systemische Infektionen eine lokale Aggravation im Gehirn begünstigen können (125). Dies könnte auch das erhöhte Risiko für Parkinson-Syndrome von Patientinnen und Patienten mit CED erklären (79). Wie oben beschrieben ist die Ansammlung von fehlgefaltetem  $\alpha$ -syn ein Eckpfeiler in der Pathogenese des Parkinson-Syndroms. Das vermehrt anfallende  $\alpha$ -syn kann *toll-like receptor 4* (TLR4)-abhängig von Mikroglia phagozytiert werden (126, 127). Dabei kommt es TLR1/2- und TLR4-vermittelt zur Aktivierung der Mikroglia und zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (128-131).

Dem erhöhten Redoxpotenzial der Dopaminmetabolite wirken die Neurone entgegen, indem sie Dopamin in Neuromelanin umwandeln (23). Dieses besitzt eine dunkle Färbung und ist ursächlich für die Namensgebung der Substantia nigra. Überschüssiges Eisen wird durch Neuromelanin in

Chelatkomplexen gebunden und die entsprechenden Redoxreaktionen somit verhindert (132). Kommt es jedoch mit zunehmendem Alter zu mitochondrialer Dysfunktion, Proteinaggregation und vermehrter Bildung von ROS, kann sich dieses Gleichgewicht verschieben und zu einer Akkumulation von neurotoxischen Substanzen führen (24). Eisen wird nach extrazellulär abgegeben und von Mikroglia aufgenommen (133). Dies könnte als physiologische Reaktion zu verstehen sein, um das Parenchym vor dem Redoxpotenzial des Eisens zu schützen (133). Gelangt jedoch auch Neuromelanin nach extrazellulär kommt es zur Aktivierung der Mikroglia (134, 135) und zur Entstehung eines positiven Feedbackloops. Das proinflammatorische Milieu mit ROS und die neurotoxischen Substanzen, die von den Mikroglia ausgeschüttet werden, führen zum Absterben der Neurone, zur weiteren Freisetzung von Neuromelanin, DAMPs und Eisen mit konsekutiver Aktivierung der Mikroglia, verstärkt durch die chronisch andauernde Bildung von fehlgefaltetem  $\alpha$ -syn (24, 135) (siehe auch Abbildung 4).

Über den Einfluss der Anzahl der Mikroglia auf den Krankheitsverlauf von Parkinsonpatientinnen und -patienten gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Im Tiermodell korreliert die Menge der Mikroglia mit dem Verlust an dopaminergen Neuronen (136). Dies konnte auch durch PET-Untersuchungen (Positronen-Emissions-Tomographie) beim Menschen bestätigt werden (137). Während Ouchi et al. in ihrer Studie zeigen konnten, dass die Mikrogliaaktivität mit der Krankheitsdauer korreliert und eine höhere Aktivität mit einem zunehmenden Verlust an dopaminergen Neuronen einhergeht (137), könnte die fehlende longitudinale Korrelation in einer anderen Studie jedoch darauf hindeuten, dass es frühzeitig zu einer Aktivierung der Mikroglia kommt, diese dann jedoch konstant bleibt und über eine kontinuierliche Zytokinfreisetzung den Krankheitsverlauf moduliert (138). Die Diskrepanz dieser Studien könnte jedoch auch auf methodische Aspekte zurückzuführen sein (138).

Seit einiger Zeit ist bereits bekannt, dass Mikroglia verschiedene Funktionen je nach umgebendem Milieu übernehmen können (139). M1 und M2 Mikroglia stellen in einem vereinfachten Modell zwei extreme Zustände dieser Zellen dar (140). M1 Mikroglia werden dabei als der Zelltyp angesehen, der bei akut auftretendem Schaden im Hirnparenchym eine erste Reaktion auf den pathologischen Zustand liefert. Sie sind geprägt durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , von ROS und NO (Stickstoffmonoxid) und die Ausbildung von typischen Oberflächenmarkern wie CD86 (*cluster of differentiation*) und CD11b und beseitigen effektiv Bakterien, apoptotische Zellen und andere Pathogene (140, 141). Im Gegensatz dazu sind M2 Mikroglia vorrangig geprägt durch die Ausbildung verschiedener Oberflächenmoleküle wie Arginase 1, CD163, TREM2 und anderen sowie der Sekretion antiinflammatorischer Botenstoffe



**Abbildung 4: Mikrogliaaktivierung beim Parkinson-Syndrom**

Beim Parkinson-Syndrom kommt es zur Bildung von fehlgefaltetem  $\alpha$ -Synuclein. Kommen mehrere gleich gefaltete  $\alpha$ -Synuclein-Monomere zusammen können diese aneinanderbinden und Polymere bilden. Die Polymere erhöhen in dopaminergen Neuronen den intrazellulären oxidativen Stress und führen so zum Absterben. Gleichzeitig können die Polymere von Mikroglia phagozytiert werden und führen zu deren Aktivierung. Die aktivierten Mikroglia setzen proinflammatorische Zytokine frei, die ebenfalls toxisch auf dopaminerge Neurone wirken. Sterbende Neurone setzen Neuromelanin und andere Substanzen frei, die von den umgebenden Mikroglia erkannt und phagozytiert werden. Durch die Phagozytose wird die Aktivierung der Mikroglia unterhalten und es entsteht ein sich selbst verstärkender Kreislauf mit Entstehung eines proinflammatorischen Milieus und fortschreitender Degeneration der dopaminergen Neurone.  $\alpha$ -syn=  $\alpha$ -Synuclein, DAMP= Damage-associated molecular pattern, IL-1 $\beta$ = Interleukin 1 $\beta$ , IL-6= Interleukin 6, IFN- $\gamma$ = Interferon  $\gamma$ , K<sup>+</sup>= Kalium, NO= Stickstoffmonoxid, ROS= Reaktive Sauerstoffspezies, TNF- $\alpha$ = Tumornekrosefaktor  $\alpha$

wie IL-10 und TGF- $\beta$ , Matrix-Metalloproteinasen (MMP) wie Ym1, Ornithin, Polyaminen und Wachstumsfaktoren. Dadurch tragen sie zur Gewebsregeneration und -reorganisation bei (140, 141). Es wird vermutet, dass M1 und M2 Mikroglia jedoch nur zwei Zustände eines ganzen Spektrums unterschiedlicher Phänotypen darstellen (142). Der Übergang von der akuten M1-Antwort hin zu einer antiinflammatorischen und regenerativen M2-Antwort ist ein pathophysiologischer Eckpfeiler und bedeutend für eine physiologische Krankheitsbewältigung. Kommt es zu einer anhaltenden proinflammatorischen Reaktion, führt dies langfristig zu einem Untergang von gesundem Hirngewebe und damit zum Fortschreiten der Grunderkrankung (143). Es wird daher angenommen, dass die Effekte, die durch eine gesteigerte Anzahl an proinflammatorischen M1 Mikroglia entstehen, den progressiven neuronalen Verlust beim Parkinson-Syndrom weiter verstärken (142). Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) scheint hierbei eine Schlüsselrolle einzunehmen, da er die Polarisierung der Mikroglia beeinflusst und so zu einem gestörten Gleichgewicht mit langanhaltender proinflammatorischer Aktivierung der Mikroglia mit neurotoxischen Folgen führen kann (142). Im Umkehrschluss kann eine Beeinflussung der Mikroglia in Richtung eines M2 Phänotyps möglicherweise protektiv oder bestenfalls sogar regenerativ für dopaminerge Neurone wirken. Insbesondere die Transplantation von BM-MSCs konnte über die Sekretion von IL-4 bereits die  $\alpha$ -syn Beseitigung durch M2 Mikroglia induzieren (144). Zudem zeigten kürzlich veröffentlichte Studien einen Wechsel zu einer M2-Antwort durch GDNF *in vitro*, die zusätzlich zu den direkten neuroregenerativen Effekten von GDNF auf dopaminerge Neurone weitere positive Auswirkungen auf den Erhalt der funktionellen Eigenschaften versprechen (145, 146). Die intrakranielle Transplantation von ASC in vorangegangenen Studien zeigte eine vermehrte Ansammlung von Mikroglia nach kurzer Zeit (53, 55). Jedoch zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie, dass dieser Effekt nach sechs Monaten nicht mehr nachweisbar ist (147) und höhere Plasmakonzentration der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 6 Monate nach intrastriärer Transplantation von ASC (52) sprechen für einen langfristigen antiinflammatorischen Effekt der ASC. GDNF konnte u.a. in Modellen für neuropathische Schmerzen (148), Alzheimer (149) und einem LPS Modell (150) eine Reduktion der Mikroglia erzielen und einige Studien zeigten bereits die protektiven Eigenschaften von GDNF-sekretierenden BM-MSCs auf dopaminerge Neurone (151-153). Zwei Studien untersuchten bereits die kurzfristigen Auswirkungen von vermehrt GDNF-sekretierenden BM-MSCs auf die Mikroglia im Rattenmodell (152, 153). Eine Studie zeigte eine Reduktion der Mikroglia durch die Umhüllung der MSC mit einem Hydrogel aus Typ-I Kollagen, konnte jedoch keinen Überlebensvorteil für die MSC zeigen (153), obwohl die autokrine Sekretion von GDNF durch

MSC in einer aktuellen Studie zu einer verbesserten Überlebensrate führte (154). Es ist daher möglich, dass das Hydrogel diesen Überlebensvorteil durch ein ungünstiges Mikromilieu relativieren könnte. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte in einer nachfolgenden Studie ohne Hydrogel die Reduktion der Mikroglia jedoch nicht wiederholen (152). Zieht man die besseren immunmodulatorischen Eigenschaften der ASC im Vergleich zu BM-ASC in Betracht (58, 59) liegt die Vermutung nahe, dass die Reduktion der Mikroglia durch die vermehrte Sekretion von GDNF durch ASC auch ohne die Umhüllung der ASC mit einem Hydrogel erreicht werden kann. So könnte das Sekretom der ASC mit einer verstärkten Sekretion von GDNF eine synergistische antiinflammatorische Wirkung zeigen. Bisher wurden jedoch noch keine Studien über den Einfluss von gentechnisch veränderten und damit vermehrt GDNF sekretierenden ASC auf Mikroglia durchgeführt.

#### **4. Zielsetzung der Arbeit**

Aktuelle Therapien für das Parkinson-Syndrom sind nicht zufriedenstellend und können den Krankheitsverlauf nur in geringem Maße beeinflussen. Neue Therapiestrategien mit dem Ziel das Fortschreiten der Erkrankung wirksam aufzuhalten oder im besten Fall sogar eine Regeneration zu erreichen sind zwingend notwendig. Während sowohl GDNF als auch die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe sich als vielversprechende Optionen für dieses Ziel dargestellt haben, ist die Kombination der beiden Methoden noch kaum untersucht. Die Expression von GDNF durch mesenchymale Stammzellen bietet großes Potenzial für zukünftige Therapiestrategien am Menschen. Da sich auch der Einfluss des Immunsystems und insbesondere der Mikroglia auf die Entwicklung des Parkinson-Syndroms in den letzten Jahren herauskristallisiert hat, ist es wichtig zu untersuchen, inwiefern sich die Zufuhr von GDNF durch transplantierte mesenchymale Stammzellen auf die Funktion der Mikroglia auswirkt. Kürzlich durchgeführte Studien mit mesenchymalen Knochenmarksstammzellen, die vermehrt GDNF sekretieren, zeigten jedoch inkongruente Ergebnisse. In Anbetracht der stärkeren immunmodulatorischen Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe im Vergleich zu Knochenmarksstammzellen scheint eine vermehrte GDNF-Sekretion durch diese Fettgewebsstammzellen vielversprechend.

Diese Arbeit hat daher zwei Ziele:

1. Untersuchen, welchen kurz-, mittel- und langfristigen Einfluss die Transplantation von gentechnisch veränderten, GDNF-exprimierenden humanen mesenchymalen Stammzellen aus Fettgewebe (GDNF-ASC) auf die Mikroglia population im Striatum im 6-OHDA Modell der Ratte hat.
2. Einen ausführlichen Überblick geben über die vorhandene Literatur in Bezug auf die Auswirkung von GDNF auf Mikroglia in vitro und in vivo.

Der zweite Aspekt wird nach Darstellung der Ergebnisse in die anschließende Diskussion integriert.

Folgende Hypothesen werden aufgestellt:

- Die Transplantation GDNF exprimierender ASC im 6-OHDA Rattenmodell führen zu einer signifikant höheren Ansammlung von Mikroglia im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Scheinläsion und Vektortransplantation bzw. Läsion und Vektortransplantation.
- Die Transplantation von vermehrt GDNF exprimierenden ASC führt zu einer verringerten Rekrutierung von Mikroglia im Vergleich zur Transplantation naiver ASC im 6-OHDA Rattenmodell.
- Im Verlauf kommt es zu einer Reduktion der Mikroglia im Sinne eines antiinflammatorischen Effekts durch die Transplantation von GDNF exprimierenden ASC.

## 5. Materialien und Methoden

### 5.1. Materialien:

Im Folgenden werden die Materialien aufgelistet, die für die Durchführung der Studie verwendet wurden.

**Tabelle 1: Geräte**

Gerätename	Hersteller	Firmensitz
Amaxa® Nucleofector™ 2b Device	Lonza Group AG	Basel, Schweiz
Countess™ Cell Counter	Thermo Fisher Scientific Inc.	Schwerte
Eppendorf Research Hubpipetten variabel 0,5-10µl, 2-20µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf AG	Hamburg
Heizplatte Präzitherm	Störk-Tronic	Stuttgart
Heizschüttler MR 3001	Heidolph Instruments	Schwabach
Heizschüttler MR Hei-Standard	Heidolph Instruments	Schwabach
Mikro-Kühlzentrifuge 1-14K	SIGMA Laborzentrifugen GmbH	Osterode am Harz
Leica CM1850 UV	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch
Leica DMRA Mikroskop	Leica Biosystems Nussloch GmbH	Nussloch
Minishaker PMS100	Grant Instruments Ltd.	Shepreth, Cambridgeshire, U.K.
Pipetboy	Integra Biosciences Corp.	Hudson, USA
Präzisionwaage EG 220-3 NM (W)	Kern & Sohn GmbH	Salingen
Schüttler UNIMAX 1010	Heidolph Instruments	Schwabach
Stereotaktischer Rahmen	TSE Systems GmbH	Bad Homburg
VWR VV3 Vortexer	VWR International GmbH	Darmstadt

Wasseraufbereitungssystem Direct-Q®3	Merck KGaA	Darmstadt
HERAcell® 150 Inkubator	Heraeus Holding GmbH	Hanau, Germany

**Tabelle 2: Software**

Software	Hersteller	Firmensitz
Graphpad Prism 9	Graphpad Software	San Diego, USA
IBM SPSS 25	IBM	Ehningen
Office 365	Microsoft	Redmond, USA
Stereo Investigator 10.40	MBF Bioscience- MicroBrightField, Inc.	Williston, USA
Adobe Illustrator 2020	Adobe Inc.	San Jose, CA, USA

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien**

Materialien	Hersteller	Firmensitz
Deckgläser Stärke 1 24x60mm	R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen
Eppendorf Pipettenspritzen	Eppendorf AG	Hamburg
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG	Hamburg
Ethilon 3-0 Faden	Ethicon, LLC	San Lorenzo, Puerto Rico, USA
Falcon Tubes 15ml, 50ml	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Kryoröhrchen 0,5ml	Thermo Fisher Scientific Inc.	Schwerte
Kulturflaschen (T75, T150)	TPP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific Inc.	Schwerte
Objektträger (Countess Cell Counting Chamber Slides)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Schwerte
Objektträger Superfrost Ultra Plus®	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG,	Braunschweig, Schwerte

	Thermo Fisher Scientific Inc.	
Omnifix®-F 1ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Pasteurpipetten 3ml, 5ml	Alpha Laboratories Limited	Hampshire, U.K.
ProTaq® Clear	Quartett GmbH	Berlin
ProTaq® PARAMount	Quartett GmbH	Berlin
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Corning Incorporated	Durham, USA
5ml 22G Hamilton™ Kanüle	Hamilton Bonaduz AG	Bonaduz, Schweiz
2ml 26G Hamilton™ Kanüle	Hamilton Bonaduz AG	Bonaduz, Schweiz
Zellfilter 70 µm	SIGMA-ALDRICH Co., SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	St. Louis, USA Steinheim, Deutschland

**Tabelle 4: Chemikalien/Medikamente/Kits**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
2-Methylbutan ≥99%	SIGMA-ALDRICH Co., SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	St. Louis, USA Steinheim, Deutschland
5-BrdU	SIGMA-ALDRICH Co., SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	St. Louis, USA Steinheim, Deutschland
6-OHDA 3,25g/l gelöst in 0,9% NaCl	Merck KGaA	Darmstadt
Bepanthen® Augencreme	Bayer Vital GmbH	Leverkusen
D+Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
DAB	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	Schnelldorf

di-Natriumhydrogenphosphat wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
DMEM GlutaMAX (geringe Glukosekonzentration, mit Natriumpyruvat)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Schwerte
DMSO (0,4%ig)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Schwerte
Donkey serum	Merck KGaA	Darmstadt
Ethanol $\geq 99,8\%$	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Ethanol 96% vergällt	neoFroxx GmbH	Einhausen
Ethanol 99% vergällt	neoFroxx GmbH	Einhausen
Ethylenglykol	neoFroxx GmbH	Einhausen
Ethylenglykol	Merck KGaA	Darmstadt
FBS (geprüft auf: Endotoxine, Mykoplasmen, Viruskontamination, Virus-AK [BVD-MD, BHV-1, PI3])	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH.	Schnelldorf
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Human MSC Nucleofector® Kit	Lonza Group AG	Basel, Schweiz
Isofluran CP®	cp-pharma	Burgdorf
Isopropanolol	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Metacam 5mg/ml	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Labiana Life Sciences S.A.	Ingelheim/ Rhein, Terrassa, Spanien
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Natriumchlorid 0,9%	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe

Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
Nickel (II)-chlorid 98%	SIGMA-ALDRICH INC., SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	St. Louis, USA Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	SIGMA-ALDRICH Co., SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	St. Louis, USA Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (= Pen/Strep; 10.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Schwerte
PolyFreeze Tissue Freezing Medium	SIGMA-ALDRICH Co., SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	St. Louis, USA Steinheim, Deutschland
Puromycin	Invivogen	Toulouse, Frankreich
TritonX-100	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH	Steinheim
Trizma®base	SIGMA-ALDRICH INC., SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH.	St. Louis, USA Steinheim, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%	Thermo Fisher Scientific Inc.	Schwerte
Trypsin-EDTA (gelöst in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> , 0.05%)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Schwerte
VECATASTAIN® Elite ABC-Kit	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe
DAPI D1306	Thermo Fisher Scientific,	Waltham, MA, USA
Human MSC Nucleofactor® Kits	Lonza Group AG	Basel, Schweiz
Collagenase NB4	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Ketaminhydrochlorid	Ketamin Inresa, Inresa Arzneimittel GmbH,	Freiburg

Xylazinhydrochlorid	Xylavet®, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH	Burgdorf
---------------------	--	----------

**Tabelle 5: Lösungen/Puffer**

<b>Lösung/ Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
BrdU-Lösung 1mg/0,1ml	mit NaCl 0,9% auflösen, vortexen und anschließend mit Spritzenvorsatz filtern
Cryoprotectant Solution (CPS)	500ml Glycerol, 500ml Ethylenglykol, 1000ml 0,1M PBS
Einfrriermedium MSC	10% v/v DMSO [0,4%], 40% v/v DMEM GlutaMAX und 50% FBS
Nickelchlorid 8%ig	8g Nickelchlorid anhydrid, ad 100ml ddH <sub>2</sub> O
PBS 0,1M pH 7,4	18g NaCl, 5,26g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O, 23,08g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei oder 43,52g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O, ddH <sub>2</sub> O, pH einstellen mit NaOH od. HCl
PBS+	96ml PBS 0,1M, 3 ml Eseserum, 1ml TritonX-100 10%
PFA-Lösung 4%ig	80g PFA in ca. 1,8l ddH <sub>2</sub> O lösen, über Nacht auf 50°C rühren lassen
Saccharose 30%ig	75g Saccharose, 150g ddH <sub>2</sub> O, bis auf 250ml auffüllen
Tris-Puffer 1M pH 7,6	30,29g Trizma®base mit ddH <sub>2</sub> O bis auf ca. 200ml auffüllen, pH 7,6 einstellen (NaOH), im Messkolben auf 250ml auffüllen
TritonX 10%ig	10g TritonX100, 70ml ddH <sub>2</sub> O kalt rühren lassen, bis auf 100ml auffüllen
Wachstumsmedium MSC	DMEM GlutaMAX (low glucose), 10% v/v FBS, 1% v/v Pen/Strep (100x)

**Tabelle 6: Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Art.-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Anti Iba1 Kaninchen	1:1000	019-19741	Wako Pure Chemical Industries Ltd.	Osaka, Japan
Anti rat Biotin Esel IgG	1:250	712-065-150	DIANOVA GmbH	Hamburg

## **5.2. Methoden**

### **5.2.1. Zellkultur**

Die Zellkulturexperimente, die im Folgenden beschrieben werden, wurden von Justina Rasińska durchgeführt und mit freundlicher Genehmigung für ein besseres Verständnis im Rahmen dieser Arbeit dargestellt.

#### *Gewinnung der Stammzellen*

Die Stammzellen wurden aus dem Fettgewebe einer freiwilligen 21-jährigen Spenderin während einer Routineaspirationslipektomie gewonnen. Die Spenderin wurde zuvor von dem Versuch informiert und willigte in die Entnahme ein. Die Entnahme erfolgte nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin (Zulassungsnummer EA2/127/07) und gemäß den Grundsätzen für medizinische Forschung am Menschen (Helsinki Deklaration). Während der Aspirationslipektomie wurde ein Gemisch aus Salzlösung, Lokalanästhetikum und Epinephrin in das Gewebe injiziert und sowohl Flüssigkeit als auch das Gewebe mit einem Sauger zurückgewonnen. Die Lösung wurde über Nacht stehengelassen und anschließend wurde die Blut- und Ölphase entfernt. Es erfolgte die Zentrifugation bei 350 g für 5 Minuten und die erneute Absaugung der oberen und unteren Phase. Die verbliebene Suspension wurde zweimal 1:1 mit PBS (*Phosphat buffered saline*) vermischt und erneut zentrifugiert und aufgetrennt. Zur Verdauung wurde eine PBS-Collagenase-Mischung mit folgenden Konzentrationen verwendet: Collagenase 25 U/ml (0,05%), CaCl<sub>2</sub> 2mM, BSA FV 0,25%. Diese wurde der Fettgewebslösung im Verhältnis 1:1 hinzugefügt und das Gemisch anschließend für 45 Minuten bei 37°C und 17rpm mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 350 g für 10 Minuten und dem Absaugen des Überstandes bis auf 5ml erfolgte die Resuspension der Zellpellets mit PBS. Es erfolgte die

erneute Zentrifugation bei 350 g für 10 Minuten, die Entfernung des Überstandes und die Resuspension. Mit Hilfe eines 70µm Zellfilters wurden feste Gewebsbestandteile entfernt. 10µl der Suspension wurden 1:1 mit Trypanblau verdünnt und die Hälfte dieses Gemisches wurde auf einen Objektträger gegeben, um die Zellkonzentration mit Hilfe des *Countess™ Cell Counter* zu bestimmen. Darauf folgte die Aussaat der MSC in T-Flaschen mit einer Dichte von 2000-3000 Zellen/cm<sup>2</sup> bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit Wachstumsmedium im Inkubator.

