

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

DISSERTATION

Effekte sphärischer und einzelschichtkultivierter humaner adipogener mesenchymaler
Stammzellen im 6-OHDA-Rattenmodell für Morbus Parkinson:
Auswirkungen auf das lokale Mikromilieu, neurogene Regionen, Motorik sowie die
Gedächtnisfunktion

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jürgen Berg

aus Berlin

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis

Anlagenverzeichnis.....	IV
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abstract (Deutsch)	1
Abstract (Englisch)	2
Einleitung.....	2
Methodik.....	4
1. Studiendesign.....	4
2. Liposuktion	5
3. Zellisolierung und Kultivierung.....	5
a. Adhärenente MSC (aMSC).....	6
b. Sphärische MSC (sMSC).....	6
4. FACS-Analyse: Zellviabilität und Charakterisierung der aMSC	6
5. Zellviabilität der sMSC.....	7
6. Adipogenes und osteogenes Differenzierungspotential.....	7
7. RNA-Isolierung, reverse Transkription und qPCR in vitro	8
8. Tiere und stereotaktische Operationen.....	8
9. Verhaltensversuche	9
a. D-Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten.....	9
b. Acht-Arm-Radial-Maze	9
10. Immunhistochemie.....	10
11. Morphologische Analyse und Quantifizierung.....	10
12. Quantitative Real-Time PCR post Transplantation	11
13. Statistik	12

Ergebnisse.....	12
1. Untersuchung der transplantierten Zelltypen hinsichtlich Sekretion, Expression und Migration.....	12
a. Zellviabilität und Differenzierungspotential von aMSC und sMSC <i>in vitro</i>	12
b. Charakterisierung von aMSC und sMSC <i>in vitro</i> mittels qPCR.....	13
c. Migration und <i>in vivo</i> Charakterisierung.....	13
2. Auswirkungen der Transplantate auf das Mikromilieu, die Degeneration bzw. Neuroprotektion dopaminergener Neurone	14
a. Kurzfristige Lokalbefunde.....	14
b. Mittelfristige Lokalbefunde.....	14
c. Langfristige Lokalbefunde	15
3. Strukturelle und funktionelle Effekte im Rahmen dopaminergener Projektionen	16
a. Motorische Symptome.....	16
b. Hippokampale Neurogenese und Gedächtnisleistung.....	16
c. Neurogenese der SVZ-OB-Achse	17
Diskussion.....	18
Literaturverzeichnis	23

Anlagenverzeichnis

Anlage 1: Schematischer Versuchsaufbau der kurz-, mittel- und langfristigen Untersuchung	IX
Anlage 2: Ergebnisse des Rotameter-Versuchs	X
Anlage 3: Nachweis vitaler MSC in vivo	X
Anlage 4: Verwendete Substanzen	XI
Eidesstattliche Versicherung	XIV
Anteilerklärung an den ausgewählten Publikationen	XV
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	XVI
Lebenslauf	LXV
Komplette Publikationsliste	LXVII
Danksagung	LXVIII

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Abbildung 1a	Schematischer Versuchsaufbau der Kurzzeitstudie	IX
Abbildung 1b	Schematischer Versuchsaufbau der mittelfristigen Studie	IX
Abbildung 1c	Schematischer Versuchsaufbau der Langzeitstudie	IX
Abbildung 2	Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten	X
Abbildung 3	Repräsentative NuMa Färbung	X
Tabelle 1	Verwendete Substanzen	XI

Abkürzungsverzeichnis

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
aMSC	adhärente bzw. einzelschichtkultivierte MSC
ANOVA	analysis of variance (dt.: Varianzanalyse)
AP	anterior-posterior
APC	Allophycocyanin
BDNF	brain-derived neurotrophic factor (dt.: Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor)
bFGF	basic fibroblast growth factor (dt.: Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2)
BGLAP	Osteocalcin
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
CD	cluster of differentiation (dt.: Unterscheidungsgruppen)
cDNS	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl.: complementary)
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DG	dentate gyrus (dt.: Gyrus dentatus)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
DV	dorso-ventral
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor (dt.: Epidermaler Wachstumsfaktor)
engl.	englisch
EU	Europäische Union
FACS	fluorescence-activated cell sorting (dt.: Durchflusszytometrie Fluoreszenz-markierter Zellen)
FCS	fetal calf serum (dt.: fetales Kalbsserum)
Fig.	figure (dt.: Abbildung)
FITC	fluorescein isothiocyanate (dt.: Fluorescein Isothiocyanat)
g	g-Kraft (Vielfaches der Erdbeschleunigung)