#### *Kryokonservierung*

Zellen, die nicht direkt für die Transplantation verwendet werden konnten, wurden für den späteren Gebrauch kryokonserviert. Nach Absaugen des Wachstumsmediums aus den Zellkulturflaschen erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS (T75 Zellkulturflasche: 6ml; T150: 10ml) und die Zugabe von Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure gelöst in PBS 0,05%ig, ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>; T75: 1,5ml; T150: 4ml). Es erfolgte eine Inkubation über 3 Minuten bei 37°C bis sich die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst haben. Durch das Hinzufügen von PBS wurde die Trypsinierung gestoppt (T75: 5ml; T150: 15ml). Anschließend wurde die Suspension zweimal bei 21°C und 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und mit 6ml PBS gewaschen. Es erfolgte die Resuspension mit 2ml Wachstumsmedium. Die Zellen wurden mit Hilfe des *Countess™ Cell Counter* wie oben beschrieben gezählt. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Aufnahme der Zellen in das Einfriermedium mit einer Konzentration von 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml und die anschließende Verteilung auf die Kryoröhrchen mit 10<sup>6</sup> Zellen/ Röhrchen. Die Röhrchen wurden in einen *Mr. Frosty™* Behälter gestellt und bei -80°C bis zu vier Monate gelagert. Bei längerem Vorhalten der Zelle erfolgte die Umlagerung in flüssigen Stickstoff.

#### *Kultivierung und Passagierung*

Kryokonservierte Stammzellen wurden zum Auftauen für eine Minute in ein Wasserbad bei 37°C gestellt und anschließend mit 1ml vorgewärmtem Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Überführung in 15ml Wachstumsmedium und die erneute Resuspension. Die Zellen wurden bei 300g für 5 Minuten bei 21°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde erneut mit 2ml Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde wie oben beschrieben mit Hilfe des *Countess™ Cell Counters* ermittelt. Die Zellen wurden anschließend mit einer Dichte von 2000-3000/cm<sup>2</sup> ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei T75 Kulturflaschen wurden 15ml Medium verwendet, bei T150 Flaschen 30ml. Das Wachstumsmedium der MSC wurde alle drei bis vier Tage oder bei sichtbarem Farbumschlag des Mediums gewechselt. Dazu wurde das alte Medium zuerst abgesaugt und die Kulturflasche zweimalig mit 10ml vorgewärmten PBS gespült. Daraufhin erfolgte die erneute

Zugabe von frischem, vorgewärmten Wachstumsmedium. Die Konfluenz der MSC wurde regelmäßig mikroskopisch überprüft. Bei einer Konfluenz von 80-90% wurden die MSC passagiert. Dazu wurde das Wachstumsmedium entfernt und die Flasche zweimalig mit PBS gespült (T75: 6ml; T150: 10ml). Wie oben beschrieben erfolgte dann die Trypsinierung der Zellen und die Resuspension mit PBS. Daran schloss sich die Zentrifugation bei 300g und 21°C für 5 Minuten an. Der Überstand wurde entfernt und weitere 6ml vorgewärmtes PBS hinzugegeben. Nach erneuter Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet mit 2ml Wachstumsmedium resuspendiert. Es erfolgte die wie oben beschrieben erneut die Bestimmung der Zellkonzentration mittels Trypanblaufärbung und *Countess Cell Counter*. Anschließend wurden die Zellen ausgesät (pro T75-Zellkulturflasche  $10^5$  Zellen; pro T150-Zellkulturflasche  $2 \times 10^5$  Zellen) und in den Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### *Plasmide*

Die nachfolgende Beschreibung ist eine Darstellung der Plasmide, die von meiner Kollegin Justina Rasińska für die Transfektion verwendet wurden (siehe Anteilserklärung). Zwei Plasmide wurden eingebracht, um die benötigte Information an die MSC weiterzugeben. Auf dem ersten Plasmid wurde das hyperaktive Transposon Sleeping beauty (155) mit dem CMV Enhancer und dem T7 Promoter kombiniert. Zur besseren Stabilität wurde eine SV40-Polyadenylierungssequenz an das SB100X Gen angehängt. Auf dem zweiten Plasmid wurde der EF-1a core promoter mit dem entsprechenden EF-1a Intron kombiniert, um die Expression der Isoform 1 des humanen GDNF-Gens zu erhöhen. Zudem wurde ein bGH-Polyadenylierungssignal angehängt. Für die spätere Selektierung der Zellen wurde auf dem gleichen Plasmid der SV40 Promotor mit einem Gen zur Puromycinresistenz und einem SV40-Polyadenylierungssignal eingesetzt. Der SB Transposon Vektor mit GDNF und dem Puromycinresistenzgen wurde mit dem SB Transposase Vektor im Verhältnis 9:1 gemixt. Das pCMV(CAT)T7-SB100 Plasmid wurde von Zsuzsanne Izsak zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid #34879; <http://n2t.net/addgene:34879>; RRID:Addgene\_34879) Für eine detailliertere Darstellung siehe (156).

### *Transfektion der Stammzellen*

Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation mit Hilfe des *Amaxa® Nucleofactor™ 2b Device* und des *Human MSC Nucleofactor®* Kits in Passage 4 der Zellkultur. Die MSC wurden wie oben beschrieben trypsiniert und anschließend auf Viabilität und Zellzahl überprüft. Bei einer Konfluenz von 80-90% und einer Viabilität  $\geq 90\%$  konnte die Transfektion durchgeführt werden. Pro 1,5ml Mikroreaktionsgefäß wurden  $5 \times 10^5$  Zellen vorgelegt und anschließend bei 21°C und 300g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und es erfolgte die Resuspension

mit 100µl *Human MSC Nucleofactor Solution*. Für jedes Sample wurden 4µg DNS hinzugegeben und die Probe wurde in eine Küvette überführt. Am *Amaxa® Nucleofactor™ 2b Device* wurde das Programm C17 (hohe Überlebensrate) eingestellt. Nach Beendigung des Programms wurde die Suspension in eine 6-Well-Platte überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden nach zwei Stunden auf ihre Viabilität überprüft. Drei Tage nach der Transfektion erfolgte die Selektion mittels Puromycin (1,5µg/ml) für eine Woche und im Anschluss für einige Tage die Kultivierung im normalen Wachstumsmedium unter den oben genannten Bedingungen. Das Selektionsmedium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Als Positivkontrolle diente GFP-DNS, als Negativkontrollen die MSC gemischt mit DNS und *Nucleofactor Solution* jedoch ohne Programmwahl und die Zellen mit *Nucleofactor Solution* und Programmwahl, jedoch ohne DNS-Zugabe. Die transfizierten Zellen wurden bis Passage sieben weiter kultiviert.

### 5.2.2. In vivo Experimente

#### *Versuchsdesign*

82 männliche erwachsene Wistar Ratten aus der Tierzucht ENVIGO (Rossdorf), die bei Versuchsbeginn 220-240g wogen, wurden in Gruppen unter Standard Lebensbedingungen in einer pathogenfreien, temperatur- und luftfeuchtigkeitskontrollierten Umgebung mit einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 h gehalten. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Essen und wurden in Typ IV Käfigen mit Plastikröhren und Material zum Nestbau und Knabbern untergebracht. Die Tiere wurden in 4 Gruppen eingeteilt und erhielten je nach Gruppe Injektionen von Stammzellen oder NaCl in das linke Striatum. Es wurden naive mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (nASC) verwendet oder transfizierte MSC, die durch das Einführen eines Plasmides mittels Elektroporation den Botenstoff GDNF vermehrt exprimieren (GDNF-ASC).

Alle Gruppen erhielten nach der Transplantation bzw. Scheintransplantation eine Läsion im linken Striatum durch 2 Injektionen von 6-OHDA. Eine Kontrollgruppe erhielt sowohl eine Scheintransplantation als auch eine Scheinläsion mit NaCl. Die Gruppen nASC + 6-OHDA und GDNF-ASC+6-OHDA wurden als Test- und die Gruppen NaCl + 6-OHDA und NaCl + NaCl als Kontrollgruppen definiert. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten getötet und das Hirngewebe anschließend untersucht. Die Tötung der Tiere erfolgte nach 4 Tagen, 28 Tagen oder 6 Monaten. Hieraus ergeben sich die in Tabelle 7 eingeteilten Gruppen. Ein Tierversuchsantrag wurde zuvor von der zuständigen lokalen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) genehmigt (Tierversuchsantrag G0073/16). Alle Experimente wurden gemäß der Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (2010/63/EU) durchgeführt.

**Tabelle 7: Einteilung der Gruppen nach Injektion**

	4 Tage	28 Tage	6 Monate
NaCl + NaCl	n= 7	n= 7	n= 7
NaCl + 6-OHDA	n= 7	n= 7	n= 7
nASC + 6-OHDA	n= 7	n= 7	n= 7
GDNF-ASC + 6-OHDA	n= 6	n= 6	n=7

*NaCl= Natriumchlorid, 6-OHDA= 6-Hydroxydopamin, nASC= naive mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe/ adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, GDNF-ASC= transfizierte adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*

#### *Tiere und Operation*

Die Tiere konnten sich eine Woche vor OP-Termin an die neue Umgebung im Tierstall gewöhnen. Die Transplantation der MSC erfolgte in Passage 7. Die MSC wurden wie oben beschrieben trypsinisiert und gewaschen. Es erfolgte die Ermittlung der Konzentration mittels *Countess Cell Counter* und die anschließende Verdünnung auf eine finale Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen in 5  $\mu$ l NaCl.

Die Tiere wurden mit Isofluran 2 - 3,5 % in O<sub>2</sub> anästhesiert und in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt. Als Analgetikum kam Meloxicam 2 mg/ kg KGW s.c. zum Einsatz. Es wurde auf ausreichenden Augenschutz und Wärmeerhalt während der Narkose geachtet. Nach Erlöschen der Reflexe wurde die Haut rasiert, desinfiziert und mittels Einmalskalpell eröffnet und die Schädelkalotte präpariert. Die Transplantationsstelle wurde nach Paxinos und Watson (157) von Bregma ausgehend festgelegt und befand sich in anterior-posteriorer Ausrichtung bei +1 mm und in medio-lateraler Ausrichtung bei +3 mm. Dies entspricht der linken Hemisphäre der Ratte. Hier wurde die Schädelkalotte mittels Zahnbohrer unter kontinuierlicher Spülung mit einer physiologischen Kochsalzlösung eröffnet. Von der Dura Mater aus wurde die 22G Hamilton-Kanüle in dorso-ventraler Ausrichtung auf +5,8 mm eingestellt. An dieser Stelle wurden 2,5  $\mu$ l der Zellsuspension ( $\cong 1,5 \times 10^5$  Zellen) transplantiert beziehungsweise 2,5  $\mu$ l NaCl 0,9% injiziert. Eine Minute nach der ersten Injektion wurde die Kanüle in dorso-ventraler Richtung auf +4,4 mm eingestellt und erneut 2,5  $\mu$ l der entsprechenden Lösung injiziert. Nach einer weiteren Minute wurde die Kanüle entfernt und gespült. 5 Minuten nach der Transplantation der Stammzellen wurde eine 26G Hamilton-Kanüle von der Dura Mater auf +5 mm in dorso-ventraler Ausrichtung eingestellt und es wurden zweimal 1  $\mu$ l 6-OHDA mit einer Konzentration von 3,25  $\mu$ g/ $\mu$ l NaCl oder je 1  $\mu$ l NaCl 0,9% im Abstand von einer Minute injiziert (6,5  $\mu$ g 6-OHDA gelöst in 2  $\mu$ l 0,9%

NaCl-Lösung mit 0,1% Ascorbinsäure). Die Spritze wurde für eine Minute belassen und anschließend entfernt. Es erfolgte die Hautnaht mit Einzelknopfnähten. Die Tiere erhielten daraufhin BrdU 50 mg/ kg Körpergewicht i.p. und wurden bis zum Aufwachen gewärmt und unter Beobachtung gehalten. Im Anschluss an die Operation erhielten die Tiere für zwei Tage Meloxicam 2 mg/ kg KGW s.c. und BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) 50 mg/ kg KGW i.p. Während des Versuchszeitraums wurden die Tiere täglich untersucht und in regelmäßigen Abständen gewogen.

#### *Zylindertest*

Die Tiere durchliefen eine motorische Testung mittels Zylindertest. Zeitpunkte hierfür waren 4 Tage, 28 Tage, 2 Monate oder 6 Monate postoperativ. Die Testung erfolgte in der aktiven Dunkelphase der Tiere. Die Tiere wurden dazu in einen Glaszylinder (Durchmesser 25cm, Höhe 30cm) gesetzt und es wurde die Anzahl der Wandberührungen mit beiden Pfoten gezählt. Der Versuch wurde bei über 20 Berührungen mit der rechten Pfote beendet. Die Ergebnisse dieser Verhaltenstests sollen nicht Bestandteil dieser Arbeit sein und werden an anderer Stelle ausgewertet (156).

#### *Perfusion*

Die Perfusion erfolgte unmittelbar nach Durchführung des letzten Zylindertests der jeweiligen Gruppe. Die Tiere wurden mit 5% Isofluran anästhesiert und erhielten Xylazin 10 mg/kg Körpergewicht und Ketamin 80mg/kg Körpergewicht i.p. Nach Aussetzung der Atmung wurden die Reflexe getestet. Nach Eintreten der Areflexie wurden Thorax und Abdomen eröffnet und das Herz präpariert. Im Anschluss wurden 250 ml eiskaltes PBS und anschließend 250ml Paraformaldehyd (PFA) 4% in PBS über eine Kanüle im linken Ventrikel perfundiert. Daraufhin erfolgten die Präparation und Entnahme des Hirns. Dieses wurde zuerst für 2h in PFA 4% und danach für weitere 48h in 30%ige Saccharoselösung bei 4°C gelagert.

### **5.2.3. Histologie**

#### *Fixierung der Hirnproben*

Nach der Lagerung in 30%iger Saccharoselösung wurden die Hirne in einen Zylinder mit 2-Methylbutan überführt und in flüssigem Stickstoff für 50s tiefgefroren. Es wurde darauf geachtet die Temperatur während dieser Zeit bei ca. -70°C zu halten. Daraufhin wurden die Hirne im Kühlschrank bis zum Schneiden des Gewebes bei -80°C eingelagert. Der Schnitt der Hirne erfolgte an einem Leica CM1850 UV-Kryostat. Die Temperatur wurde vorab auf -20°C bis -18°C eingestellt. Es wurden koronare Schnitte mit einer Schnittdicke von 40µm angefertigt. Während

des Schneidens wurde im Bereich des kontralateral zur Läsion gelegenen Cortex eine Markierung mittels 22G Kanüle gesetzt, um die Seiten später eindeutig identifizieren zu können. Schnitte wurden ab dem Beginn des Striatum bis nach dem Verschwinden der Substantia nigra in einem 24 Well Plate mit CPS gesammelt. Bis zur weiteren Verwendung der Schnitte wurden die Platten bei +2 bis +6°C gelagert.

#### *Immunhistochemie*

Die Färbung der Schnitte erfolgte als freischwimmende Gewebsschnitte (*free floating sections*). Die Striatumschnitte wurden aus zwei Wells in einem 12-Well Intervall ( $\Delta d=480\mu\text{m}$ ) herausgesucht und in PBS überführt. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS. Nach dem Waschen wurden die Schnitte je 30 Minuten mit 0,6%igen  $\text{H}_2\text{O}_2$  und anschließend PBS+ (Zusammensetzung s.o.) vorbehandelt und mit dem primären Antikörper gelöst in PBS+ über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen und 25 Minuten mit PBS+ vorbehandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper in PBS+ für 2h. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von PBS mit dem ABC-Kit (je 9 $\mu\text{g}$  Lösung A und B pro ml PBS). Es erfolgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS. Als Chromogen kam Diaminobenzidin zum Einsatz (9,432 ml destilliertes Wasser mit 55  $\mu\text{l}$  DAB, 500  $\mu\text{l}$  Tris-Puffer, 100 $\mu\text{l}$  TitronX 10%ig, 3  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 10  $\mu\text{l}$   $\text{NiCl}_2$ ). Diese Lösung wurde für einige Minuten bis zu einem sichtbaren Farbumschlag auf die Schnitte gegeben und anschließend dreimal mit PBS ausgewaschen. Exemplarisch erfolgte die Kofärbung einiger Tiere mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 1:1000 im letzten Waschschrift. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte das Eindeckeln der Objektträger mit *ProTaq*s® *Paramount*.

#### *Stereologische Untersuchungen*

Die Iba1-DAB gefärbten Schnitte wurden mit Hilfe von stereologischen Methoden ausgewertet. Die Untersuchung erfolgte an einem Leica DMRE Mikroskop verbunden mit einer Retiga-2000R Kamera. Die Zählung erfolgte verblindet durch einen Untersucher, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das Wissen um die entsprechende Gruppe zu vermeiden. Bei jedem Tier wurden die beiden aufeinanderfolgenden Schnitte ausgewählt, auf denen am deutlichsten die Läsionsstelle zu erkennen war. Als *Region of interest* (ROI) wurde das Striatum definiert. Dafür wurden mit einem 2,5x Objektiv die anatomischen Begrenzungen als Grenzen gewählt. Es wurde sowohl das ipsilateral zur Läsion gelegene als auch das kontralaterale Striatum gezählt. Ein Raster von einer Kantenlänge von  $x=272\mu\text{m}$  und  $y=373\mu\text{m}$  wurde über die ROI gelegt. Die Kantenlänge des Zählrahmens betrug  $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ . Für die Zählung wurde ein 20x Objektiv verwendet. Es wurden nur Zellen gezählt, die eindeutig als solche zu erkennen waren. Die Gesamtpopulation der

Iba1 positiven Zellen und der *2nd estimated coefficient of error* (CE) nach Schmitz-Hof (158) wurde mit Hilfe der Stereo Investigator Software kalkuliert.

#### **5.2.4. Statistische Analyse**

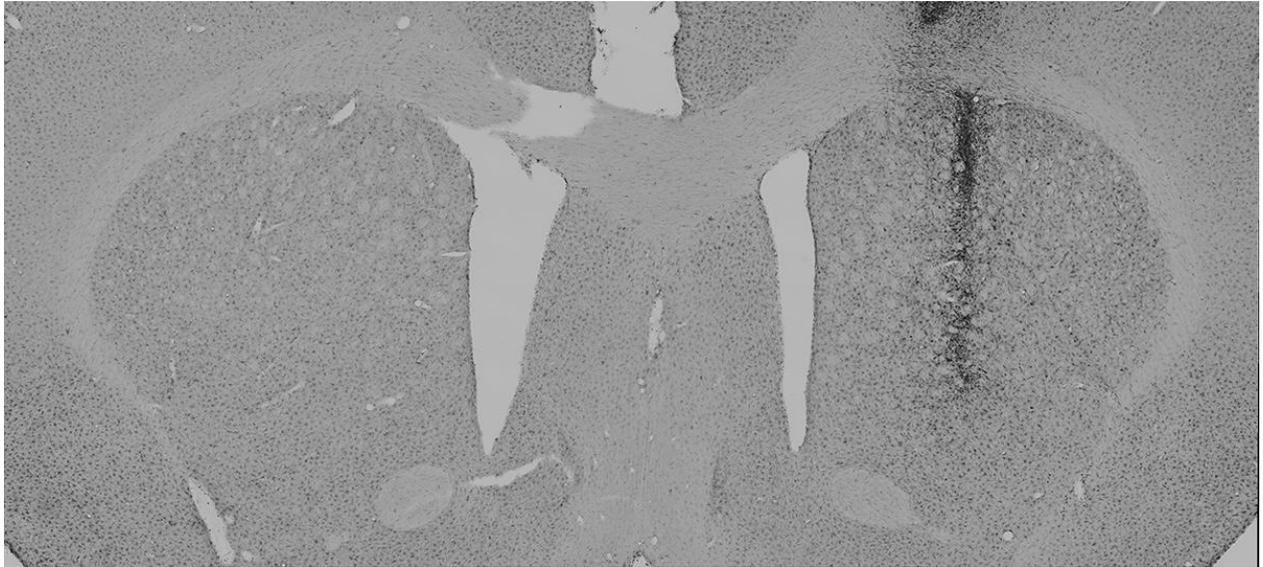
Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistik Software Programm SPSS 25 durchgeführt. Die Läsionsseite wurde als ipsilaterale Seite definiert. Es erfolgte die Bildung eines Quotienten aus den ermittelten Zellzahlen von ipsi- zu kontralateraler Seite. Die gebildeten Verhältnisse wurden daraufhin statistisch untersucht mittels zweifaktoriellen Varianzanalyse untersucht. Um die Normalverteilung der Residuen zu überprüfen wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Bei annähernd gleichen Gruppengrößen wurde von einer Gleichheit der Varianzen ausgegangen. Bei Vorliegen eines Effektes wurde ein Tukey post-hoc-Test durchgeführt. Um genauere Aussagen über die Unterschiede der einzelnen Gruppen im zeitlichen Verlauf treffen zu können wurde der Datensatz anschließend nach Gruppen und Zeitpunkten sortiert und es wurde jeweils eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  gewählt. Die folgenden Ergebnisse sind als explorativ und nicht als konfirmatorisch anzusehen und wurden daher nicht für multiples Testen adjustiert. Die graphische Darstellung erfolgte mit Graphpad Prism 9.

#### **5.2.5. Literaturrecherche**

Um einen Überblick über bereits durchgeführte Studien zur Wirkung von GDNF auf Mikroglia zu erhalten, wurde über die Suchdatenbank PubMed nach Artikeln gesucht, die die Begriffe „Mikroglia“ + „GDNF“ enthalten. Anschließend wurden anhand der Abstracts alle Studien ausgewählt, die die Wirkung von GDNF auf Mikroglia untersuchten. Die in den Volltexten dargestellten Ergebnisse gingen in die Diskussion dieser Arbeit ein. Es wurden alle Studien berücksichtigt, die bis zum 24.01.2021 über PubMed zu finden waren.

## 6. Ergebnisse

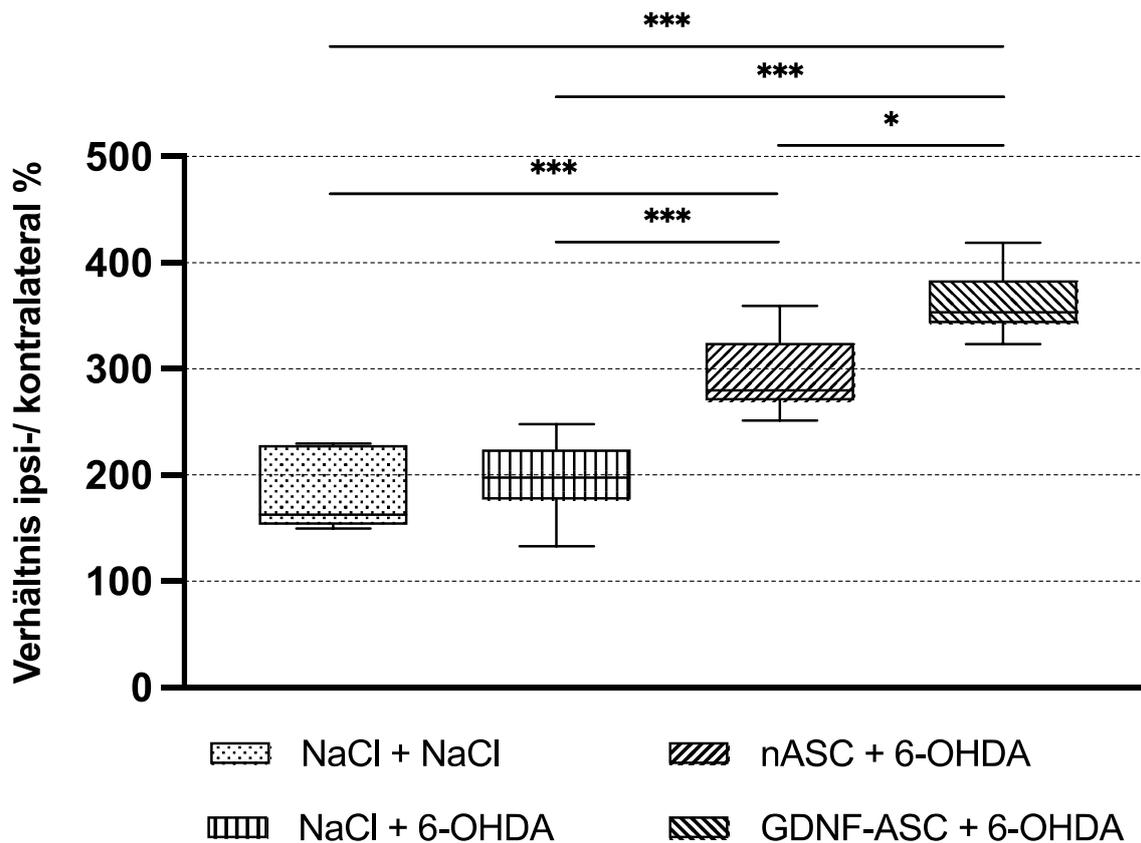
### 6.1. Verteilung der Mikroglia



**Abbildung 5: Beispielbild eines 4-Tagestieres der NaCl + NaCl Gruppe.**

*Iba1-DAB Färbung des Striatum. Die Injektionsstelle ist eindeutig erkennbar. Auf der kontralateralen Seite findet sich aufgrund des lokalen Wirkmechanismus von 6-OHDA (6-Hydroxydopamin) keine Veränderung. Diese Seite kann also für die Auswertung als gesunde Hemisphäre und damit als Referenz betrachtet werden. Iba1 = Ionized calcium binding adaptor molecule 1, DAB = Diaminobenzidin,*

Die Auszählung der Mikroglia im Striatum erfolgte nach gängigen stereotaktischen Prinzipien. Der *2nd estimated CE* nach Schmitz-Hof war bei allen ausgezählten Schnitten unter 0,05 und es kann daher davon ausgegangen werden, dass die errechneten Zellpopulationen näherungsweise der realen Zellpopulation entsprechen (158). Da die Operation mit Läsion und Transplantation jeweils nur im linken Striatum durchgeführt wurde, kann die rechte Hälfte des Gehirns als naiv betrachtet werden und wird hier als Referenz für die physiologische Anzahl der Mikroglia im Striatum herangezogen (siehe Abbildung 5). Durch die Bildung eines Verhältnisses zwischen der ipsi- und kontralateralen Seite wurde der unterschiedlichen Größe der Tiere aufgrund des unterschiedlichen Alters Rechnung getragen und die Zahl der Mikroglia in der betroffenen Hirnhälfte in Bezug gesetzt zur physiologischen Anzahl der Mikroglia in der naiven Hemisphäre. Die gebildeten Verhältnisse wurden anschließend mittels Varianzanalyse miteinander verglichen. Sowohl die Zeit als auch die Behandlungsgruppe und die Interaktion dieser beiden Variablen hatten einen Einfluss auf die Menge der Iba1-positiven Zellen ( $p < 0,001$ ). Die post-hoc Analyse mittels Tukey Test zeigte einen Unterschied zwischen den gemittelten Werten zu den verschiedenen Zeitpunkten ( $p < 0,001$ ) und zwischen den Gruppen über alle Zeitpunkte ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 6: Relative Anzahl der Mikroglia im Striatum 4 Tage postoperativ**

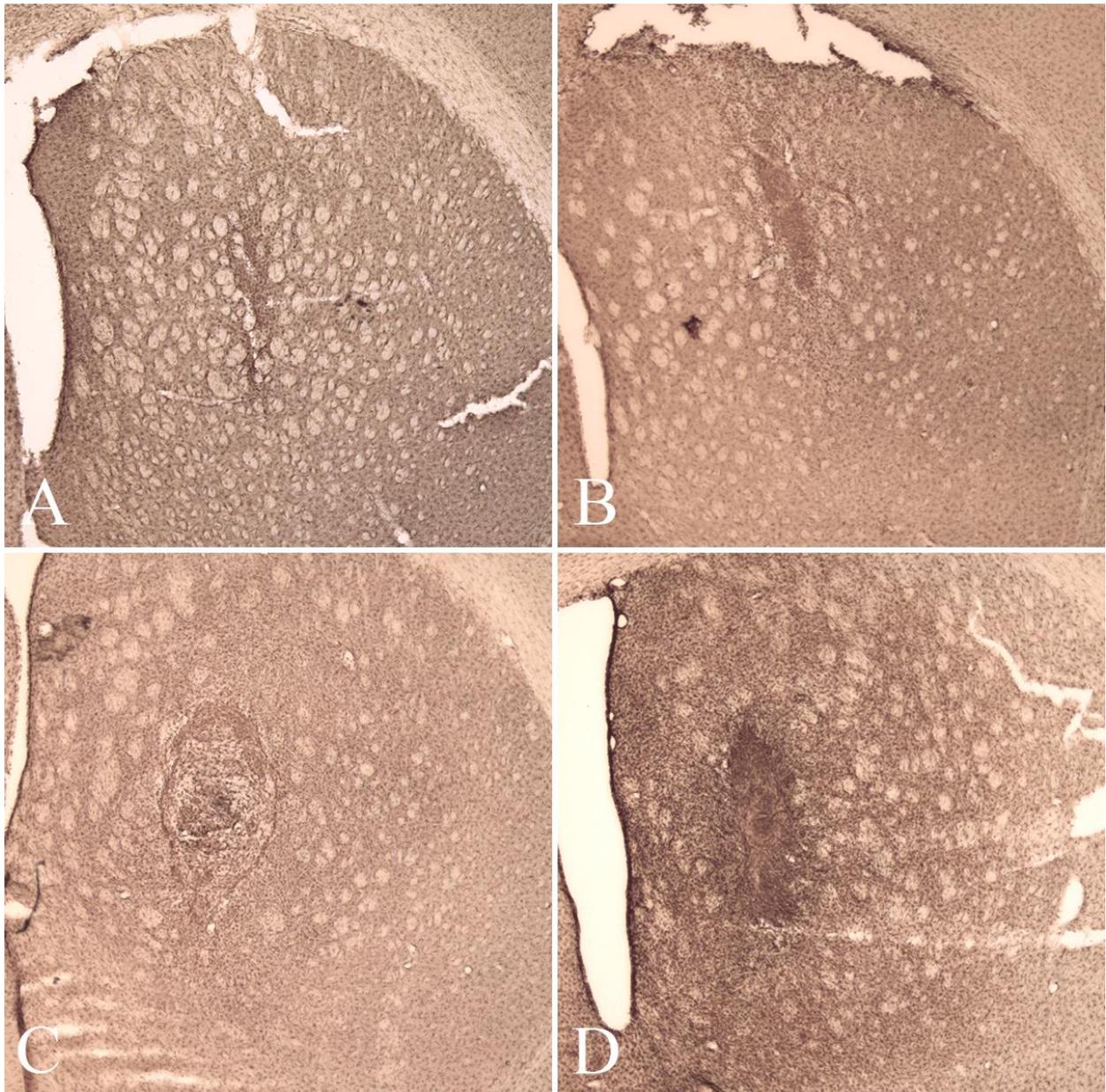
Darstellung als Boxplots mit Maximum und Minimum innerhalb der dargestellten Gruppen, univariate Varianzanalyse ( $p < 0,001$ ), post-hoc Test  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$

6-OHDA= 6-Hydroxydopamin, GDNF= glial cell-derived neurotrophic factor, NaCl= Natriumchlorid, nASC= naive mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe

Keinen Unterschied gab es jedoch zwischen den beiden Kontrollgruppen ( $p=0,635$ ). Für die weitere Aufschlüsselung der Interaktion zwischen Zeitpunkt und Gruppenzugehörigkeit und für den differenzierten Vergleich der Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde der Datensatz jeweils nach Zeitpunkt und Gruppe aufgeteilt und mittels einfaktorieller Varianzanalyse untersucht.

Hier zeigte sich, dass das Verhältnis der Mikroglia über die Zeit in fast allen Gruppen kontinuierlich abnahm. Diese Abnahme war bei den Transplantationstieren (nASC und GDNF-ASC) am deutlichsten ausgeprägt und nach 4 Wochen (jeweils  $p < 0,001$ ) und nach 6 Monaten zu sehen (jeweils  $p < 0,001$ ). Bei den Scheinläsions- und Scheintransplantationstieren (NaCl + NaCl und NaCl + 6-OHDA) war nach 4 Wochen eine Reduktion der Mikroglia zu sehen (jeweils

$p < 0,01$ ), jedoch kam es bei beiden Gruppen zu keiner weiteren Reduktion nach 6 Monaten ( $p = 0,123$  und  $p = 0,356$  respektive). Die einfaktorielle ANOVA zeigte einen Unterschied zwischen

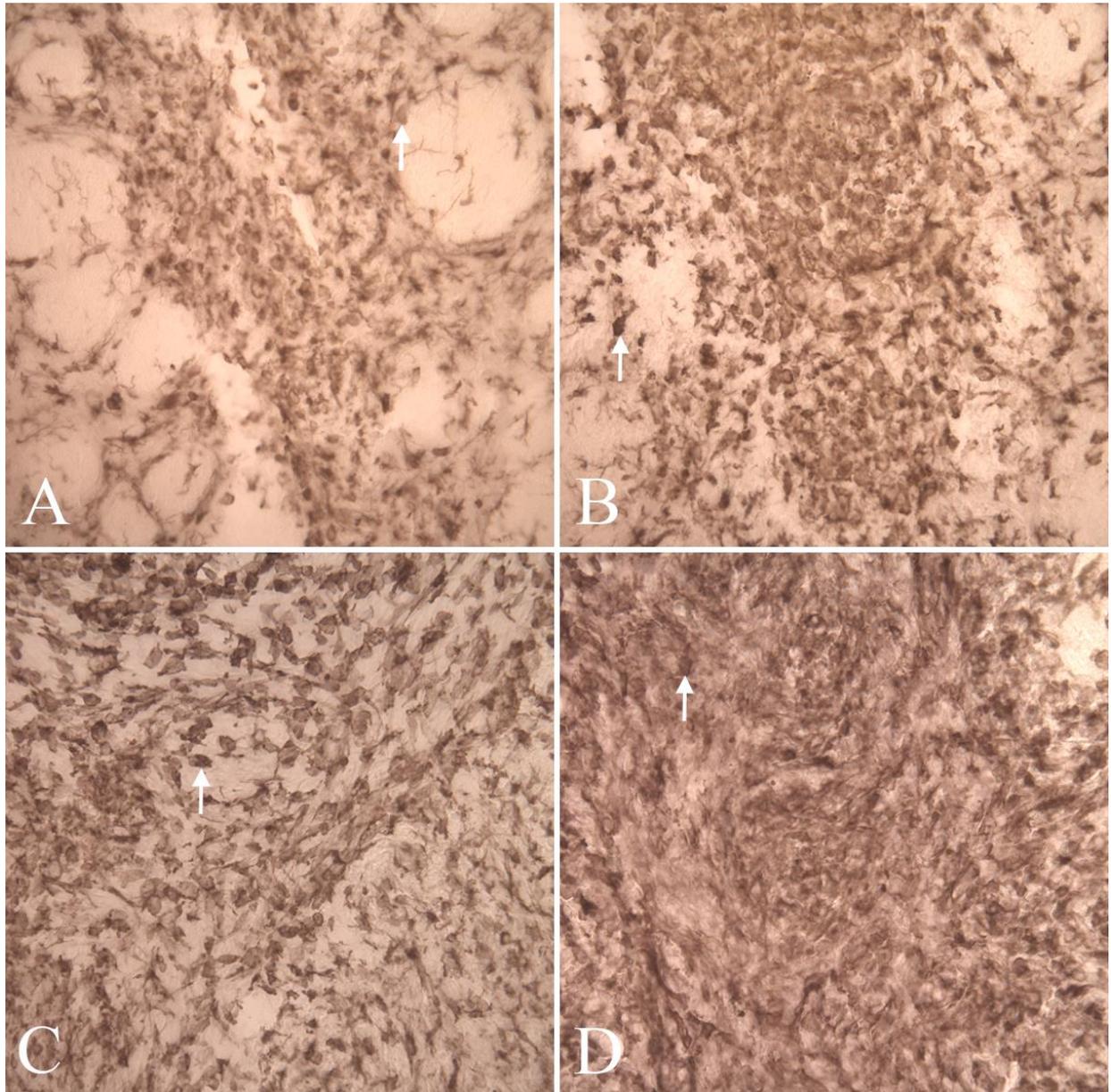


**Abbildung 7: Mikrogliabildung im Striatum 4 Tage postoperativ**

*Iba1-DAB Färbung 1:1000, 2,5x Vergrößerung. Dargestellt ist das ipsilaterale Striatum. Die Injektionsstelle ist deutlich erkennbar. (A) NaCl + NaCl Gruppe (B) NaCl + 6-OHDA Gruppe (C) nASC + 6-OHDA Gruppe (D) GDNF-ASC + 6-OHDA Gruppe.*

*Während sich die Ansammlung von Mikroglia bei den Kontrollgruppen (A + B) vornehmlich auf die Injektionsstelle begrenzt sind bei den Transplantationsgruppen (C + D) Mikroglia bis in die äußeren Anteile des Striatum zu sehen. Dies ist bei der GDNF-ASC Gruppe am deutlichsten. 6-OHDA= 6-Hydroxydopamin, DAB= Diaminobenzidin, GDNF= glial cell-derived neurotrophic factor, Iba1= Ionized calcium binding adaptor molecule 1, NaCl= Natriumchlorid, nASC= naive mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe,*

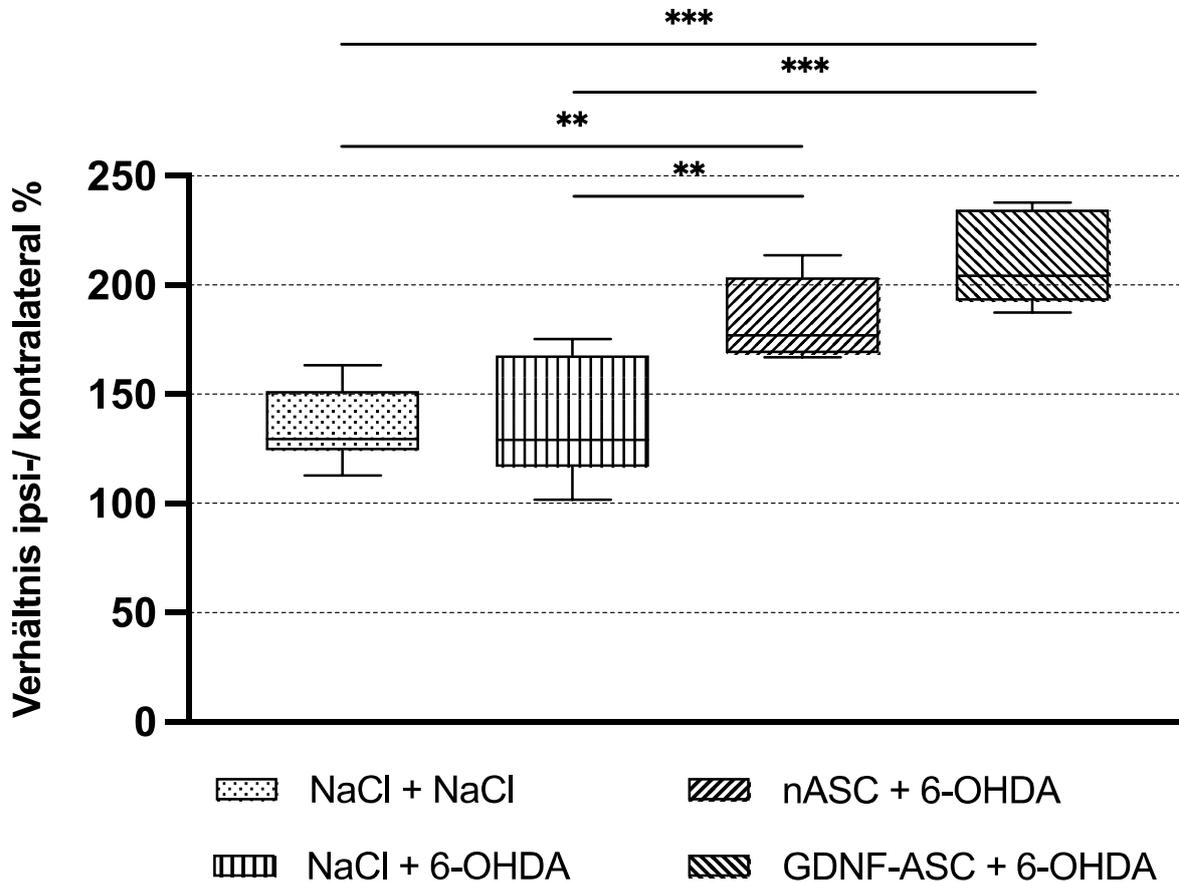
den Gruppen 4 Tage postoperativ ( $p < 0,001$ ). Bei der Gruppe, die GDNF-ASC erhielt war die Anzahl der Mikroglia mit 361,8% am höchsten und unterschied sich deutlich von allen anderen



**Abbildung 8: Morphologie der Mikroglia im Striatum 4 Tage postoperativ**

*Iba1-DAB Färbung 1:1000, 20x Vergrößerung. Dargestellt ist das ipsilaterale Striatum. Die Injektionsstelle ist deutlich erkennbar. Aktivierte Mikroglia (beispielsweise mit Pfeil gekennzeichnet), erkennbar durch einen abgerundeten Zellkörper mit weniger und kürzeren Zellfortsätzen, sind in den beiden Transplantationsgruppen (C + D) deutlich häufiger zu sehen. Zum Teil überlagerten sich die Zellen so stark, dass sie nicht eindeutig voneinander abgegrenzt werden konnten. (A) NaCl + NaCl Gruppe, (B) NaCl + 6-OHDA Gruppe, (C) nASC + 6-OHDA Gruppe, (D) GDNF-ASC + 6-OHDA Gruppe. 6-OHDA= 6-Hydroxydopamin, GDNF= glial cell-derived neurotrophic factor, Iba1= Ionized calcium binding adaptor molecule 1, DAB= Diaminobenzidin, NaCl= Natriumchlorid, nASC= naive mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe,*

Gruppen. Ebenso zeigten diejenigen Tiere, die eine Transplantation von nASC erhielten, eine erhöhte Anzahl von Mikroglia (295,2%) im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen. Zwischen den Tieren, die jeweils nur eine Scheintransplantation (181,2%) bzw. eine Scheintransplantation



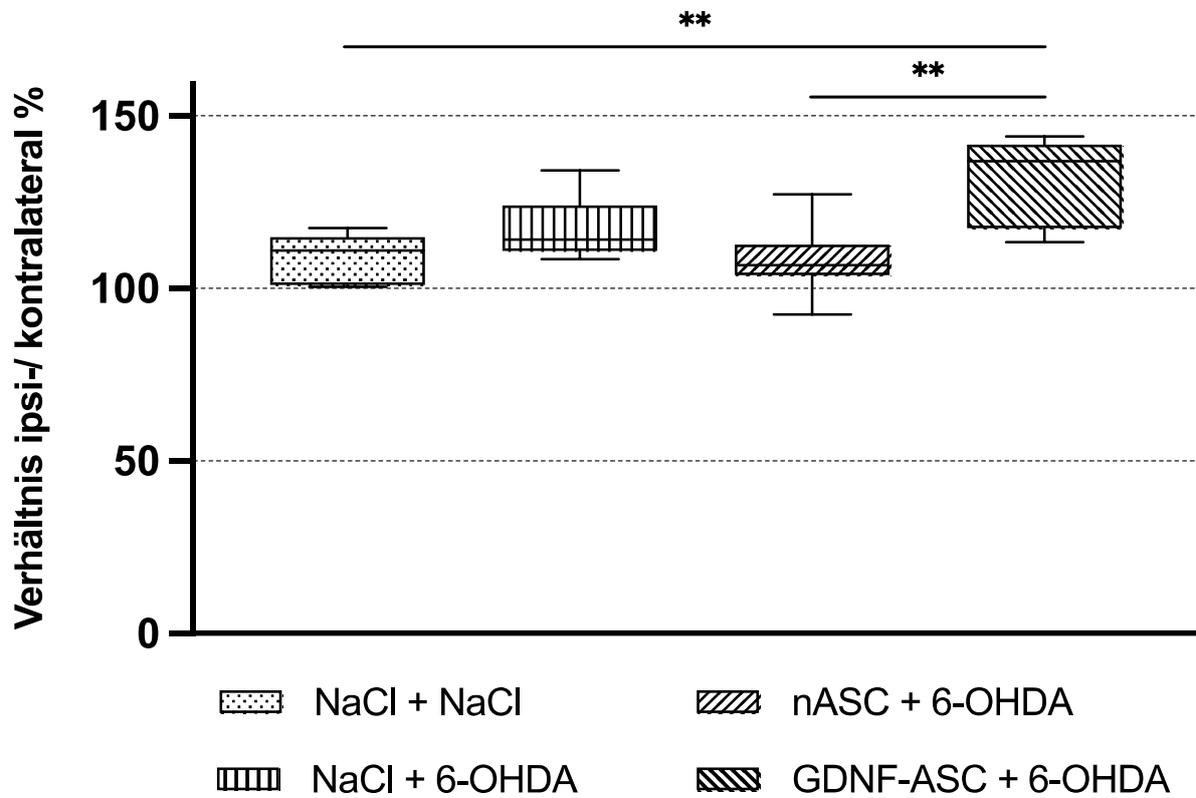
**Abbildung 9: Relative Anzahl der Mikroglia im Striatum 4 Wochen postoperativ**

Darstellung als Boxplots mit Maximum und Minimum innerhalb der dargestellten Gruppen, univariate Varianzanalyse ( $p < 0,001$ ), post-hoc Test  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$

6-OHDA= 6-Hydroxydopamin, GDNF= glial cell-derived neurotrophic factor, NaCl= Natriumchlorid, nASC= naive mesenchymale Stammzellen

und -läsion erhielten (197,2%), gab es keinen Unterschied ( $p=0,837$ ; siehe Abbildung 6). Auffällig war, dass sich die Verteilung der Mikroglia zwischen den Gruppen unterschied. Während bei den Kontrollgruppen nur im Bereich der Injektionsstelle vermehrt Mikroglia nachweisbar waren, so breiteten sich in den Transplantationsgruppen Mikroglia bis in die peripheren Anteile des Striatum aus (siehe Abbildung 7). Dies war bei der GDNF-ASC-Gruppe am ausgeprägtesten. Zudem waren bei den beiden Transplantationsgruppen mehr aktivierte Mikroglia, gekennzeichnet durch einen abgerundeten Zellkörper mit kürzeren Zellfortsätzen, zu sehen (siehe Abbildung 8). Diese zogen

sich ebenfalls bis in die Peripherie, während sich die aktivierten Mikroglia bei den Kontrollgruppen nur an der Injektionsstelle detektieren ließen.



**Abbildung 10: Relative Anzahl der Mikroglia im Striatum 6 Monate postoperativ**

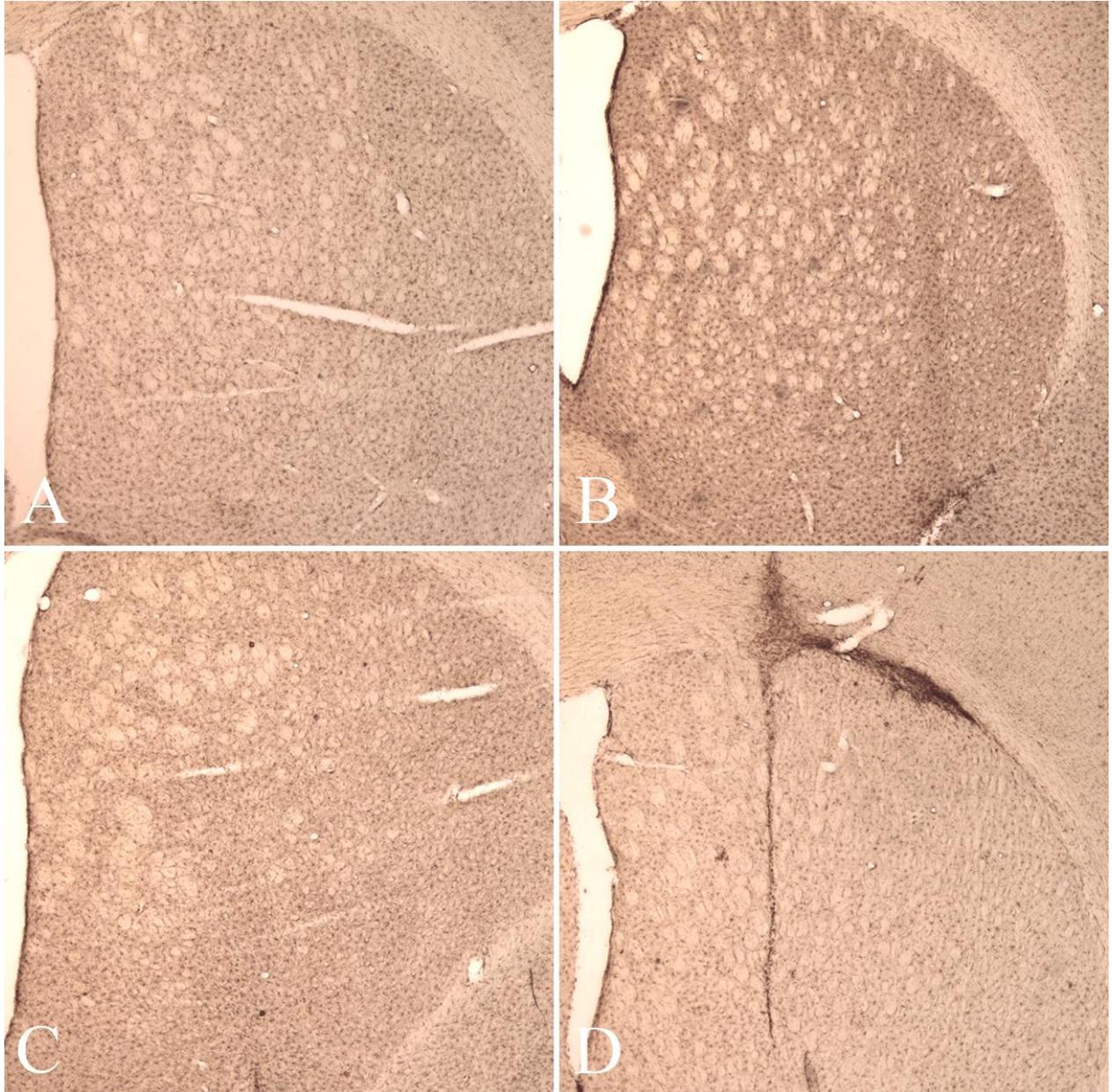
Darstellung als Boxplots mit Maximum und Minimum innerhalb der dargestellten Gruppen, univariate Varianzanalyse ( $p < 0,001$ ), post-hoc Test  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$

6-OHDA= 6-Hydroxydopamin, GDNF= glial cell-derived neurotrophic factor, NaCl= Natriumchlorid, nASC= naive mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe,

Nach vier Wochen waren in der GDNF-ASC-Gruppe ebenfalls die meisten Mikroglia nachweisbar (210,3%). Der Unterschied zur nASC-Gruppe mit 184,0% war jedoch nicht signifikant ( $p=0,153$ ). Die nASC-Gruppe wies mehr Mikroglia auf als die Scheinläsionsgruppe mit 135,4% und die Scheintransplantationsgruppe mit 138,5%. Zwischen den beiden Kontrollgruppen gab es, wie bereits nach 4 Tagen, keinen Unterschied in Hinblick auf die relative Anzahl der Mikroglia ( $p=0,993$ ; siehe auch Abbildung 9). Aktivierte Mikroglia waren in allen Gruppen weiterhin im Bereich der Einstichstelle nachweisbar. Diese waren bei den beiden Kontrollgruppen jedoch nur vereinzelt zu beobachten., während sich bei den beiden Transplantationsgruppen eine deutliche

Anreicherung fand. Diese konzentrierten sich jedoch größtenteils auf den Einstichkanal und waren in der Peripherie nur vereinzelt zu beobachten.

Nach sechs Monaten war nur noch ein Unterschied zwischen der GDNF-ASC-Gruppe mit 131,6% und der NaCl + NaCl Gruppe mit 109,8% und zwischen der GDNF-ASC- und der nASC-Gruppe



**Abbildung 11: ipsilaterales Striatum 6 Monate postoperativ**

*Iba1-DAB Färbung 1:1000, 2,5x Vergrößerung. Dargestellt ist das ipsilaterale Striatum. Die Injektionsstelle ist in der GDNF-ASC Gruppe (D) deutlich erkennbar. (A) NaCl + NaCl Gruppe (B) NaCl + 6-OHDA Gruppe (C) nASC+ 6-OHDA Gruppe (D) GDNF-ASC + 6-OHDA Gruppe.*

*6-OHDA= 6-Hydroxydopamin, Iba1= Ionized calcium binding adaptor molecule 1, DAB= Diaminobenzidin, GDNF= glial cell-derived neurotrophic factor, NaCl= Natriumchlorid, nASC= naive mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe,*

mit 108,0% zu sehen. Zwischen der GDNF-ASC Gruppe und der NaCl + 6-OHDA Gruppe (117,9%) bestand kein Unterschied ( $p=0,067$ ). Die Gruppe, die naive MSC erhielt, zeigte keinen Unterschied zu den beiden Kontrollgruppen (siehe Abbildung 10). Während bei den meisten Tieren die Injektionsstelle z.T. nicht mehr eindeutig erkennbar war, so zeigte sich bei der Testgruppe immer noch eine deutliche Reaktion (siehe Abbildung 11). Dies war bei der GDNF-ASC-Gruppe am ausgeprägtesten, jedoch auch bei einzelnen Tieren der nASC Gruppe zu sehen. In diesem Bereich waren auch nach sechs Monaten noch aktivierte Mikroglia zu sehen. Im übrigen Striatum war dies nicht der Fall.

## 7. Diskussion

### 7.1. Mikrogliaantwort

Um den Einfluss der GDNF-sekretierenden ASC auf die Mikroglia im Striatum der Versuchstiere zu zeigen wurde, eine Iba1-Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Eine initiale Immunantwort wurde in allen Gruppen beobachtet, nahm jedoch im Verlauf ab. Der intrakranielle Eingriff führt zur Freisetzung von DAMPs wie HMGB1, ATP, Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, mitochondrialer DNS und Hitzeschockproteinen, die zu einer Rekrutierung und Aktivierung von proinflammatorischen Mikroglia im Hirnparenchym führen (107-111, 159). Wider Erwarten gab es zu keinem Zeitpunkt in Bezug auf die Mikroglia einen Unterschied zwischen der Scheinläsionsgruppe und der Gruppe, die 6-OHDA erhielt. Erwartungsgemäß führt der Untergang von Neuronen durch 6-OHDA zu einer stärker ausgeprägten Immunantwort als die Injektion von NaCl. Dies konnte bereits bei anderen (160) oder ähnlichen Applikationsprotokollen (161) gezeigt werden. Dies könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass die in dieser Studie verwendete Dosis oder das Applikationsprotokoll zu keiner ausreichenden Toxizität bei dopaminergen Neuronen führten (156). Die kontinuierliche Abnahme der Mikroglia bei den Kontrollgruppen im Verlauf erscheint logisch, da es nach der akuten Reaktion nach Gewebstrauma zu einem Abbau der abgestorbenen Zellen und zur Regeneration des Gewebes kommt.

ASC werden weitestgehend als immunprivilegiert oder sogar immunsuppressiv angesehen. Nach 4 Tagen und nach 4 Wochen war bei den Tieren, die nASC erhielten, jedoch eine erhöhte Anzahl an Mikroglia an der Transplantationsstelle im Vergleich zu den Scheintransplantationsgruppen zu sehen. Dies bestätigt vorangegangene Publikationen, die im 6-OHDA Modell der Ratte eine erhöhte Anzahl an Mikroglia nach Transplantation von ASC beobachten konnten (53, 55). Zudem kam es bei Rhesusaffen nach allogener Stammzelltransplantation in das Striatum zu einer Vermehrung der T-, B- und NK-Zellen im Blut (61, 62). Ein Molekül das für die vermehrte Ansammlung der Mikroglia verantwortlich sein könnte, ist monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), das chemotaktische Eigenschaften für Mikroglia gezeigt hat (162) und von ASC exprimiert wird (163). Allerdings wirkt MCP-1 auf Mikroglia zwar chemotaktisch, führt jedoch zu keiner Aktivierung (162). Da bei den Tieren, die ASC erhielten, vermehrt aktivierte Mikroglia im Bereich der Transplantationsstelle zu sehen waren, scheint MCP-1 nicht allein für die beobachteten Effekte verantwortlich zu sein.

Zudem können ASC auch vermehrt IL-6 bilden (163, 164), das zu einer Aktivierung von Mikroglia mit neurotoxischen Folgen führen kann (165). Eine Aktivierung von TLR4 scheint dabei für die proinflammatorischen Eigenschaften der MSC verantwortlich zu sein (166). Da MSC sowohl pro-

als auch antiinflammatorische Effekte haben können, hängt ihre effektive Wirkung zu einem großen Teil von der lokalen Umgebung ab, in der sie sich befinden (60, 167). Die zeitgleiche Transplantation mit der 6-OHDA-Läsion könnte daher verantwortlich sein für die vermehrte Aktivierung der Mikroglia, da in einer anderen Studie bei zeitlich versetzter Transplantation eine Reduktion von Mikroglia beobachtet werden konnte (168). Zusätzlich ist es denkbar, dass in einem xenogenen Transplantationsrahmen die immunsuppressiven Eigenschaften der MSC nicht vollständig zum Tragen kommen, auch wenn es in einem allogenen Setting eher zu einer antiinflammatorischen Reaktion kommen würde (169). Interessanterweise normalisierte sich der Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und der nASC-Gruppe und war nach 6 Monaten nicht mehr nachweisbar. Bereits einige Tage nach der intrastriatalen Transplantation kommt es zum Absterben eines großen Teils der MSC und zur Abwanderung in andere Bereiche (170, 171). Dies erklärt auch die kontinuierliche Abnahme der Mikroglia bei den Transplantationsgruppen im Verlauf. Jedoch sind auch 6 Monaten nach der Operation noch vereinzelt ASC an der Transplantationsstelle nachweisbar und es liegt daher die Vermutung nahe, dass der immunsuppressive Effekt der MSC erst verzögert zum Tragen kommt (156). Übereinstimmend damit war auch die systemische inflammatorische Reaktion in der Studie von Isakova et al. bei Rhesusaffen nur kurzfristig und nach 6 Monaten nicht mehr nachweisbar (62). Zudem konnte im 6-OHDA Modell der Ratte gezeigt werden, dass es 6 Monate nach Transplantation der MSC zur vermehrten Bildung der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 kommt (52) und in einer anderen Studie konnte die Transplantation von ASC die Anzahl an aktivierten Mikroglia im LPS-Modell nach sechs Monaten verringern (147). Erklärt werden könnte dieser Effekt über einen negativen Feedbackmechanismus der ASC, die unter in vitro Bedingungen vermehrt immunsuppressive Eigenschaften nach proinflammatorischen Stimuli zeigten (167, 172). Dieser inhibierende Effekt auf Mikroglia ist möglicherweise über CX3CL1 vermittelt (173). Die hier durchgeführten Experimente zeigen ähnliche Ergebnisse. Zwar konnte nach 6 Monaten keine Reduktion der Mikroglia im Vergleich zur 6-OHDA Gruppe gezeigt werden, allerdings bestand auch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen der Scheinläsionsgruppe und der 6-OHDA Gruppe.

Es ist also denkbar, dass MSC unter bestimmten Umständen das proinflammatorische Milieu des Parkinson-Syndroms durch ihre Immunogenität weiter unterhalten. Eine zusätzliche Modifikation von MSC, um die antiinflammatorischen Eigenschaften zu steigern, erscheint daher sinnvoll. GDNF wurde als Möglichkeit gesehen diese antiinflammatorischen Eigenschaften zu verbessern und die kurzfristige Immunreaktion abzuschwächen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die

autokrine Sekretion von GDNF durch ASC ihr Überleben steigern konnte (154), was eventuell auch eine verringerte Aktivierung von Mikroglia nach sich ziehen könnte.

## 7.2. GDNF-Wirkung auf Mikroglia

Die Transplantation von BM-MSCs, die vermehrt GDNF exprimieren, konnte die Rekrutierung von Mikroglia im Rattenmodell reduzieren, wenn sie in ein Gel aus Kollagen eingebracht wurden (153), nicht jedoch wenn sie ohne Gel transplantiert wurden (152). Da ASC im Vergleich zu BM-MSCs vermehrt antiinflammatorische Eigenschaften zeigen, wurde diese Studie durchgeführt, um herauszufinden, ob die Transplantation von vermehrt GDNF sekretierenden ASC die Rekrutierung von Mikroglia auch ohne die Verwendung eines umhüllenden Gels erreichen kann. Zudem sollte die langfristige Wirkung auf Mikroglia untersucht werden, da vermutet wird, dass die antiinflammatorischen Effekte erst verzögert zum Einsatz kommen. Dabei ist diese Studie die erste, die die Wirkung von GDNF-ASC auf Mikroglia untersucht. Die Transplantation der modifizierten ASC führte zu einer gesteigerten Rekrutierung von Mikroglia im Vergleich zu den Kontrollen zu allen Zeitpunkten. Zudem führte die vermehrte Expression von GDNF durch die ASC zu einer höheren Anzahl an Mikroglia nach vier Tagen und sechs Monaten im Vergleich zu der Gruppe, die naive MSCs erhielt. Der Unterschied zwischen den beiden Transplantationsgruppen nach vier Wochen war nicht signifikant, was jedoch auf die niedrige Gruppengröße zurückzuführen sein könnte. Die inflammatorische Reaktion war langanhaltend und auch nach sechs Monaten stärker ausgeprägt als bei den gesunden Kontrolltieren, nicht jedoch im Vergleich zu den 6-OHDA Tieren. Jedoch nahm die Anzahl der Mikroglia im Verlauf ab und war nach sechs Monaten nur noch geringfügig erhöht. Die Ergebnisse widersprechen jedoch den Erwartungen, da die antiinflammatorischen Effekte von GDNF bereits in verschiedenen anderen Krankheitsmodellen gezeigt werden konnten (148-150). Auch wenn einige Studien bereits die Sekretion von GDNF durch Mikroglia zeigen konnten (174-176) und manche Autoren über diesen Mechanismus sogar einen Teil der progenerativen Wirkung von GDNF vermuten (177-180), sind die Auswirkungen von GDNF auf die Mikroglia selbst bisher nur in wenigen Studien untersucht. Einen Überblick über bisher erschienene Studien zeigt Tabelle 8.

Es existieren z.T. widersprüchliche Ergebnisse über die Wirkung von GDNF auf Mikroglia. GDNF wirkt als Lockstoff für Mausmikroglia *in vitro* und *in vivo* (181) und fördert das Überleben im Rattenmodell über mehrere Tage (182, 183), nicht jedoch über mehrere Stunden (184, 185). GDNF senkt die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  sowie der *inducible nitric oxide synthase* iNOS von Mikroglia (148, 186).

**Tabelle 8: Überblick über Studien zur Wirkung von GDNF auf Mikroglia**

Autor	Jahr	Tierart	in vivo/ in vitro	Krankheitsmodell	Zeitpunkt der GDNF-Gabe nach Kultivierung/ Versuchsbeginn	Untersuchungs- zeitpunkt	Effekt
Huang (187)	2021	Maus	In vitro	∅	7 Tage	6 Stunden	Expression: MMP9↑, MMP14↑, IL-1β↔, TNF-α↔, IL10↔, Arg1↔, p38↑, TLR1/2↑ Sekretion: MMP9↑, MMP14↑,
Zhong (146)	2020	Maus	in vitro	LPS	immortalisierte Zelllinie	24 Stunden	IL-1β↓, TNF-α↓, IL-10↑, TGF-β↑, M1-Marker↓, M2-Marker↑
Zhong (145)	2020	Ratte	in vitro/ in vivo	Deafferenzierungs-schmerz	2 Wochen/ 21 Tage	24 Stunden/ n.a.	IL-1β↓, TNF-α↓, IL-10↑
Qing (149)	2020	Maus	in vitro	Aβ	2 Wochen	6 Stunden	IL-12b↓, Il1β↓, TNF-α↓, TGF-β↓
Kronenberg (188)	2019	Maus	in vitro	∅	8 Tage	16 Stunden	kein Einfluss auf Genexpression der Mikroglia
Xie (189)	2018	Ratte	in vivo	ältere Tiere	T0	6 Tage	keine Abnahme der Mikrogliaaktivität
Hernando (190)	2018	Maus	in vivo	MPTP	jeden 2. Tag	3,5 Wochen	enkapsuliertes GDNF senkt Anzahl an Mikroglia
Lin (191)	2016	Ratte	in vitro/ in vivo	Ischämie	2 Wochen/ ∅	2h / 24 Stunden	keine Reduktion der Apoptose
Casola (192)	2016	Ratte	in vivo	Immunisierung gegen GDNF	T0	4 Wochen	mehr ruhende Mikroglia
Hoban (152)	2015	Ratte	in vivo	LPS	T0	21 Tage	kein Einfluss auf Rekrutierung von Mikroglia
Zlotnik (193)	2014	Maus	in vitro	LPS	10-14 Tage	24 Stunden	morphologisch Aktivierung, kein Einfluss auf IL-6/TNF-α Expression und Ausschüttung, NO ↓
Rickert (186)	2014	Ratte	in vitro	LPS	3-4 Wochen	6, 24 Stunden	NO↓, iNOS ↓, p38↓, qPCR: COX2↓, IL-6↓, Il1β↓, TNF-α↓, ELISA: IL-6↓, TNF-α↓

Chou (148)	2014	Ratte	in vivo	Rückenmarksverletzung	T0	28 Tage	Sekretion: IL-6↓, I11β↓, MMP-9↓, Expression p38↓, iNOS↓
Hoban (153)	2013	Ratte	in vivo	Ø	T0	1,4,7,14 Tage	Volumen der Mikroglie ↓
Ku (181)	2013	Maus	in vitro/ in vivo	Gliom	T0	24h /6 Tage	GDNF wirkt chemotaktisch
Rocha (194)	2012	Ratte	in vitro	Zymosan A	13 Tage	24 Stunden	Phagozytose↓, ROS↓
Lampe (195)	2011	Ratte	in vivo	Ø	T0	7, 28, 56 Tage	GDNF in Hydrogel zieht weniger Mikroglia an als Hydrogel allein
Xing (150)	2010	Ratte	in vitro	LPS	2-8 Wochen	3 Tage	Inhibition der Mikrogliaaktivierung durch GDNF, NO-Produktion↓
Boscia (177)	2009	Ratte	in vitro	NMDA/ Hippocampuschnittkultur	48h vor NMDA	2, 7, 14 Tage	Mikroglia exprimieren RET nach GDNF Gabe
Li (196)	2007	Maus	in vivo	ALS/ genetische Überexpression GDNF	transgene Mäuse	moribunde Tiere	keine eindeutige direkte Wirkung auf Mikroglia
Lin (184)	2006	Ratte	in vitro	Ischämie	16 Tage	2 Stunden	keine Überlebensvorteil für Mikroglia
Chang (197)	2006	Maus, Ratte/ Ratte	in vitro/ in vivo	Ø	immortalisierte Zelllinie, 8 Tage/ T0	24 Stunden/ 1 Woche	NO↑, SOD-Aktivität↑, ICAM-1↑, Phagozytose↑, integrin α5↑
Lu (185)	2005	Ratte	in vitro	Ischämie	16 Tage	0-12 Stunden	Kein Überlebensvorteil für Mikroglia durch GDNF
Hashimoto (198)	2005	Ratte	in vitro	GDNF heterozygotäre Tiere/ LPS	T0	1-24 Stunden	Makrophagen: Phagozytose↑, Zellzahl↔, MCP-1↑
Ghribi (199)	2004	Kaninchen	in vivo	Aβ	T0	7 Tage	weniger aktivierte Mikroglia
Salimi (183)	2003	Ratte	in vitro	Ø	7-8 Tage	1, 4, 14 Tage nach GDNF	verstärkte Überlebensrate von Mikroglia, Nitrite↓, LDH↓
Iannotti (200)	2003	Ratte	in vivo	Rückenmarksverletzung	T0	30 Tage	phagozytische Mikroglia ↓

Salimi (182)	2002	Ratte	in vitro	Ø	immortalisierte Zelllinie	1-6 Tage	verstärkte Überlebensrate von Mikroglia
Honda (201)	1999	Ratte	in vitro	Ø	12-23 Tage	1,2 Tage	Zellzahl↔, NO↔, Morphologie ↔
Shinoda (202)	1996	Ratte	in vivo	intraokuläre Transplantation	alle 5 Tage	41-42 Tage	mehr aktivierte Mikroglia

*Aβ= Amyloid β, ALS= amyotrophe Lateralsklerose, COX2= Cyclooxygenase 2, GDNF= glial cell-derived neurotrophic factor, ICAM-1= intercellular adhesion molecule 1, IL-1β= Interleukin 1β, IL6= Interleukin 6, IL-10= Interleukin 10, IL-12b= Interleukin 12b, iNOS= inducible nitric oxide synthase, LDH= Lactatdehydrogenase, LPS= Lipopolysaccharide, MCP-1= monocyte chemoattractant protein-1, MPTP= 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, NMDA= N-Methyl-D-aspartate, NO= Stickstoffmonoxid, qPCR= quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, RET= rearranged during transfection, ROS= reaktive Sauerstoffspezies, SOD= Superoxid-Dismutase, TGF-β= transforming growth factor β, TNF-α= Tumornekrosefaktor α,*

Zudem konnte die NO und ROS-Produktion durch Mikroglia gesenkt werden und es kam zu einer Hemmung der Aktivierung und Phagozytoseaktivität (150, 194). Dem widersprechen Ergebnisse von Chang et al. hinsichtlich der Wirkung von GDNF auf Mikroglia (197). Diese Studie zeigte eine erhöhte Phagozytoseaktivität sowie einen Anstieg der NO-Produktion, der SOD-Aktivität und der Genexpression von ICAM-1 und der integrin  $\alpha 5$  Untereinheit (197). ICAM-1 führt zu einer TNF- $\alpha$  Produktion in Makrophagen (203) und ist für die Rekrutierung von Granulozyten (204) und TH-17-Zellen (205) in das Hirnparenchym wichtig. Zudem deuten Experimente in Affen darauf hin, dass ICAM-1 für die anhaltende inflammatorische Reaktion beim Parkinson-Syndrom verantwortlich sein könnte (206).

Ähnliche Ergebnisse bezüglich der Phagozytoseaktivität wie Chang et al. (197) konnten Hashimoto et al. für aktivierte Makrophagen zeigen (198). Hier kam es über GFR $\alpha 1$  und RET-unabhängig zu einer Steigerung der Phagozytoseaktivität (198). Dies könnte auf die zeitlichen Unterschiede der Mikroglia-/Makrophagenkulturen zurückzuführen sein. Cristóvão et al. zeigten, dass erst nach 13 Tagen in Kultur die Mehrzahl der Mikroglia in einen Ruhezustand zurückkehrten und eine Untersuchung zu einem früheren Zeitpunkt, wie sie unter anderem von Chang und Hashimoto durchgeführt wurde, daher zu widersprüchlichen Ergebnissen führen könnte (207). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte zudem die p38-abhängige Sekretion von MMP9 und MMP14, sowie der Rezeptoren TLR1 und 2 (187). Auch in dieser Studie wurden die Mikroglia nur 7 Tage nach Kultivierung mit dem GDNF behandelt (187). Zwar konnte keine veränderte Sekretion von pro- oder antiinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden (187), es wurde jedoch bereits früher gezeigt, dass eine Aktivierung von TLR1/2 auf Mikroglia NF- $\kappa$ B-vermittelt zur Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führt (130). MMP9 hingegen wird nach Kontakt mit  $\alpha$ -syn durch Mikroglia ausgeschüttet und hat potenziell selbst neurotoxische Folgen (208). Es scheint daher möglich, dass GDNF gegensätzliche Effekte auf Mikroglia entfaltet, je nachdem in welchem Zustand sich die Mikroglia befinden. Dies wird unterstützt durch ähnliche Beobachtungen bezüglich der ambivalenten Wirkung des strukturell verwandten TGF- $\beta$  auf Mikroglia kulturen. Sowohl eine Verbesserung der Überlebensrate als auch eine erhöhte Apoptoserate wurden beobachtet und deuten auf die Bedeutung von unterschiedlichen Zellkulturbedingungen für die Wirkung von TGF- $\beta$  hin (183, 209).

Ähnlich widersprüchliche Ergebnisse ergaben in vivo Modelle. Während die hier durchgeführten Experimente und einige andere Studien eine vermehrte Anreicherung von aktivierten Mikroglia zeigten (202), führte GDNF in anderen Studien zu einer Verringerung von aktivierten Mikroglia (153, 195, 199).

Zusätzlich zu den genannten konnten einige andere Studien keinen Effekt von GDNF auf Mikroglia zeigen (188) oder sind eher uneindeutig (192, 196). So untersuchte eine Studie von Casola et al. die Wirkung der intraperitonealen Injektion von GDNF zusammen mit Freuds Adjuvant und Pertussis Toxin auf Mikroglia der Retina von Ratten. Dabei verzichteten die Autoren jedoch auf den Nachweis von Antikörper gegen GDNF und es ist daher nicht möglich zu differenzieren, ob die vermehrte Anreicherung von ruhenden Mikroglia auf die intraperitoneale GDNF-Injektion oder tatsächlich auf die Bildung von Autoantikörpern zurückzuführen ist (192). Eine Studie mit transgenen ALS-Mäusen, die GDNF vermehrt exprimieren, konnte eine Reduktion von aktivierten Mikroglia im höheren Lebensalter zeigen, ob diese Reduktion jedoch auch den Erhalt der Motoneurone oder auf direkte Wirkungen auf die Mikroglia zurückzuführen sind, bleibt unklar (196).

#### *Aktivierungszustände von Mikroglia*

Aktivierte M1 Mikroglia zeigen phänotypisch einen abgerundeten, dickeren Zellkörper mit kürzeren Zellfortsätzen, während M2 Mikroglia dem Ruhezustand ähneln (210, 211). Bei den hier beobachteten Mikroglia um die Transplantationsstelle scheint es sich daher am ehesten um aktivierte proinflammatorische M1 Mikroglia zu handeln, gekennzeichnet durch einen abgerundeten, amöboiden Zellkörper mit kürzeren Zellfortsätzen. Dies ist insofern wichtig, als dass den M2 Mikroglia proregenerative Eigenschaften über die Sekretion von Wachstumsfaktoren und antiinflammatorischen Zytokinen zugeschrieben werden, während M1 Mikroglia weitestgehend als proinflammatorisch und potenziell gewebsschädigend gelten. Der Aktivierungszustand der Mikroglia ist zudem entscheidend für die Entfaltung der regenerativen Eigenschaften von GDNF, da das von M2 Mikroglia sekretierte TGF $\beta$  für die Rekrutierung von GFR $\alpha$ 1 Rezeptoren auf den Neuronen benötigt wird und somit direkten Einfluss auf die regenerativen Effekte nimmt (212). Ein Shift der Mikroglia zum M1 Typ könnte die vielversprechenden neuroprotektiven Eigenschaften von GDNF sekretierenden Zellen (151-153, 213) durch ein unterhaltenes proinflammatorisches Milieu auf lange Sicht konterkarieren.

Zwei aktuelle Studien einer chinesischen Arbeitsgruppe zeigten hingegen, dass die Sekretion von GDNF durch MSC sowohl in vitro als auch in vivo die Aktivierung in M1 Mikroglia verhindern und gleichzeitig eine Differenzierung in M2 Mikroglia begünstigen konnte (145, 146). Gezeigt wurde dies durch die reduzierte Sekretion von TNF- $\alpha$ , IL-6 und der vermehrten Ausschüttung von IL-10 und TGF- $\beta$ , sowie durch den Shift von M1 zu M2 Mikrogliamarkern (145, 146).

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der hier gezeigten Ergebnisse zu den oben genannten Studien könnte darin begründet sein, dass die GDNF-ASC in dieser Studie zeitgleich zur Läsion

transplantiert wurden, während sie in dem Modell von Zhong et al. erst drei Wochen später transplantiert wurden (145). Zudem wurde in dieser Studie eine xenogene Transplantation verwendet, während Zhong et. al ein allogenes Transplantationsmodell anwandten. Das Gewebstrauma durch die Operation und die Transplantation der MSC führen zu einer Aktivierung der Mikroglia. Die Sekretion von GDNF führt aufgrund der chemotaktischen Eigenschaften (181) und der verbesserten Überlebensrate von Mikroglia durch GDNF (182, 183) zu einer höheren Anzahl im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die immunogenen Effekte der Läsion und der MSC scheinen dabei die anti-inflammatorischen Eigenschaften von GDNF zu übertreffen. Da die MSC auch nach 6 Monaten noch an der Transplantationstelle nachweisbar waren und über einen langen Zeitraum GDNF exprimieren (156), sind auch die Effekte auf die Mikroglia über diesen Zeitraum denkbar. Diese unterschiedlichen Bedingungen des Mikromilieus könnten über unterschiedliche Signalwege ihre Wirkungen entfalten. Die antiinflammatorischen Wirkungen von GDNF auf Mikroglia wurden in einigen Studien mit einer Aktivierung des PI3K/ Akt-Signalweges in Verbindung gebracht (145, 146, 150). Allerdings konnte auch die Aktivierung von Erk1/2 in Mikroglia durch GDNF gezeigt werden (201) und ging in der Studie von Chang et al. mit proinflammatorischen Effekten einher (197). Dem gegenüber kam es bei Studien, die eine antiinflammatorische Wirkung von GDNF zeigten, zu einer fehlenden Aktivierung oder sogar zu einer Inhibition von Erk1/2 (148, 199). Zudem zeigte eine Studie eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors YAP durch GDNF mit folgender Reduktion der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-12b, TNF- $\alpha$ , jedoch auch von TGF $\beta$  (149). YAP ist ein nachgeschaltetes Protein sowohl des PI3K/AKT- als auch des ERK-Signalweges und die Wirkung von YAP ist noch Gegenstand aktueller Forschung (214). Der ERK1/2- und der PI3K/Akt-Signalweg könnten die scheinbar gegensätzlichen Effekte von GDNF auf Mikroglia erklären.

Die Aktivierung von ERK1/2 führt zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und kann zur Ausbildung eines M1 Phänotyps führen (215, 216). Im MPTP-Modell kommt es dabei zur konstitutiven Aktivierung des ERK1/2-Signalweges in Mikroglia (217). Eine Inhibition dieses Signalweges konnte im nigrostriatalen Verletzungsmodell hingegen eine Reduktion von Mikroglia zeigen und gleichzeitig eine Verbesserung in verschiedenen motorischen Tests bewirken (218). Der PI3K-Signalweg führt dahingegen über die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  zur Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalweges (219). Zudem begünstigt TREM2 über eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges die Ausbildung von M2 Mikroglia (220). Über den PI3K/AKT-Signalweg modulieren Mikroglia des Weiteren den Shift von neurotoxischen A1 Astrozyten zu neuroprotektiven A2 Astrozyten (221).

Die Aktivierung von RET kann sowohl über cis- als auch trans-Stimulation erfolgen und dementsprechend den Erk/MAPK- oder PI3K-Signalweg aktivieren (66). Für die trans-Aktivierung muss GFR $\alpha$ 1 dabei entweder als löslicher Rezeptor oder gebunden an die EZM oder an benachbarte Zellen vorliegen (siehe 3.3). Sowohl der ERK1/2-Signalweg als auch PI3K/AKT können unabhängig von RET über NCAM aktiviert werden (222, 223). Die Aktivierung von PI3K hemmt zudem die Aktivierung von Erk (224). Die Existenz eines weiteren GDNF-Rezeptors, die von einigen Autoren vermutet wird könnte darüber hinaus Einfluss auf die Aktivierung verschiedener Signalwege haben (70, 193).

Zusätzlich ergeben sich aus den bisher durchgeführten Studien mehrere mögliche Einflüsse, die die Aktivierung des ERK1/2- oder des PI3K/AKT-Signalweges durch GDNF modulieren könnten:

I) Ein lokales proinflammatorisches Mikromilieu könnte die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges begünstigen. In der hier durchgeführten Studie entstünde dieses durch den Gewebsschaden durch die Operation und durch die immunogenen Eigenschaften der MSC, was bereits zu einer Voraktivierung und Bildung von M1 Mikroglia führt, die durch das GDNF über Aktivierung des ERK1/2-Signalweges weiter bestärkt wird. Dem widerspricht jedoch, dass die Arbeitsgruppe von Zhong LPS verwendete, um Mikroglia in vitro bereits vor GDNF-Gabe zu einer Ausbildung des M1-Typs zu bringen und durch die GDNF-Gabe trotzdem eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine mit Reduktion der M1 und vermehrter Bildung von M2 Markern zeigen konnte (145, 146).

II) Die lokale Konzentration von GDNF könnte entscheidend sein für die Aktivierung des einen oder des anderen Signalweges, da die hier verwendeten GDNF-ASC bezogen auf das Transplantationsvolumen eine deutlich höhere Konzentration von GDNF sekretierten (156) als die Konzentrationen, die in anderen Studien verwendet wurden (145, 146, 149, 195). Zudem kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme aktivierter Mikroglia während zeitgleich die Konzentration an GDNF im Zellkulturmedium der GDNF-ASC zurückging. Während die erste Studie von Hoban et al. eine Reduktion der Mikroglia durch GDNF sekretierende BM-ASC zeigen konnte (153), verfehlte eine zweite Studie, bei der eine ca. dreifach höhere Anzahl an BM-ASC transplantiert wurde, dieses Ziel (152). Es ist schwierig abzuschätzen, wie hoch die Konzentration pro Zelle in der zweiten Studie liegt, da die Autoren keine genauen Angaben über die Menge an Zellkulturmedium pro Zellen machen (152). Nimmt man jedoch ähnliche Mengen an Zellkulturmedium pro T75 Zellkulturflasche an, wie sie in der hier durchgeführten Studie verwendet wurden (i.e. 15ml), ergeben sich folgende Konzentrationen:

$$1 \frac{ng}{ml} GDNF * \frac{1,5ml}{120.000 Zellen} = \frac{1,5ng}{120.000 Zellen} = \frac{1,25ng}{100.000 Zellen}$$

Konzentration von GDNF pro 100.000 Zellen nach 24 Stunden Zellkultur, entnommen aus (153)

$$4 \frac{ng}{ml} GDNF * \frac{1,5ml}{120.000 Zellen} = \frac{6ng}{120.000 Zellen} = \frac{5ng}{100.000 Zellen}$$

Konzentration von GDNF pro 100.000 Zellen nach 5 Tagen Zellkultur, entnommen aus (153)

$$15 \frac{ng}{ml} GDNF * \frac{15ml}{5700 \frac{Zellen}{cm^2} * 75cm^2} = \frac{225ng}{427.500 Zellen} = \frac{52,63ng}{100.000 Zellen}$$

Konzentration von GDNF pro 100.000 Zellen nach 24 Stunden Zellkultur, entnommen aus (152)

Die Menge an GDNF pro 100.000 Zellen liegt daher in der zweiten Studie ungefähr 3-mal höher als in der ersten Studie. Jedoch wurde diese Konzentration nach 24 Stunden gemessen (152). In der ersten Studie von Hoban et al., bei der dieselbe Methode zur Erzeugung GDNF-sekretierender MSC verwendet wurde, erreichte die GDNF-Konzentration das Maximum jedoch erst nach 5 Tagen (153) und es ist daher anzunehmen, dass die maximale Konzentration ebenfalls erst nach einigen Tagen erreicht wird. Daher ergibt sich eine 5-40-mal höhere Konzentration pro 100.000 Zellen. Dies entspricht einer 15-130-mal höheren Menge an GDNF pro Tier bei 3-mal mehr Zellen pro Transplantat (152, 153). Die Menge an GDNF der in dieser Studie verwendeten GDNF-ASC übertrifft die Menge an GDNF pro Zelle gegenüber der Studie von Hoban et al. von 2015 in den ersten Wochen noch einmal um ungefähr den Faktor 20, nahm in vitro jedoch schnell ab (156). Diese Differenz an GDNF könnte jedoch erklären warum es bei geringer Menge zu einer Reduktion der Mikroglia (153), bei erhöhter Menge an GDNF zu keinem Einfluss auf die Anzahl der Mikroglia (152) und bei deutlich erhöhter Menge an sekretiertem GDNF (156) zu einer vermehrten Ansammlung an Mikroglia führt. Es ist schwierig diese Konzentrationen mit der von Chang et al. zu vergleichen, da in dieser Studie die GDNF- Konzentration auf die Mikroglia bezogen wurde und nicht auf die Anzahl der transplantierten Zellen (153, 197). Die langanhaltende Überexpression von GDNF führte jedoch in verschiedenen Studien auch zu einer Abnahme des Dopamingehaltes (225-227). Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch die GDNF-Wirkung auf Mikroglia für die deletären Effekte verantwortlich sein könnte. Eine pulsatile Freisetzung von GDNF konnte hingegen positive Effekte zeigen (228) und beeinflusst eventuell auch die Aktivierung der Mikroglia.

III) Die Art der Freisetzung von GDNF erzielte in einigen Studien ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse. Die Einbettung der MSC in einem Kollagengel konnte die Menge an Mikroglia, die durch die Transplantation von vermehrt GDNF exprimierenden MSC rekrutiert wurde deutlich reduziert werden (153). Obwohl vermutet wird, dass die immunmodulatorischen Effekte der MSC aufgrund der geringen Ausbildung von MHC-Molekülen und Korezeptoren vor allem Zellkontakt-unabhängig sind (60) könnte eine Einbettung von Zellen in Kollagen (153) oder andere Materialien wie Polymerstrukturen (213) die inflammatorische Reaktion reduzieren indem sie die direkten Zell-Zell-Kontakte verhindern und so die therapeutischen Effekte steigern. Jedoch führte auch die Einkapsulierung von GDNF in Nanolipidträgern bei nasaler Applikation zu einer Reduktion an aktivierten Mikroglia. Dieser Effekt konnte durch die Applikation von nicht-inkapsuliertem GDNF nicht erreicht werden (190). Da die Verbindung aus Nanolipidartikel und GDNF zusätzlich zu der Reduktion der Mikroglia auch eine motorische Verbesserung im Rotarodtest und einen Erhalt von dopaminergen Neuronen zeigen konnte scheint die Menge an biologisch aktivem GDNF durch die Modifikation erhöht zu sein und trotzdem die Rekrutierung von Mikroglia zu reduzieren (190). Ebenso führte eine Einbettung von GDNF mit Schwann-Zellen in Leitkanälen aus polyacrylamide/polyvinylchloride (PAN/PVC) zu einer Reduktion an aktivierten Mikroglia in einem Modell für Querschnittsverletzungen, auch wenn die Autoren auf den Vergleich mit einer Vehikel-Kontrollgruppe verzichteten (200). Da auch die Transplantation von Polyethylenglykol-basierten Hydrogelen ohne Wachstumsfaktoren die akute Mikrogliaantwort inhibieren konnte (229), scheinen diese Materialien die Reaktion der Mikroglia auf das freigesetzte GDNF auf bisher noch nicht geklärte Art zu modulieren.

### **7.3. Targeting Neuroinflammation**

Trotz der enormen Bedeutung des Parkinson-Syndroms und jahrzehntelanger Forschung fehlen bisher noch immer krankheitsmodulierende Therapien. Neuroregenerative Therapien mit Hilfe von Stammzellen und Wachstumsfaktoren wie GDNF konnten zwar vielversprechende Ergebnisse in Tiermodellen zeigen, jedoch konnte dies in klinischen Studien nicht reproduziert werden. Ein besseres Verständnis über das Mikromilieu im Transplantationsbereich scheint daher unabdingbar. Insbesondere Aussagen über die kurzfristige Immunreaktion an der Transplantationsstelle bei humanen Studien sind schwierig zu treffen. Bisherige Tierexperimente zeigen, dass die Immunreaktion nach Transplantation transient zu sein scheint. Jedoch könnte eine stark ausgeprägte Immunreaktion auch das Überleben der transplantierten Zellen und damit den therapeutischen Nutzen reduzieren.

Auch wenn in dieser Studie nur zu einer geringen Erhöhung der Anzahl an Mikroglia im Striatum nach sechs Monaten kam, besteht trotzdem das Risiko einer Transplantatabstoßung durch das Immunsystem von Parkinsonpatientinnen und -patienten, da hier bereits eine chronische Aktivierung besteht. Verschiedene Möglichkeiten die Abstoßung von Zelltransplantaten zu verhindern wurden bereits an anderer Stelle diskutiert (60, 63, 230). Bezogen auf GDNF-sekretierende ASC scheint insbesondere die Verwendung eines Gels als Trägersubstanz eine gute Möglichkeit zu bieten, die Aktivierung von Mikroglia über die Vermeidung von Zell-Zell-Kontakten zu verhindern und die Wirkung von GDNF positiv zu beeinflussen (siehe 7.2).

Eine Doppelblindstudie nach bilateraler Transplantation von fetalem nigralem Gewebe zeigte post mortem eine vermehrte Anreicherung von CD45, einem Marker für aktivierte Mikroglia in dem Transplantationsbereich. In dieser Studie wurde die zeitgleiche immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A nach sechs Monaten eingestellt und könnte der Grund für die persistierende Aktivierung der Mikroglia sein (231). In einer anderen Studie konnte jedoch keine vermehrte Immunogenität gegenüber Mikroglia nachgewiesen werden, obwohl die immunsuppressive Therapie ebenfalls nach sechs Monaten abgebrochen wurde (232). Die Mehrzahl der klinischen Studien zur Transplantation verschiedener Stammzellen beim Parkinson-Syndrom legt nahe, dass eine Immunsuppression das therapeutische Ergebnis verbessert. Eine Dreifachtherapie aus Prednisolon, Cyclosporin A und Azathioprin scheint dabei das beste klinische Outcome zu erzielen, auch wenn noch nicht klar ist wie lange diese eingenommen werden muss (230). Da MSC weniger immunogen zu sein scheinen als fetale Stammzellen, gibt es bisher keine klinischen Studien, die eine Immunsuppression nach Transplantation von MSC angewandt haben (230). Zukünftige Studien sollten diese Frage angehen. Die Sekretion von Mikropartikeln durch transplantierte Zellen ist ein vielversprechender therapeutischer Ansatz (233). Nicht nur körpereigene Stoffe, sondern auch Medikamente wie Dexamethason oder Cyclosporin A können so zielgenau an ihrem Zielort eingesetzt werden, ohne systemische Nebenwirkungen zu entfalten. Auf diese Weise ist eine zielgenaue und besser verträgliche Therapie möglich.

Jedoch gibt es seit einiger Zeit Anzeichen, dass eine reine Suppression des Immunsystems wahrscheinlich nicht so effektiv ist wie ursprünglich angenommen. So legten ältere Studien zwar einen positiven Effekt von bestimmten nichtsteroidalen Antirheumatika- insbesondere Ibuprofen- auf das klinische Outcome von Parkinsonpatientinnen und -patienten nahe (234-236), wurden jedoch durch neuere Studien diesbezüglich revidiert (237-239). Bezogen auf Mikroglia ist eine Veränderung der Antwort in Richtung einer alternativen M2-Aktivierung daher wahrscheinlich wirksamer als eine komplette Inhibition, da die progenerativen Eigenschaften der M2-Mikroglia

zusätzlich genutzt werden können (240) und zudem die positiven Effekte durch das Sekretom der ASC weiter gesteigert werden können. Einige Substanzen konnten einen derartigen Shift bereits erzielen (211, 241). Die hier durchgeführte Studie spricht dafür, dass eine Beeinflussung des Signalweges ähnliche Effekte haben könnte. Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigte, dass von MSC sekretierte Exosomen über die Inhibierung des ERK1/2-Signalweges eine Polarisierung zu M2-Mikroglia und zu einer Reduktion der neuroinflammatorischen Antwort in einem Ischämiemodell erzielen konnte (242). Da die regenerativen Effekte von GDNF auf dopaminerge Neurone zudem über den PI3K-Signalweg entstehen (243), und eine trans-Stimulation AKT-abhängig die nigrostriatale Innervation vor 6-OHDA schützen kann (244), könnte eine striatale Sekretion von sGFR $\alpha$ 1 die protektive Wirkung auf dopaminerge Neurone verstärken und gleichzeitig eine M2-Mikrogliaantwort begünstigen. Tatsächlich führte sGFR $\alpha$ 1 im 6-OHDA-Modell bereits zu einer protektiven Wirkung auf dopaminerge Neurone in der Substantia nigra (245). Leider wurde die Wirkung von sGFR $\alpha$ 1 auf die Mikrogliapopulation von den Autoren nicht untersucht. Eine andere Studie zeigte jedoch eine dosisabhängige Aktivierung sowohl von ERK1/2 als auch AKT durch sGFR $\alpha$ 1 (246). Welche molekularen Mechanismen letztendlich für die unterschiedlichen Wirkungen von GDNF auf die Aktivierung von Mikroglia verantwortlich sind und inwiefern der PI3K/Akt- oder des Erk1/2-Signalweg dafür verantwortlich sind, ist nicht abschließend zu beurteilen und sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein. Jedoch scheint die gezielte Beeinflussung der trans-Aktivierung durch GDNF ein interessanter therapeutischer Ansatz zu sein, der die regenerativen Effekte durch GDNF und das Sekretom der ASC weiter verstärken könnte.

Die Steuerung der GDNF-Freisetzung über pharmakologische Schalter wird inzwischen über verschiedene Systeme ermöglicht (228, 247, 248) und verspricht eine bessere Regulierung, da auch eine langfristige Aktivierung von M2 Makrophagen zu einem Gewebsumbau mit Fibrosierung und einer Schwäche gegenüber Bakterien und Pathogenen führen kann (140).

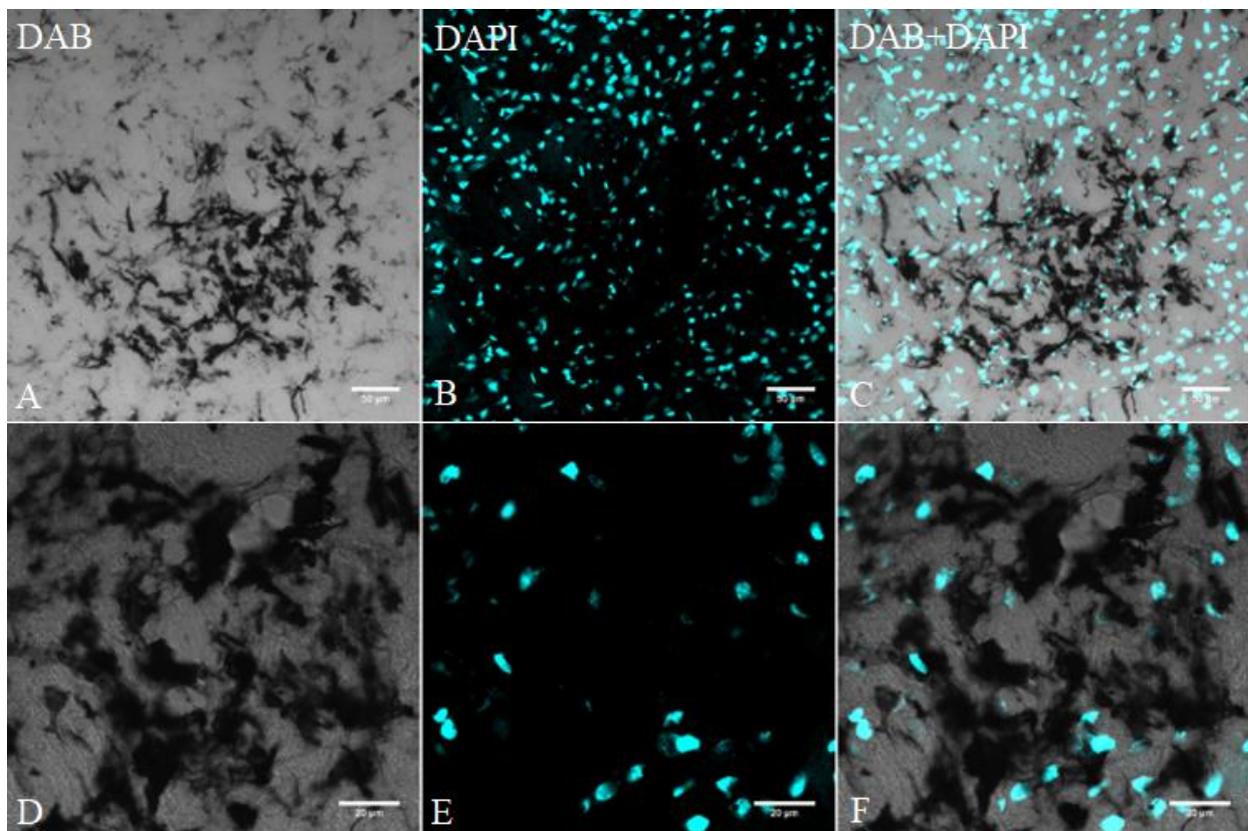
#### **7.4. Limitationen der Studie**

Die Differenzierung von aktivierten Mikroglia in der Iba1-DAB Färbung wurde erschwert durch die Überlagerung von gefärbten Strukturen, die im Bereich der Injektionsstelle zu erkennen waren (siehe dazu auch Es war hier zum Teil nicht eindeutig ersichtlich, ob es sich um aktivierte Gliazellen oder Zelldetritus handelte. Da nur Zellen in der Zählung berücksichtigt wurden, die eindeutig als solche zu erkennen waren, könnte daraus eine mögliche Unterschätzung der eigentlichen Anzahl der Mikroglia insbesondere im Bereich der Läsion resultieren. Diese Überlagerung von Zellanteilen war bei den 4-Tage-Tieren besonders ausgeprägt und stärker als

bei den Tieren, die zu einem späteren Zeitpunkt untersucht wurden. Eine lokal ausgeprägte Gewebsreaktion im Bereich des Einstichkanals manifestierte sich jedoch auch verstärkt bei den 28-Tage-Tieren, wodurch auch hier eine exakte Zellzählung beeinträchtigt wurde. Tiere, die eine Transplantation von Stammzellen erhalten haben, zeigten eine lokal stärkere Gewebereaktion. Diese manifestierte sich insbesondere bei denjenigen Tieren, die GDNF-ASC erhielten. Dies macht es schwierig eine genaue Zahl der Mikroglia zu extrapolieren, da insbesondere bei den älteren Tieren nur noch im Bereich der Einstichstelle eine deutlich sichtbare Anreicherung der Mikroglia erkennbar ist. Im Bereich des restlichen Striatum war kein deutlicher Unterschied in Bezug auf die Zelldichte erkennbar. Es scheint sich also offenbar um eine lokale Reaktion zu handeln. Da nur ein Untersucher die Zählung durchführte, wurde jedoch eine Variabilität aufgrund einer untersucherabhängigen Zählung ausgeschlossen. Zudem wurde durch die verblindete Auszählung eine Verzerrung der Ergebnisse durch erwartete Resultate umgangen. Um eine genauere Einschätzung der Effekte auf die Mikroglia durch die unterschiedliche Behandlung zu erlangen, wäre eine Konzentration auf den Bereich der Läsionsstelle besser geeignet, gestaltet sich jedoch methodisch kompliziert, da es innerhalb des Striatum an geeigneten anatomischen Grenzen mangelt und die Definition einer Gewebsfläche um die Einstichstelle herum aufgrund der unterschiedlichen Größe der Tiere- u.a. bedingt durch das unterschiedliche Alter zum Untersuchungszeitpunkt und der Verformung des Gewebes während des Aufbereitungs- und Färbeprozesses keinen einheitlich definierten Bereich darstellt. Die Quantifizierung der Iba1 positiven Zellen mittels Softwareanalysen der gefärbten Flächen und Färbeintensität wurde in anderen Studien gezeigt (152, 160) und ermöglicht zusätzlich zur Flächenanalyse eine Auswertung der Zellform und -größe. Da die Zellen in den Bereichen mit der höchsten lokalen Dichte an Mikroglia um die Injektionsstelle z.T. in mehreren Ebenen übereinander lagen, müsste zur Quantifizierung die Färbeintensität mit der Anzahl der Zellkerne in einem solchen kritischen Bereich korreliert werden. Exemplarisch erhielten einige Schnitte daher eine Kofärbung mit DAPI. Dieses lagert sich an DNS an und kann fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Die stark positiv gefärbten Zellen löschten jedoch in den hier durchgeführten Versuchen das DAPI-Signal aus und es konnten keine Zellkerne eindeutig detektiert werden (siehe Abbildung 12). Eine reine fluoreszenzmikroskopische Färbung und Quantifizierung mittels Konfokalmikroskopie wäre eine methodisch geeignete Lösung für dieses Problem. Die Zellen könnten eindeutig als solche erkannt werden und auch die Messung der Farbintensität wäre mittels Softwareanalyse automatisierbar. Die starke räumliche Überlagerung der Mikroglia im Bereich des Einstichkanals wurde in vorangegangenen Arbeiten noch nicht beschrieben, da sich diese im Wesentlichen auf ASC

konzentrierten und nur wenige Studien über GDNF-ASC vorliegen. Für zukünftige Arbeiten, insbesondere mit dieser Zelllinie sollten fluoreszenzbasierte Färbetechniken bevorzugt werden. Dies würde zudem die Möglichkeit einer genaueren Differenzierung der funktionellen Eigenschaften der Mikroglia über eine Kofärbung mit anderen Antikörpern ermöglichen.

Die durchgeführten Varianzanalysen wurden nicht für multiples Testen angepasst, da die Experimente als explorativ und nicht als konfirmatorisch zu verstehen sind. Dies birgt das Risiko von falsch positiven Ergebnissen mit zunehmender Anzahl an Tests. Aufgrund der kleinen Tierzahl pro Gruppe sind die p-Werte z.T. nur knapp unter dem Grenzwert von 0,05. Da die Vergleiche der Gruppen über die verschiedenen Zeitpunkte trotz der kleinen Gruppengrößen



**Abbildung 12: DAB/ DAPI-Kofärbung 4-Tagestieres der GDNF-ASC-Gruppe**

*Dies diente zur Überprüfung, ob die DAB-Färbung das DAPI-Signal im Zellkern überlagert oder ob eine Korrelation der DAB-Färbeintensität mit der Anzahl der Zellen möglich ist. A-C zeigen eine 20x Vergrößerung, D-F eine 63x Vergrößerung desselben Bildausschnitts. Die gefärbten Zellen löschen das DAPI-Signal in den dichten Bereichen vollständig aus. Maßstabsskala A-C 50 µm, D-F 20 µm  
 ASC= mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe, DAB= 3,3'-Diaminobenzidin, DAPI= 4',6-diamidino-2-phenylindole, GDNF= glial cell-derived neurotrophic factor*

jedoch konsistent sind, scheint es sich nicht um zufällige Ergebnisse zu handeln. Vielmehr zeigt sich das inflammatorische Potenzial der GDNF-ASC über verschiedene Zeiträume.

Eine langfristige Zellkultur von MSC kann epigenetische Veränderungen durch DNS-Methylierung bewirken (249), die sich auch auf die immunmodulatorischen Eigenschaften auswirken könnten. Nach längerer Zellkultur verlieren MSC ihre antiinflammatorischen Eigenschaften, unter anderen durch die verminderte Expression von HLA-G (250). Es ist daher möglich, dass die kurzfristigen inflammatorischen Effekte der MSC auf methodische Aspekte zurückzuführen sind. Idealerweise sollte daher eine genetische Testung der MSC durchgeführt werden, um dies auszuschließen. Jedoch deckten sich die hier beobachteten kurz- und langfristigen Effekte mit denen vorangegangener Arbeiten und eine funktionell bedeutende Änderung der inflammatorischen Eigenschaften der MSC scheint daher unwahrscheinlich. Idealerweise wäre ein Vergleich zwischen GDNF-ASC und GDNF-exprimierenden BM-ASC, allerdings ist es logistisch sehr schwierig, beide Zelllinien vom gleichen Spender zu erhalten, was notwendig wäre, um den Einfluss durch genetische Unterschiede auszuschließen.

## 7.5. Fazit

Weltweit suchen Forscherinnen und Forscher nach neuen Ansätzen für die Therapie des Parkinson-Syndroms. Die Ergebnisse am Patienten sind bisher leider größtenteils noch nicht zufriedenstellend. Das gezielte Ansprechen der Regeneration körpereigener dopaminerger Neurone ist ein vielversprechender Ansatz. Immer mehr zeigt sich jedoch auch das komplexe Mitwirken des Immunsystems bei den neuroregenerativen Veränderungen. Insbesondere Mikroglia nehmen hierbei eine zentrale Rolle ein. GDNF-ASC haben in vorangegangenen tierexperimentellen Studien vielversprechende therapeutische Effekte gezeigt, jedoch ist ihre Auswirkung auf die Mikrogliapopulation beim Parkinson-Syndrom bisher wenig erforscht. Die hier vorgelegte Arbeit diente dazu die Auswirkungen von GDNF-ASC auf die Mikrogliapopulation im 6-OHDA-Modell der Ratte zu untersuchen. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass GDNF-ASC potenziell proinflammatorische Effekte im Sinne einer Akkumulation von Mikroglia im Striatum hervorrufen können. Die Aktivierung der Mikroglia zeigte eine longitudinale Abnahme und könnte in Verbindung mit der zeitgleichen Läsion durch 6-OHDA stehen. Der Einsatz von GDNF-ASC bei Parkinsonpatientinnen und -patienten ist somit nicht auszuschließen, sollte aber kritisch beurteilt und dessen proinflammatorische Komponente berücksichtigt werden. Da Patientinnen und Patienten mit Parkinson-Syndrom meist seit mehreren Jahren unter der Erkrankung leiden und dementsprechend bereits eine erhöhte Aktivität von Mikroglia aufweisen, könnte dies das Risiko einer zusätzlichen Verstärkung der zellulären Immunaktivierung bergen und potenziell aggravierende Folgen haben. Die Möglichkeiten, die Aktivierung von Mikroglia durch GDNF-ASC zu senken, sollten daher weiter untersucht werden. Genauere Untersuchungen bezüglich der Wirkung von GDNF auf Mikroglia sind dafür nötig. Insbesondere die gezielte Modulation der nachgeschalteten Signalwege scheint vielversprechend. Eine Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges könnte eine Verlagerung der Immunantwort von proinflammatorischen M1 Mikroglia zu antiinflammatorischen und regenerativen M2 Mikroglia begünstigen.

Zudem muss die Immunogenität der ASC, insbesondere durch das vermehrt sekretierte GDNF gesenkt werden. Die Transplantation in einem Hydrogel scheint eine gute Möglichkeit zu bieten. Weitere Studien sind jedoch von Nöten, um die funktionellen Eigenschaften der Mikroglia in vivo besser zu charakterisieren und die exakten biochemischen Reaktionswege zu identifizieren und gezielt beeinflussen zu können. Dies gilt als wissenschaftliche Grundlage für den Einsatz in klinischen Studien, bei denen die Wirkung auf das Outcome von GDNF-ASC auf Patientinnen

und Patienten mit Parkinson-Syndrom untersucht werden soll, um perspektivisch einen neuen und zielgerichteten Ansatz immunmodulatorischer Therapie zu etablieren.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Feigin VL, Abajobir AA, Abate KH, Abd-Allah F, Abdulle AM, Abera SF, Abyu GY, Ahmed MB, Aichour AN, Aichour I, Aichour MTE, Akinyemi RO, Alabed S, Al-Raddadi R, Alvis-Guzman N, Amare AT, Ansari H, Anwari P, Ärnlöv J, Asayesh H, Asgedom SW, Atey TM, Avila-Burgos L, Frinel E, Avokpaho GA, Azarpazhooh MR, Barac A, Barboza M, Barker-Collo SL, Bärnighausen T, Bedi N, Beghi E, Bennett DA, Bensenor IM, Berhane A, Betsu BD, Bhaumik S, Birlik SM, Biryukov S, Boneya DJ, Bulto LNB, Carabin H, Casey D, Castañeda-Orjuela CA, Catalá-López F, Chen H, Chittheer AA, Chowdhury R, Christensen H, Dandona L, Dandona R, De Veber GA, Dharmaratne SD, Do HP, Dokova K, Dorsey ER, Ellenbogen RG, Eskandarieh S, Farvid MS, Fereshtehnejad S-M, Fischer F, Foreman KJ, Geleijnse JM, Gillum RF, Giussani G, Goldberg EM, Gona PN, Goulart AC, Gughani HC, Gupta R, Hachinski V, Gupta R, Hamadeh RR, Hambisa M, Hankey GJ, Hareri HA, Havmoeller R, Hay SI, Heydarpour P, Hotez PJ, Jakovljevic MB, Javanbakht M, Jeemon P, Jonas JB, Kalkonde Y, Kandel A, Karch A, Kasaeian A, Kastor A, Keiyoro PN, Khader YS, Khalil IA, Khan EA, Khang Y-H, Tawfih A, Khoja A, Khubchandani J, Kulkarni C, Kim D, Kim YJ, Kivimaki M, Kokubo Y, Kosen S, Kravchenko M, Krishnamurthi RV, Defo BK, Kumar GA, Kumar R, Kyu HH, Larsson A, Lavados PM, Li Y, Liang X, Liben ML, Lo WD, Logroscino G, Lotufo PA, Loy CT, Mackay MT, El Razek HMA, El Razek MMA, Majeed A, Malekzadeh R, Manhertz T, Mantovani LG, Massano J, Mazidi M, McAlinden C, Mehata S, Mehndiratta MM, Memish ZA, Mendoza W, Mengistie MA, Mensah GA, Meretoja A, Mezgebe HB, Miller TR, Mishra SR, Ibrahim NM, Mohammadi A, Mohammed KE, Mohammed S, Mokdad AH, Moradi-Lakeh M, Velasquez IM, Musa KI, Naghavi M, Ngunjiri JW, Nguyen CT, Nguyen G, Le Nguyen Q, Nguyen TH, Nichols E, Ningrum DNA, Nong VM, Norrving B, Noubiap JJJ, Ogbo FA, Owolabi MO, Pandian JD, Parmar PG, Pereira DM, Petzold M, Phillips MR, Piradov MA, Poulton RG, Pourmalek F, Qorbani M, Rafay A, Rahman M, Rahman MH, Rai RK, Rajsic S, Ranta A, Rawaf S, Renzaho AMN, Rezai MS, Roth GA, Roshandel G, Rubagotti E, Sachdev P, Safiri S, Sahathevan R, Sahraian MA, Samy AM, Santalucia P, Santos IS, Sartorius B, Satpathy M, Sawhney M, Saylan MI, Sepanlou SG, Shaikh MA, Shakir R, Shamsizadeh M, Sheth KN, Shigematsu M, Shoman H, Silva DAS, Smith M, Sobngwi E, Sposato LA, Stanaway JD, Stein DJ, Steiner TJ, Stovner LJ, Abdulkader RS, Ei Szoeki C, Tabarés-Seisdedos R, Tanne D, Theadom AM, Thrift AG, Tirschwell DL, Topor-Madry R, Tran BX, Truelsen T, Tuem KB, Ukwaja KN, Uthman OA, Varakin YY, Vasankari T, Venketasubramanian N, Vlassov VV, Wadilo F, Wakayo T, Wallin MT, Weiderpass E, Westerman R, Wijeratne T, Wiyongse CS, Woldu MA, Wolfe CDA, Xavier D, Xu G, Yano Y, Yimam HH, Yonemoto N, Yu C, Zaidi Z, El Sayed Zaki M, Zunt JR, Murray CJL, Vos T. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* 2017;16(11):877-97.
2. Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E, Obeso JA. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol.* 2009;8(12):1128-39.
3. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie "Idiopathisches Parkinson-Syndrom": Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) und die am Konsensusprozess beteiligten medizinisch-wissenschaftlichen Fachgesellschaften, Berufsverbände und Organisationen; [13.08.2020]. Available from: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-010k\\_S3\\_Parkinson\\_Syndrome\\_Idiopathisch\\_2016-06.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-010k_S3_Parkinson_Syndrome_Idiopathisch_2016-06.pdf).
4. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014;29(13):1583-90.
5. Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology.* 2007;68(5):384-6.
6. Dorsey ER, Bloem BR. The Parkinson Pandemic—A Call to Action. *JAMA Neurol.* 2018;75(1):9.
7. Parkinson J. An Essay on the Shaking Palsy. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences.* 2002;14(2):223-36.
8. Hornykiewicz O. Basic Research on Dopamine in Parkinson's Disease and the Discovery of the Nigrostriatal Dopamine Pathway: The View of an Eyewitness. *Neurodegenerative Diseases.* 2008;5(3-4):114-7.
9. Brundin P, Melki R. Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. *J Neurosci.* 2017;37(41):9808-18.

10. Braak H, Tredici KD, Rüb U, De Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
11. Hansen C, Angot E, Bergstrom AL, Steiner JA, Pieri L, Paul G, Outeiro TF, Melki R, Kallunki P, Fog K, Li JY, Brundin P. alpha-Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest*. 2011;121(2):715-25.
12. Freundt EC, Maynard N, Clancy EK, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, Covert M, Melki R, Kirkegaard K, Brahic M. Neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann Neurol*. 2012;72(4):517-24.
13. Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VMY. Pathological  $\alpha$ -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice. *Science*. 2012;338(6109):949-53.
14. Rey NL, Steiner JA, Maroof N, Luk KC, Madaj Z, Trojanowski JQ, Lee VMY, Brundin P. Widespread transneuronal propagation of  $\alpha$ -synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *The Journal of Experimental Medicine*. 2016;213(9):1759-78.
15. Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B. Seeding induced by  $\alpha$ -synuclein oligomers provides evidence for spreading of  $\alpha$ -synuclein pathology. *J Neurochem*. 2009;111(1):192-203.
16. Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, Madiona K, Olieric V, Böckmann A, Meier BH, Melki R. Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun*. 2013;4(1).
17. Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18(2):101-13.
18. Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RKB. The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of  $\alpha$ -synuclein staging. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2008;34(3):284-95.
19. Berg D, Postuma RB, Bloem B, Chan P, Dubois B, Gasser T, Goetz CG, Halliday GM, Hardy J, Lang AE, Litvan I, Marek K, Obeso J, Oertel W, Olanow CW, Poewe W, Stern M, Deuschl G. Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2014;29(4):454-62.
20. Milber JM, Noorigian JV, Morley JF, Petrovitch H, White L, Ross GW, Duda JE. Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in Parkinson disease. *Neurology*. 2012;79(24):2307-14.
21. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat*. 2015;9.
22. Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ. Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*. 2010;468(7324):696-700.
23. Segura-Aguilar J, Paris I, Muñoz P, Ferrari E, Zecca L, Zucca FA. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2014;129(6):898-915.
24. Zucca FA, Segura-Aguilar J, Ferrari E, Muñoz P, Paris I, Sulzer D, Sarna T, Casella L, Zecca L. Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2017;155:96-119.
25. Hare DJ, Double KL. Iron and dopamine: a toxic couple. *Brain*. 2016;139(4):1026-35.
26. Johnson ME, Stecher B, Labrie V, Brundin L, Brundin P. Triggers, Facilitators, and Aggravators: Redefining Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends Neurosci*. 2019;42(1):4-13.
27. Zeuner KE, Schäffer E, Hopfner F, Brüggemann N, Berg D. Progress of pharmacological approaches in Parkinson's disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2019.

28. Picconi B, Hernández LF, Obeso JA, Calabresi P. Motor complications in Parkinson's disease: Striatal molecular and electrophysiological mechanisms of dyskinesias. *Mov Disord.* 2018;33(6):867-76.
29. Paredes-Rodriguez E, Vegas-Suarez S, Morera-Herreras T, De Deurwaerdere P, Miguelez C. The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol.* 2020;11.
30. Dujardin K, Sgambato V. Neuropsychiatric Disorders in Parkinson's Disease: What Do We Know About the Role of Dopaminergic and Non-dopaminergic Systems? *Front Neurosci.* 2020;14.
31. Schrag A. What contributes to quality of life in patients with Parkinson's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;69(3):308-12.
32. Fabbri M, Zibetti M, Rizzone MG, Giannini G, Borellini L, Stefani A, Bove F, Bruno A, Calandra-Buonaura G, Modugno N, Piano C, Peppe A, Ardolino G, Romagnolo A, Artusi CA, Berchiolla P, Montanaro E, Cortelli P, Luigi R, Eleopra R, Minafra B, Pacchetti C, Tufo T, Cogiamanian F, Lopiano L. Should We Consider Deep Brain Stimulation Discontinuation in Late-Stage Parkinson's Disease? *Mov Disord.* 2020.
33. Antonini A, Stoessl AJ, Kleinman LS, Skalicky AM, Marshall TS, Sail KR, Onuk K, Odin PLA. Developing consensus among movement disorder specialists on clinical indicators for identification and management of advanced Parkinson's disease: a multi-country Delphi-panel approach. *Curr Med Res Opin.* 2018;34(12):2063-73.
34. Contarino MF, Marinus J, van Hilten JJ. Does deep brain stimulation of the subthalamic nucleus prolong survival in Parkinson's Disease? *Mov Disord.* 2018;33(6):947-9.
35. Lindvall O, Björklund A. Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx.* 2004;1(4):382-93.
36. Barker RA. Designing stem-cell-based dopamine cell replacement trials for Parkinson's disease. *Nat Med.* 2019;25(7):1045-53.
37. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.
38. Parmar M, Grealish S, Henchcliffe C. The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci.* 2020.
39. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med.* 2008;14(5):504-6.
40. Li J-Y, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehncrona S, Björklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med.* 2008;14(5):501-3.
41. Li J-Y, Englund E, Widner H, Rehncrona S, Björklund A, Lindvall O, Brundin P. Characterization of Lewy body pathology in 12- and 16-year-old intrastriatal mesencephalic grafts surviving in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2010;25(8):1091-6.
42. Zhao T, Zhang Z-N, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;474(7350):212-5.
43. Caplan AI, Correa D. The MSC: An Injury Drugstore. *Cell Stem Cell.* 2011;9(1):11-5.
44. Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells.* 2017;35(4):851-8.
45. Phinney DG, Di Giuseppe M, Njah J, Sala E, Shiva S, St Croix CM, Stolz DB, Watkins SC, Di YP, Leikauf GD, Kolls J, Riches DWH, Deiuliis G, Kaminski N, Boregowda SV, McKenna DH, Ortiz LA. Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nat Commun.* 2015;6(1):8472.

46. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(6):1445-51.
47. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
48. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(19):10711-6.
49. Phinney D. Advancing mesenchymal stem/stromal cells-based therapies for neurologic disease. *Neural Regen Res.* 2017;12(1):60.
50. Kundrotas G, Gasperskaja E, Slapsyte G, Gudleviciene Z, Krasko J, Stumbryte A, Liudkeviciene R. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget.* 2016;7.
51. Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regen Med.* 2019;4(1).
52. Schwerk A, Altschüler J, Roch M, Gossen M, Winter C, Berg J, Kurtz A, Akyüz L, Steiner B. Adipose-derived human mesenchymal stem cells induce long-term neurogenic and anti-inflammatory effects and improve cognitive but not motor performance in a rat model of Parkinson's disease. *Regen Med.* 2015;10:431-46.
53. Schwerk A, Altschüler J, Roch M, Gossen M, Winter C, Berg J, Kurtz A, Steiner B. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells increase endogenous neurogenesis in the rat subventricular zone acutely after 6-hydroxydopamine lesioning. *Cytotherapy.* 2015;17:199-214.
54. Cova L, Armentero M-T, Zennaro E, Calzarossa C, Bossolasco P, Busca G, Lambertenghi Delilieri G, Polli E, Nappi G, Silani V, Blandini F. Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2010;1311:12-27.
55. Jürgen Berg MR, Jennifer Altschüler, Christine Winter, Anne Schwerk, Andreas Kurtz, Barbara Steiner. Human adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Motor Functions and are Neuroprotective in the 6-Hydroxydopamine-Rat Model for Parkinson's Disease when Cultured in Monolayer Cultures but Suppress. *Stem Cell Rev Rep.* 2014;11:133-49.
56. Teixeira FG, Carvalho MM, Panchalingam KM, Rodrigues AJ, Mendes-Pinheiro B, Anjo S, Manadas B, Behie LA, Sousa N, Salgado AJ. Impact of the Secretome of Human Mesenchymal Stem Cells on Brain Structure and Animal Behavior in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(2):634-46.
57. Venkataramana NK, Kumar SKV, Balaraju S, Radhakrishnan RC, Bansal A, Dixit A, Rao DK, Das M, Jan M, Gupta PK, Totey SM. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res.* 2010;155(2):62-70.
58. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells Dev.* 2012;21(14):2724-52.
59. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(6):455-63.
60. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol.* 2014;32(3):252-60.
61. Isakova IA, Lanclos C, Bruhn J, Kuroda MJ, Baker KC, Krishnappa V, Phinney DG. Allo-Reactivity of Mesenchymal Stem Cells in Rhesus Macaques Is Dose and Haplotype Dependent and Limits Durable Cell Engraftment In Vivo. *PLoS One.* 2014;9(1):e87238.

62. Isakova IA, Dufour J, Lanclos C, Bruhn J, Phinney DG. Cell-dose-dependent increases in circulating levels of immune effector cells in rhesus macaques following intracranial injection of allogeneic MSCs. *Exp Hematol.* 2010;38(10):957-67.e1.
63. Hoornaert CJ, Le Blon D, Quarta A, Daans J, Goossens H, Berneman Z, Ponsaerts P. Concise Review: Innate and Adaptive Immune Recognition of Allogeneic and Xenogeneic Cell Transplants in the Central Nervous System. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(5):1434-41.
64. Ramaswamy S, Soderstrom KE, Kordower JH. Trophic factors therapy in Parkinson's disease: Elsevier; 2009.
65. Lin L, Doherty D, Lile J, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 1993;260(5111):1130-2.
66. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(5):383-94.
67. Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF. The Neural Cell Adhesion Molecule NCAM Is an Alternative Signaling Receptor for GDNF Family Ligands. 2003;113(7):867-79.
68. Bespalov MM, Sidorova YA, Tumova S, Ahonen-Bishopp A, Magalhaes AC, Kuleskiy E, Paveliev M, Rivera C, Rauvala H, Saarma M. Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J Cell Biol.* 2011;192(1):153-69.
69. Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci.* 2003;116(19):3855-62.
70. Perrinjaquet M, Sjostrand D, Moliner A, Zechel S, Lamballe F, Maina F, Ibanez CF. MET signaling in GABAergic neuronal precursors of the medial ganglionic eminence restricts GDNF activity in cells that express GFR 1 and a new transmembrane receptor partner. *J Cell Sci.* 2011;124(16):2797-805.
71. Belova E, Shaffer CL, Trapa PE. Insights from mathematical modeling for convection-enhanced intraputamenal delivery of GDNF. *Med Biol Eng Comput.* 2017.
72. Kirik D, Rosenblad C, Bjorklund A. Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *Eur J Neurosci.* 2000;12(11):3871-82.
73. Kordower JH, Palfi S, Chen E-Y, Ma SY, Sendera T, Cochran EJ, Mufson EJ, Penn R, Goetz CG, Comella CD. Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1999;46:419-24.
74. Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VGF, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessl AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2006;59(3):459-66.
75. Salvatore M, Ai Y, Fischer B, Zhang A, Grondin R, Zhang Z, Gerhardt G, Gash D. Point source concentration of GDNF may explain failure of phase II clinical trial. *Exp Neurol.* 2006;202(2):497-505.
76. Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2007;11(3-4):151-67.
77. Bové J, Perier C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2012;211:51-76.
78. Winner B, Vogt-Weisenhorn DM, Lie CD, Blümcke I, Winkler J. Review: Cellular repair strategies in Parkinson's disease. *Ther Adv Neurol Disord.* 2009;2(1):51-60.

79. Devos D, Lebouvier T, Lardeux B, Biraud M, Rouaud T, Pouclet H, Coron E, Bruley Des Varannes S, Naveilhan P, Nguyen J-M, Neunlist M, Derkinderen P. Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2013;50:42-8.
80. Peter I, Dubinsky M, Bressman S, Park A, Lu C, Chen N, Wang A. Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy and Incidence of Parkinson Disease Among Patients With Inflammatory Bowel Disease. *JAMA Neurol.* 2018;75(8):939.
81. Choi JG, Kim N, Ju IG, Eo H, Lim S-M, Jang S-E, Kim D-H, Oh MS. Oral administration of *Proteus mirabilis* damages dopaminergic neurons and motor functions in mice. *Sci Rep.* 2018;8(1).
82. Qin XY, Zhang SP, Cao C, Loh YP, Cheng Y. Aberrations in Peripheral Inflammatory Cytokine Levels in Parkinson Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2016;73(11):1316-24.
83. Caggiu E, Arru G, Hosseini S, Niegowska M, Sechi G, Zarbo IR, Sechi LA. Inflammation, Infectious Triggers, and Parkinson's Disease. *Front Neurol.* 2019;10:122.
84. Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(8):629-40.
85. McGuire SO, Ling ZD, Lipton JW, Sortwell CE, Collier TJ, Carvey PM. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Is Toxic to Embryonic Mesencephalic Dopamine Neurons. *Exp Neurol.* 2001;169(2):219-30.
86. Pott Godoy MC, Tarelli R, Ferrari CC, Sarchi MI, Pitossi FJ. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. *Brain.* 2008;131(7):1880-94.
87. Conroy SM, Nguyen V, Quina LA, Blakely-Gonzales P, Ur C, Netzeband JG, Prieto AL, Gruol DL. Interleukin-6 produces neuronal loss in developing cerebellar granule neuron cultures. *J Neuroimmunol.* 2004;155(1-2):43-54.
88. Wang CH, Wang WT, Cheng SY, Hung WT, Wu TL, Hsueh CM. Leptin and interleukin-1 $\beta$  modulate neuronal glutamate release and protect against glucose-oxygen-serum deprivation. *Curr Neurovasc Res.* 2010;7(3):223-37.
89. Amantea D, Certo M, Russo R, Bagetta G, Corasaniti MT, Tassorelli C. Early reperfusion injury is associated to MMP2 and IL-1 $\beta$  elevation in cortical neurons of rats subjected to middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience.* 2014;277:755-63.
90. Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS Journal.* 2009;276(1):13-26.
91. Feng ZH, Wang TG, Li DD, Fung P, Wilson BC, Liu B, Ali SF, Langenbach R, Hong JS. Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Neurosci Lett.* 2002;329(3):354-8.
92. Sriram K. Mice deficient in TNF receptors are protected against dopaminergic neurotoxicity: Implications for Parkinson's disease. *FASEB J.* 2002.
93. Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, Anisman H, Hayley S, Park DS. Involvement of Interferon- $\gamma$  in Microglial-Mediated Loss of Dopaminergic Neurons. *J Neurosci.* 2007;27(12):3328-37.
94. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology.* 2012;12(9):623-35.
95. Takeshita Y, Ransohoff RM. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev.* 2012;248(1):228-39.
96. Shechter R, London A, Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature Reviews Immunology.* 2013;13(3):206-18.

97. Al-Obaidi MMJ, Desa MNM. Mechanisms of Blood Brain Barrier Disruption by Different Types of Bacteria, and Bacterial–Host Interactions Facilitate the Bacterial Pathogen Invading the Brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2018;38(7):1349-68.
98. Louveau A, Herz J, Alme MN, Salvador AF, Dong MQ, Viar KE, Herod SG, Knopp J, Setliff JC, Lupi AL, Da Mesquita S, Frost EL, Gaultier A, Harris TH, Cao R, Hu S, Lukens JR, Smirnov I, Overall CC, Oliver G, Kipnis J. CNS lymphatic drainage and neuroinflammation are regulated by meningeal lymphatic vasculature. *Nat Neurosci.* 2018;21(10):1380-91.
99. Kortekaas R, Leenders KL, Van Oostrom JCH, Vaalburg W, Bart J, Willemsen ATM, Hendrikse NH. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol.* 2005;57(2):176-9.
100. Guan J, Pavlovic D, Dalkie N, Waldvogel HJ, O'Carroll SJ, Green CR, Nicholson LFB. Vascular Degeneration in Parkinson's Disease. *Brain Pathol.* 2013;23(2):154-64.
101. Galiano-Landeira J, Torra A, Vila M, Bove J. CD8 T cell nigral infiltration precedes synucleinopathy in early stages of Parkinson's disease. *Brain.* 2020.
102. Orr CF, Rowe DB, Mizuno Y, Mori H, Halliday GM. A possible role for humoral immunity in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain.* 2005;128(11):2665-74.
103. Wang X-J, Yan Z-Q, Lu G-Q, Stuart S, Chen S-D. Parkinson disease IgG and C5a-induced synergistic dopaminergic neurotoxicity: Role of microglia. *Neurochem Int.* 2007;50(1):39-50.
104. He Y, Le W-D, Appel SH. Role of Fcγ Receptors in Nigral Cell Injury Induced by Parkinson Disease Immunoglobulin Injection into Mouse Substantia Nigra. *Exp Neurol.* 2002;176(2):322-7.
105. Prinz M, Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience.* 2014;15(5):300-12.
106. Nimmerjahn A. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science.* 2005;308(5726):1314-8.
107. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002;418(6894):191-5.
108. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol.* 2015;6.
109. Frevert CW, Felgenhauer J, Wygrecka M, Nastase MV, Schaefer L. Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity. *J Histochem Cytochem.* 2018;66(4):213-27.
110. Mills EL, Kelly B, O'Neill LAJ. Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nat Immunol.* 2017;18(5):488-98.
111. Osterloh A, Breloer M. Heat shock proteins: linking danger and pathogen recognition. 2007;197(1):1-8.
112. Wolf SA, Boddeke HWGM, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2017;79(1):619-43.
113. Chung W-S, Welsh CA, Barres BA, Stevens B. Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nat Neurosci.* 2015;18(11):1539-45.
114. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988;38(8):1285-91.
115. Ho MS. Microglia in Parkinson's Disease. In: A. V, M. H, R. Z, V. P, editors. *Neuroglia in Neurodegenerative Diseases Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1175: Springer Singapore; 2019. p. 335-53.

116. Lesage S, Dürr A, Tazir M, Lohmann E, Leutenegger A-L, Janin S, Pollak P, Brice A. LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in North African Arabs. *N Engl J Med.* 2006;354(4):422-3.
117. Rayaprolu S, Mullen B, Baker M, Lynch T, Finger E, Seeley WW, Hatanpaa KJ, Lomen-Hoerth C, Kertesz A, Bigio EH, Lippa C, Josephs KA, Knopman DS, White CL, Caselli R, Mackenzie IR, Miller BL, Boczarska-Jedynak M, Opala G, Krygowska-Wajs A, Barcikowska M, Younkin SG, Petersen RC, Ertekin-Taner N, Uitti RJ, Meschia JF, Boylan KB, Boeve BF, Graff-Radford NR, Wszolek ZK, Dickson DW, Rademakers R, Ross OA. TREM2 in neurodegeneration: evidence for association of the p.R47H variant with frontotemporal dementia and Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 2013;8(1):19.
118. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AH, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2008;7(7):583-90.
119. Rui Q, Ni H, Li D, Gao R, Chen G. The Role of LRRK2 in Neurodegeneration of Parkinson Disease. *Curr Neuropharmacol.* 2018;16(9):1348-57.
120. Dwyer Z, Rudyk C, Thompson A, Farmer K, Fenner B, Fortin T, Derksen A, Sun H, Hayley S. Leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2) modulates microglial phenotype and dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiol Aging.* 2020;91:45-55.
121. Takahashi K, Rochford CDP, Neumann H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J Exp Med.* 2005;201(4):647-57.
122. Püntener U, Booth SG, Perry VH, Teeling JL. Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *J Neuroinflammation.* 2012;9(1):146.
123. Perry VH, Teeling J. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin Immunopathol.* 2013;35(5):601-12.
124. Perry VH, Holmes C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology.* 2014;10(4):217-24.
125. Couch Y, Alvarez-Erviti L, Sibson NR, Wood MJ, Anthony DC. The acute inflammatory response to intranigral  $\alpha$ -synuclein differs significantly from intranigral lipopolysaccharide and is exacerbated by peripheral inflammation. *J Neuroinflammation.* 2011;8(1):166.
126. Stefanova N, Fellner L, Reindl M, Masliah E, Poewe W, Wenning GK. Toll-Like Receptor 4 Promotes  $\alpha$ -Synuclein Clearance and Survival of Nigral Dopaminergic Neurons. *Am J Pathol.* 2011;179(2):954-63.
127. Lee H-J, Suk J-E, Bae E-J, Lee S-J. Clearance and deposition of extracellular  $\alpha$ -synuclein aggregates in microglia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;372(3):423-8.
128. Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong J-S, Zhang J. Aggregated  $\alpha$ -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2005;19(6):533-42.
129. Su X, Maguire-Zeiss KA, Giuliano R, Prifti L, Venkatesh K, Federoff HJ. Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2008;29(11):1690-701.
130. Daniele SG, Béraud D, Davenport C, Cheng K, Yin H, Maguire-Zeiss KA. Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded  $\alpha$ -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. *Sci Signal.* 2015;8(376):ra45-ra.
131. Fellner L, Irschick R, Schanda K, Reindl M, Klimaschewski L, Poewe W, Wenning GK, Stefanova N. Toll-like receptor 4 is required for  $\alpha$ -synuclein dependent activation of microglia and astroglia. *Glia.* 2013;61(3):349-60.

132. Zecca L, Casella L, Albertini A, Bellei C, Zucca FA, Engelen M, Zadlo A, Szewczyk G, Zareba M, Sarna T. NEUROMELANIN CAN PROTECT AGAINST IRON MEDIATED OXIDATIVE DAMAGE IN SYSTEM MODELING IRON OVERLOAD OF BRAIN AGING AND PARKINSONS DISEASE. *J Neurochem*. 2008.
133. Olmedo-Diaz S, Estevez-Silva H, Oradd G, Af Bjerken S, Marcellino D, Virel A. An altered blood-brain barrier contributes to brain iron accumulation and neuroinflammation in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2017;362:141-51.
134. Zecca L, Wilms H, Geick S, Claasen J-H, Brandenburg L-O, Holzknacht C, Panizza ML, Zucca FA, Deuschl G, Sievers J, Lucius R. Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*. 2008;116(1):47-55.
135. Zhang W, Phillips K, Wielgus AR, Liu J, Albertini A, Zucca FA, Faust R, Qian SY, Miller DS, Chignell CF, Wilson B, Jackson-Lewis V, Przedborski S, Joset D, Loike J, Hong J-S, Sulzer D, Zecca L. Neuromelanin Activates Microglia and Induces Degeneration of Dopaminergic Neurons: Implications for Progression of Parkinson's Disease. *Neurotox Res*. 2011;19(1):63-72.
136. Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci*. 2002;15(6):991-8.
137. Ouchi Y, Yoshikawa E, Sekine Y, Futatsubashi M, Kanno T, Ogusu T, Torizuka T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2005;57(2):168-75.
138. Gerhard A, Pavese N, Hotton G, Turkheimer F, Es M, Hammers A, Eggert K, Oertel W, Banati RB, Brooks DJ. In vivo imaging of microglial activation with [<sup>11</sup>C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2006;21(2):404-12.
139. Hanisch U-K, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007;10(11):1387-94.
140. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53(2):1181-94.
141. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion M. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation*. 2014;11(1):98.
142. Joers V, Tansey MG, Mulas G, Carta AR. Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. *Prog Neurobiol*. 2017;155:57-75.
143. Michels M, Sonai B, Dal-Pizzol F. Polarization of microglia and its role in bacterial sepsis. *J Neuroimmunol*. 2017;303:90-8.
144. Park HJ, Oh SH, Kim HN, Jung YJ, Lee PH. Mesenchymal stem cells enhance  $\alpha$ -synuclein clearance via M2 microglia polarization in experimental and human parkinsonian disorder. *Acta Neuropathol*. 2016;132(5):685-701.
145. Zhong Z, Chen A, Fa Z, Ding Z, Xiao L, Wu G, Wang Q, Zhang R. Bone marrow mesenchymal stem cells upregulate PI3K/AKT pathway and down-regulate NF-kappaB pathway by secreting glial cell-derived neurotrophic factors to regulate microglial polarization and alleviate deafferentation pain in rats. *Neurobiol Dis*. 2020:104945.
146. Zhong Z, Chen A, Fa Z, Ding Z, Xie J, Sun Y, Zhang R, Wang Q. Adipose-Derived Stem Cells Modulate BV2 Microglial M1/M2 Polarization by Producing Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor. *Stem Cells Dev*. 2020.
147. Muñoz MF, Argüelles S, Medina R, Cano M, Ayala A. Adipose-derived stem cells decreased microglia activation and protected dopaminergic loss in rat lipopolysaccharide model. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):13762-72.
148. Chou A-K, Yang M-C, Tsai H-P, Chai C-Y, Tai M-H, Kwan A-L, Hong Y-R. Adenoviral-Mediated Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene Transfer Has a Protective Effect on Sciatic Nerve Following Constriction-Induced Spinal Cord Injury. *PLoS One*. 2014;9(3):e92264.

149. Qing J, Liu X, Wu Q, Zhou M, Zhang Y, Mazhar M, Huang X, Wang L, He F. Hippo/YAP Pathway Plays a Critical Role in Effect of GDNF Against A $\beta$ -Induced Inflammation in Microglial Cells. *DNA Cell Biol.* 2020.
150. Xing B, Xin T, Zhao L, Hunter RL, Chen Y, Bing G. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects midbrain dopaminergic neurons against lipopolysaccharide neurotoxicity. *J Neuroimmunol.* 2010;225(1-2):43-51.
151. Moloney TC, Rooney GE, Barry FP, Howard L, Dowd E. Potential of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for delivery of neurotrophins to the Parkinsonian rat brain. *Brain Res.* 2010;1359:33-43.
152. Hoban DB, Howard L, Dowd E. GDNF-secreting mesenchymal stem cells provide localized neuroprotection in an inflammation-driven rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2015;303:402-11.
153. Hoban DB, Newland B, Moloney TC, Howard L, Pandit A, Dowd E. The reduction in immunogenicity of neurotrophin overexpressing stem cells after intra-striatal transplantation by encapsulation in an in situ gelling collagen hydrogel. *Biomaterials.* 2013;34(37):9420-9.
154. Sun S, Zhang Q, Li M, Gao P, Huang K, Beejadhursing R, Jiang W, Lei T, Zhu M, Shu K. GDNF Promotes Survival and Therapeutic Efficacy of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplant.* 2020;29:096368972090851.
155. Mátés L, Chuah MKL, Belay E, Jerchow B, Manoj N, Acosta-Sanchez A, Grzela DP, Schmitt A, Becker K, Matrai J, Ma L, Samara-Kuko E, Gysemans C, Pryputniewicz D, Miskey C, Fletcher B, Vandendriessche T, Ivics Z, Izsvák Z. Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet.* 2009;41(6):753-61.
156. Rasińska J, Klein C, Stahn L, Maidhof F, Pfeffer A, Schreyer S, Gossen M, Kurtz A, Hemmati-Sadeghi S, Steiner B. Long-term overexpression of GDNF in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using a transposon system: a potential approach in PD therapy? [unpublished]. In press 2021.
157. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition.*: Academic Press; 2013.
158. Schmitz C, Hof PR. Recommendations for straightforward and rigorous methods of counting neurons based on a computer simulation approach. *J Chem Neuroanat.* 2000;20(1):93-114.
159. Braun M, Vaibhav K, Saad NM, Fatima S, Vender JR, Baban B, Hoda MN, Dhandapani KM. White matter damage after traumatic brain injury: A role for damage associated molecular patterns. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 2017;1863(10):2614-26.
160. Msibi ZNP, Mabandla MV. Oleanolic Acid Mitigates 6-Hydroxydopamine Neurotoxicity by Attenuating Intracellular ROS in PC12 Cells and Striatal Microglial Activation in Rat Brains. *Front Physiol.* 2019;10:1059.
161. Real CC, Doorduyn J, Kopschina Feltes P, Váñez García D, De Paula Faria D, Britto LR, De Vries EF. Evaluation of exercise-induced modulation of glial activation and dopaminergic damage in a rat model of Parkinson's disease using [11C]PBR28 and [18F]FDOPA PET. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019;39(6):989-1004.
162. Hinojosa AE, Garcia-Bueno B, Leza JC, Madrigal JL. CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation. *J Neuroinflammation.* 2011;8(1):77.
163. Mussano F, Genova T, Corsalini M, Schierano G, Pettini F, Di Venere D, Carossa S. Cytokine, Chemokine, and Growth Factor Profile Characterization of Undifferentiated and Osteoinduced Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1-11.
164. Kwon YW, Heo SC, Jeong GO, Yoon JW, Mo WM, Lee MJ, Jang I-H, Kwon SM, Lee JS, Kim JH. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(12):2136-44.
165. West PK, Viengkhou B, Campbell IL, Hofer MJ. Microglia responses to interleukin-6 and type I interferons in neuroinflammatory disease. *Glia.* 2019.

166. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS One*. 2010;5(4):e10088.
167. Bernado ME, Fibbe WE. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):392-402.
168. McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Wrage PC, Keefer EW, Botterman BR, Tansey KE, Tansey MG. Autologous transplants of Adipose-Derived Adult Stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 2008;210(1):14-29.
169. Galipeau J. Reply: "Function of Cryopreserved Mesenchymal Stromal Cells With and Without Interferon- $\gamma$  Prelicensing Is Context Dependent". *Stem Cells*. 2017;35(5):1440-1.
170. Li J, Zhu H, Chen Y, Deng W, Li Q, Lu S, Xu Y, Huang L, Ma C, Zhao C, Wang R, Qin C. The distribution of transplanted human mesenchymal stem cells in the CNS of young Macaca fascicularis. *Brain Res*. 2014;1579:1-9.
171. Moloney TC, Dockery P, Windebank AJ, Barry FP, Howard L, Dowd E. Survival and Immunogenicity of Mesenchymal Stem Cells From the Green Fluorescent Protein Transgenic Rat in the Adult Rat Brain. 2010;24(7):645-56.
172. Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, Ijzermans JNM, Pescatori M, Stubbs AP, Van Ijcken WFJ, Dahlke MH, Eggenhofer E, Weimar W, Hoogduijn MJ. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2010;162(3):474-86.
173. Giunti D, Parodi B, Usai C, Vergani L, Casazza S, Bruzzone S, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal Stem Cells Shape Microglia Effector Functions Through the Release of CX3CL1. *Stem Cells*. 2012;30(9):2044-53.
174. Matsushita Y, Nakajima K, Tohyama Y, Kurihara T, Kohsaka S. Activation of microglia by endotoxin suppresses the secretion of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) through the action of protein kinase Ca (PKC $\alpha$ ) and mitogen-activated protein kinases (MAPKS). *J Neurosci Res*. 2008;86(9):1959-71.
175. Tanaka T, Oh-Hashi K, Shitara H, Hirata Y, Kiuchi K. NF- $\kappa$ B independent signaling pathway is responsible for LPS-induced GDNF gene expression in primary rat glial cultures. *Neurosci Lett*. 2008;431(3):262-7.
176. Hashimoto M, Ito T, Fukumitsu H, Nomoto H, Furukawa Y, Furukawa S. Stimulation of production of glial cell line-derived neurotrophic factor and nitric oxide by lipopolysaccharide with different dose-responsiveness in cultured rat macrophages. 2005;26(5):223-9.
177. Boscia F, Esposito CL, Di Crisci A, De Franciscis V, Annunziato L, Cerchia L. GDNF Selectively Induces Microglial Activation and Neuronal Survival in CA1/CA3 Hippocampal Regions Exposed to NMDA Insult through Ret/ERK Signalling. *PLoS One*. 2009;4(8):e6486.
178. Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JYF, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Howells DW. Activated Macrophages and Microglia Induce Dopaminergic Sprouting in the Injured Striatum and Express Brain-Derived Neurotrophic Factor and Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. *J Neurosci*. 1998;19:1708-16.
179. Batchelor PE, Liberatore GT, Porritt MJ, Donnan GA, Howells DW. Inhibition of brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor expression reduces dopaminergic sprouting in the injured striatum. *Eur J Neurosci*. 2000;12(10):3462-8.
180. Batchelor P. Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol Cell Neurosci*. 2002;21(3):436-53.
181. Ku MC, Wolf SA, Respondek D, Matyash V, Pohlmann A, Waiczies S, Waiczies H, Niendorf T, Synowitz M, Glass R, Kettenmann H. GDNF mediates glioblastoma-induced microglia attraction but not astrogliosis. *Acta Neuropathol*. 2013;125(4):609-20.

182. Salimi K, Moser K, Zassler B, Reindl M, Embacher N, Schermer C, Weis C, Marksteiner J, Sawada M, Humpel C. Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances survival of GM-CSF dependent rat GMIR1-microglial cells. *Neurosci Res.* 2002;43(3):221-9.
183. Salimi K, Moser KV, Marksteiner J, Reindl M, Humpel C. GDNF and TGF-beta1 promote cell survival in serum-free cultures of primary rat microglia. *Cell Tissue Res.* 2003;312(1):135-9.
184. Lin C-H, Cheng F-C, Lu Y-Z, Chu L-F, Wang C-H, Hsueh C-M. Protection of ischemic brain cells is dependent on astrocyte-derived growth factors and their receptors. *Exp Neurol.* 2006;201(1):225-33.
185. Lu Y-Z, Lin C-H, Cheng F-C, Hsueh C-M. Molecular mechanisms responsible for microglia-derived protection of Sprague–Dawley rat brain cells during in vitro ischemia. *Neurosci Lett.* 2005;373(2):159-64.
186. Rickert U, Grampp S, Wilms H, Spreu J, Knerlich-Lukoschus F, Held-Feindt J, Lucius R. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Family Members Reduce Microglial Activation via Inhibiting p38MAPKs-Mediated Inflammatory Responses. *J Neurodegener Dis.* 2014;2014:1-10.
187. Huang Y, Zhang B, Haneke H, Haage V, Lubas M, Yuan Y, Xia P, Motta E, Nanvuma C, Dzaye O, Hu F, Kettenmann H. Glial cell line-derived neurotrophic factor increases matrix metalloproteinase 9 and 14 expression in microglia and promotes microglia-mediated glioma progression. *J Neurosci Res.* 2021.
188. Kronenberg J, Merkel L, Heckers S, Gudi V, Schwab MH, Stangel M. Investigation of Neuregulin-1 and Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor in Rodent Astrocytes and Microglia. *J Mol Neurosci.* 2019;67(3):484-93.
189. Xie F, Zhang F, Min S, Chen J, Yang J, Wang X. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) attenuates the peripheral neuromuscular dysfunction without inhibiting the activation of spinal microglia/monocyte. *BMC Geriatr.* 2018;18(1).
190. Hernando S, Herran E, Figueiro-Silva J, Pedraz JL, Igartua M, Carro E, Hernandez RM. Intranasal Administration of TAT-Conjugated Lipid Nanocarriers Loading GDNF for Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol.* 2018;55(1):145-55.
191. Lin C-H, Wang C-H, Hsu S-L, Liao L-Y, Lin T-A, Hsueh C-M. Molecular Mechanisms Responsible for Neuron-Derived Conditioned Medium (NCM)-Mediated Protection of Ischemic Brain. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146692.
192. Casola C, Reinehr S, Kuehn S, Stute G, Spiess BM, Dick HB, Joachim SC. Specific Inner Retinal Layer Cell Damage in an Autoimmune Glaucoma Model Is Induced by GDNF With or Without HSP27. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2016;57(8):3626.
193. Zlotnik A, Spittau B. GDNF fails to inhibit LPS-mediated activation of mouse microglia. *J Neuroimmunol.* 2014;270(1-2):22-8.
194. Rocha SM, Cristovão AC, Campos FL, Fonseca CP, Baltazar G. Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. *Neurobiol Dis.* 2012;47(3):407-15.
195. Lampe KJ, Kern DS, Mahoney MJ, Bjugstad KB. The administration of BDNF and GDNF to the brain via PLGA microparticles patterned within a degradable PEG-based hydrogel: Protein distribution and the glial response. *J Biomed Mater Res A.* 2011;96A(3):595-607.
196. Li W, Brakefield D, Pan Y, Hunter D, Myckatyn TM, Parsadanian A. Muscle-derived but not centrally derived transgene GDNF is neuroprotective in G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp Neurol.* 2007;203(2):457-71.
197. Chang Y-P, Fang K-M, Lee T-I, Tzeng S-F. Regulation of microglial activities by glial cell line derived neurotrophic factor. *J Cell Biochem.* 2006;97(3):501-11.
198. Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Shen L, Furukawa S. Involvement of glial cell line-derived neurotrophic factor in activation processes of rodent macrophages. *J Neurosci Res.* 2005;79(4):476-87.

199. Ghribi O, Herman MM, Pramoonjago P, Spaulding NK, Savory J. GDNF regulates the A beta-induced endoplasmic reticulum stress response in rabbit hippocampus by inhibiting the activation of gadd 153 and the JNK and ERK kinases. *Neurobiol Dis.* 2004;16(2):417-27.
200. Iannotti C. Glial cell line-derived neurotrophic factor-enriched bridging transplants promote propriospinal axonal regeneration and enhance myelination after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2003;183(2):379-93.
201. Honda S, Nakajima K, Nakamura Y, Imai Y, Kohsaka S. Rat primary cultured microglia express glial cell line-derived neurotrophic factor receptors. *Neurosci Lett.* 1999;275(3):203-6.
202. Shinoda M, Hoffer BJ, Olson L. Interactions of neurotrophic factors GDNF and NT-3, but not BDNF, with the immune system following fetal spinal cord transplantation. *Brain Res.* 1996;722(1-2):153-67.
203. Schmal H, Czermak BJ, Lentsch AB, Bless NM, Beck-Schimmer B, Friedl HP, Ward PA. Soluble ICAM-1 Activates Lung Macrophages and Enhances Lung Injury. *J Immunol.* 1998;161(7).
204. Bohatschek M, Werner A, Raivich G. Systemic LPS Injection Leads to Granulocyte Influx into Normal and Injured Brain: Effects of ICAM-1 Deficiency. 2001;172(1):137-52.
205. Liu Z, Huang Y, Cao B-B, Qiu Y-H, Peng Y-P. Th17 Cells Induce Dopaminergic Neuronal Death via LFA-1/ICAM-1 Interaction in a Mouse Model of Parkinson's Disease. 2016.
206. Miklossy J, Doudet DD, Schwab C, Yu S, McGeer EG, McGeer PL. Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Exp Neurol.* 2006;197(2):275-83.
207. Cristovao AC, Saavedra A, Fonseca CP, Campos F, Duarte EP, Baltazar G. Microglia of rat ventral midbrain recovers its resting state over time in vitro: let microglia rest before work. *J Neurosci Res.* 2010;88(3):552-62.
208. Sánchez K, Maguire-Zeiss K. MMP13 Expression Is Increased Following Mutant  $\alpha$ -Synuclein Exposure and Promotes Inflammatory Responses in Microglia. *Front Neurosci.* 2020;14.
209. Xiao B-G, Bai X-F, Zhang G-X, Link H. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces apoptosis of rat microglia without relation to bcl-2 oncoprotein expression. *Neurosci Lett.* 1997;226(2):71-4.
210. Ramirez AI, de Hoz R, Salobar-Garcia E, Salazar JJ, Rojas B, Ajoy D, Lopez-Cuenca I, Rojas P, Trivino A, Ramirez JM. The Role of Microglia in Retinal Neurodegeneration: Alzheimer's Disease, Parkinson, and Glaucoma. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:214.
211. Li C, Zhang C, Zhou H, Feng Y, Tang F, Hoi MPM, He C, Ma D, Zhao C, Lee SMY. Inhibitory Effects of Betulinic Acid on LPS-Induced Neuroinflammation Involve M2 Microglial Polarization via CaMKK $\beta$ -Dependent AMPK Activation. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:98.
212. Peterziel H, Unsicker K, Kriegelstein K. TGF $\beta$  induces GDNF responsiveness in neurons by recruitment of GFR $\alpha$ 1 to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 2002;159(1):157-67.
213. Emerich DF, Kordower JH, Chu Y, Thanos C, Bintz B, Paolone G, Wahlberg LU. Widespread Striatal Delivery of GDNF from Encapsulated Cells Prevents the Anatomical and Functional Consequences of Excitotoxicity. *Neural Plast.* 2019;2019:1-9.
214. Azad T, Nouri K, Janse Van Rensburg HJ, Maritan SM, Wu L, Hao Y, Montminy T, Yu J, Khanal P, Mulligan LM, Yang X. A gain-of-functional screen identifies the Hippo pathway as a central mediator of receptor tyrosine kinases during tumorigenesis. *Oncogene.* 2020;39(2):334-55.
215. Sapkota A, Gaire BP, Kang M-G, Choi JW. S1P2 contributes to microglial activation and M1 polarization following cerebral ischemia through ERK1/2 and JNK. *Sci Rep.* 2019;9(1).
216. Jiang B, Brecher P, Cohen RA. Persistent Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B by Interleukin-1 $\beta$  and Subsequent Inducible NO Synthase Expression Requires Extracellular Signal-Regulated Kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21(12):1915-20.

217. Sarkar S, Lu E, Raymick J, Hanig J, Gu Q. ERK/MAP Kinase Activation is Evident in Activated Microglia of the Striatum and Substantia Nigra in an Acute and Chronically-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Curr Neurovasc Res.* 2018;15(4):336-44.
218. Li D, Tong L, Kawano H, Liu N, Yan H-J, Zhao L, Li H-P. Regulation and role of ERK phosphorylation in glial cells following a nigrostriatal pathway injury. 2016;1648:90-100.
219. Jana M, Jana A, Liu X, Ghosh S, Pahan K. Involvement of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Up-Regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  in Anti-Inflammatory Effect of Gemfibrozil in Microglia. *The Journal of Immunology.* 2007;179(6):4142-52.
220. He G-L, Luo Z, Shen T-T, Wang Z-Z, Li P, Luo X, Yang J, Tan Y-L, Wang Y, Gao P, Yang X-S. TREM2 Regulates Heat Acclimation-Induced Microglial M2 Polarization Involving the PI3K-Akt Pathway Following EMF Exposure. *Front Cell Neurosci.* 2020;13.
221. Li T, Liu T, Chen X, Li L, Feng M, Zhang Y, Wan L, Zhang C, Yao W. Microglia induce the transformation of A1/A2 reactive astrocytes via the CXCR7/PI3K/Akt pathway in chronic post-surgical pain. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1).
222. Poteryaev D, Titievsky A, Sun YF, Thomas-Crusells J, Lindahl M, Billaud M, Arumae U, Saarma M. GDNF triggers a novel ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor alpha1. *FEBS Lett.* 1999;463(1-2):63-6.
223. Ditlevsen DK, K hler LB, Pedersen MV, Risell M, Kolkova K, Meyer M, Berezin V, Bock E. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in neural cell adhesion molecule-mediated neuronal differentiation and survival. *J Neurochem.* 2003;84(3):546-56.
224. Mograbi B. Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor-stimulated Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt Activities Exert Opposing Effects on the ERK Pathway. IMPORTANCE FOR THE RESCUE OF NEUROECTODERMIC CELLS. 2001;276(48):45307-19.
225. Georgievska B. Aberrant Sprouting and Downregulation of Tyrosine Hydroxylase in Lesioned Nigrostriatal Dopamine Neurons Induced by Long-Lasting Overexpression of Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor in the Striatum by Lentiviral Gene Transfer. 2002;177(2):461-74.
226. Georgievska B. Overexpression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Using a Lentiviral Vector Induces Time- and Dose-Dependent Downregulation of Tyrosine Hydroxylase in the Intact Nigrostriatal Dopamine System. 2004;24(29):6437-45.
227. Rosenblad C, Georgievska B, Kirik D. Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system. 2003;17(2):260-70.
228. Tereshchenko J, Maddalena A, B hr M, K gler S. Pharmacologically controlled, discontinuous GDNF gene therapy restores motor function in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2014;65:35-42.
229. Bjugstad KB, Lampe K, Kern DS, Mahoney M. Biocompatibility of poly(ethylene glycol)-based hydrogels in the brain: An analysis of the glial response across space and time. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2010;95A(1):79-91.
230. Salado-Manzano C, Perpi na U, Straccia M, Molina-Ruiz FJ, Cozzi E, Rosser AE, Canals JM. Is the Immunological Response a Bottleneck for Cell Therapy in Neurodegenerative Diseases? *Front Cell Neurosci.* 2020;14.
231. Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;54(3):403-14.

232. Mendez I, Sanchez-Pernaute R, Cooper O, Viñuela A, Ferrari D, Björklund L, Dagher A, Isacson O. Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Brain*. 2005;128(7):1498-510.
233. Ankrum JA, Miranda OR, Ng KS, Sarkar D, Xu C, Karp JM. Engineering cells with intracellular agent-loaded microparticles to control cell phenotype. *Nat Protoc*. 2014;9(2):233-45.
234. Gao X, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology*. 2011;76(10):863-9.
235. Gagne JJ, Power MC. Anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson disease: A meta-analysis. *Neurology*. 2010;74(12):995-1002.
236. Samii A, Etminan M, Wiens MO, Jafari S. NSAID Use and the Risk of Parkinson's Disease. *Drugs Aging*. 2009;26(9):769-79.
237. Manthripragada AD, Schernhammer ES, Qiu J, Friis S, Wermuth L, Olsen JH, Ritz B. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Use and the Risk of Parkinson's Disease. *Neuroepidemiology*. 2011;36(3):155-61.
238. Ren L, Yi J, Yang J, Li P, Cheng X, Mao P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs use and risk of Parkinson disease: A dose-response meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(37):e12172.
239. Poly TN, Islam MMR, Yang HC, Li YJ. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of Parkinson's disease in the elderly population: a meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2019;75(1):99-108.
240. Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nature Reviews Neurology*. 2015;11(1):56-64.
241. Chen X, Liu Z, Cao B-B, Qiu Y-H, Peng Y-P. TGF- $\beta$ 1 Neuroprotection via Inhibition of Microglial Activation in a Rat Model of Parkinson's Disease. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2017.
242. Zhao Y, Gan Y, Xu G, Yin G, Liu D. MSCs-Derived Exosomes Attenuate Acute Brain Injury and Inhibit Microglial Inflammation by Reversing CysLT2R-ERK1/2 Mediated Microglia M1 Polarization. *Neurochem Res*. 2020;45(5):1180-90.
243. Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S. Neuroprotective Mechanism of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Mesencephalic Neurons. *J Neurochem*. 2000;74(3):1175-84.
244. Kholodilov N, Kim SR, Yarygina O, Kareva T, Cho JW, Baohan A, Burke RE. Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor-alpha 1 expressed in striatum in trans regulates development and injury response of dopamine neurons of the substantia nigra. *J Neurochem*. 2011;116(4):486-98.
245. Kasanga EA, Owens CL, Cantu MA, Richard AD, Davis RW, McDivitt LM, Blancher B, Pruett BS, Tan C, Gajewski A, Manfredsson FP, Nejtek VA, Salvatore MF. GFR-alpha1 Expression in Substantia Nigra Increases Bilaterally Following Unilateral Striatal GDNF in Aged Rats and Attenuates Nigral Tyrosine Hydroxylase Loss Following 6-OHDA Nigrostriatal Lesion. *ACS Chem Neurosci*. 2019;10(10):4237-49.
246. He S, Chen CH, Chernichenko N, He S, Bakst RL, Barajas F, Deborde S, Allen PJ, Vakiani E, Yu Z, Wong RJ. GFR 1 released by nerves enhances cancer cell perineural invasion through GDNF-RET signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(19):E2008-E17.
247. Eggers R, De Winter F, Hoyng SA, Hoeben RC, Malessy MJA, Tannemaat MR, Verhaagen J. Timed GDNF gene therapy using an immune-evasive gene switch promotes long distance axon regeneration. *Brain*. 2019;142(2):295-311.
248. Quintino L, Namislo A, Davidsson M, Breger LS, Kavanagh P, Avallone M, Elgstrand-Wettergren E, Isaksson C, Lundberg C. Destabilizing Domains Enable Long-Term and Inert Regulation of GDNF Expression in the Brain. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;11:29-39.

249. De Witte SFH, Peters FS, Merino A, Korevaar SS, Van Meurs JBJ, O'Flynn L, Elliman SJ, Newsome PN, Boer K, Baan CC, Hoogduijn MJ. Epigenetic changes in umbilical cord mesenchymal stromal cells upon stimulation and culture expansion. *Cytotherapy*. 2018.
250. Giuliani M, Fleury M, Vernochet A, Ketrroussi F, Clay D, Azzarone B, Lataillade JJ, Durrbach A. Long-Lasting Inhibitory Effects of Fetal Liver Mesenchymal Stem Cells on T-Lymphocyte Proliferation. *PLoS One*. 2011;6(5):e19988.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Felix Maidhof versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Bedeutung der Mikroglia bei der Transplantation von GDNF-exprimierenden Stammzellen im Parkinsonmodell der Ratte/ The Role of Microglia in the transplantation of GDFN-expressing stem cells in a rat Parkinson model‘

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Erstbetreuerin, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **10. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **11.Danksagung**

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Zeit dieser Promotion unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht hätte zustande kommen können. Zuerst möchte ich Frau Prof. Dr. med. Barbara Steiner für die Bereitstellung des Themas und die fachliche Betreuung der letzten anstrengenden Jahre danken. Ebenso geht mein Dank an das Team der Arbeitsgruppe Neuronale Plastizität und Regeneration. Insbesondere meinen Kollegen Justyna Rasińska, Charlotte Klein, Anna Pfeffer, Laura Stahl und Stephanie Schreyer möchte ich mein herzliches Dankeschön aussprechen. Durch die konstruktive Zusammenarbeit und die Hilfe, die mir so oft geboten wurde, habe ich mich im Labor stets sehr wohl gefühlt und konnte all die schwierigen Phasen und Experimente durchstehen. All die langen Abende, die wir zusammen im Labor verbracht haben, werden mir sicherlich noch lange im Gedächtnis bleiben.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, die mich all die Jahre während des Projektes unterstützt und ermutigt hat. Durch eure motivierenden Worte hatte ich stets die Kraft weiterzumachen egal wie steinig der Weg war. Einen ganz besonderen Dank auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an meine langjährigen Mitbewohner und Freunde Sara und Michael, die mir an so vielen Abenden in unserer Küche ihr Ohr geliehen haben. Ohne eure aufmunternden Worte und inhaltlichen Anregungen wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Auch möchte ich allen Freunden und Kollegen und all denjenigen danken, die ich hier nicht persönlich nennen kann, die mich jedoch während der Zeit dieser Promotion unterstützt haben.