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDNF	glia derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HuMi	Antikörper gegen humane Mitochondrien
i.p.	intraperitoneal
Iba-1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IE	Internationale Einheiten
IPS	Idiopatisches Parkinsonsyndrom
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
M	Mol/Liter
MFB	medial forebrain bundle (dt.: mediales Vorderhirnbündel)
mg	Milligramm
MHC-1	Major Histocompatibility Complex 1 (dt.: Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
ML	medio-lateral
mM	Millimol/Liter
mm	Millimeter
mRNS	Boten-RNS (engl.: messenger)
MSC	mesenchymal stem cell (dt.: mesenchymale Stammzelle)
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NGF	neuronal growth factor
NGFR	Nerve-Growth-Factor-Rezeptor
NuMa	Antikörper gegen das humane Nucleus-Mitoseapparat-Protein
OB	olfactory bulb (dt.: Bulbus olfactorius)
PBS	phosphate-buffered saline (dt.: Phosphatgepufferte Salzlösung)
PD	Parkinson's disease (dt.: Morbus Parkinson)
PE	Phosphatidylethanolamin
PECy7	Phycoerythrin-Cyanin 7

PerCPCy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex-Cyanin-5.5
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
RM	Reference Memory (dt.: Referenzgedächtnis)
RME	Reference Memory Error (dt.: Fehler des Referenzgedächtnisses)
RNA	Ribonucleic acid (dt.: Ribonukleinsäure)
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Core-binding-factor Untereinheit alpha-1
SEM	standard error of the mean (dt.: Standardfehler)
SGZ	subgranuläre Zone
sMSC	sphärische MSC
SN	Substantia nigra
SVF	stromal-vaskuläre Fraktion
SVZ	Subventrikuläre Zone (engl.: subventricular zone)
TB	Tooth bar (dt.: Zahnablage)
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TH	Tyrosinhydroxylase
Tween20	Polysorbat 20
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
vWF	von Willebrandt Faktor
W	Watt
WM	Working Memory (dt.: Arbeitsgedächtnis)
WME	Working Memory Error (dt.: Fehler des Arbeitsgedächtnisses)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Abstract (Deutsch)

Das Idiopatische Parkinsonsyndrom (IPS) ist eine neurodegenerative Erkrankung mit charakteristischen motorischen Symptomen, verursacht durch die Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra (SN) und ein resultierendes striatales Dopamindefizit. Durch die Unterbrechung dopaminergener Projektionen im mesolimbischen System sowie der subventrikulären-Zone-(SVZ)-Bulbus-olfactorius-(OB)-Achse kommt es außerdem zu zwei wesentlichen nicht-motorischen Symptomen, zu mnestischen Defiziten und Hyposmie, einem wichtigen Früherkennungsmerkmal.

Adulte adipogene mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden bereits erfolgreich im Tiermodell für IPS eingesetzt und zeigten neuroprotektive Eigenschaften. Der Zugang zu MSC ist methodisch unkompliziert, sie haben anti-inflammatorische Eigenschaften und sezernieren Faktoren, die eine neuronale Differenzierung induzieren können. Folglich sind sie ideale Kandidaten zur Induktion von Neurogenese und zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die genannten Effekte von der Zellkultivierung und dem resultierenden Phänotyp der transplantierten MSC abhängen. Des Weiteren ist die Datenlage über Zelleffekte im zeitlichen Verlauf bisher unzureichend, sodass eine Untersuchung kurz-, mittel- und langfristiger Effekte notwendig wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte sphärischer MSC (sMSC) und adhärenter MSC (aMSC) drei Tage, drei Wochen und sechs Monate nach der Transplantation in die SN 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-lädiertes Ratten erforscht. Die transplantierten Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expressionsmuster sowie der resultierenden Auswirkungen auf das lokale Mikromilieu und der Protektion dopaminergener Neurone untersucht. Außerdem wurde die Neurogenese im hippocampalen Gyrus dentatus (DG) und in der SVZ betrachtet. In den mittel- und langfristigen Experimenten wurden ferner motorische Symptome und die Gedächtnisleistung gemessen.

Drei Tage nach der Transplantation war die subventrikuläre Neurogenese in beiden MSC-Gruppen signifikant erhöht. Die transplantierten Zellen exprimierten brain-derived neurotrophic factor (BDNF). Eine aMSC-Transplantation hatte nach drei Wochen eine Erhöhung der Tyrosinhydroxylase (TH), BDNF- und Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)-positiver Zellen sowie eine verbesserte Motorfunktion verglichen mit scheinbehandelten und sMSC-transplantierten Tieren zur Folge. sMSC induzierten dagegen eine lokale Mikroglie, führten zu reduzierten TH-Zahlen in der SN und zu weniger neu generierten Zellen im DG, ohne jedoch die Gedächtnisleistung zu beeinträchtigen. Nach sechs Monaten kam es bei beiden MSC-Gruppen gleichermaßen zu einer Protektion dopaminergener Zellen und zu einer Steigerung der hippocampalen und subventrikulären Neurogenese.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Transplantation von MSC protektive Effekte auf das dopaminerge System hat und die Neurogenese im Hippokampus und in der SVZ-OB-Achse positiv beeinflusst. Eine vertiefte Untersuchung dieses Therapieansatzes erscheint insofern sinnvoll, als er zu einer kausalen Beeinflussung des Krankheitsverlaufs mit Einfluss auf motorische und nicht-motorische Symptome führen kann.

Abstract (Englisch)

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by motor symptoms resulting from the degeneration of dopaminergic perikarya in the substantia nigra (SN) leading to a striatal dopamine (DA) deficiency. The disruption of DA responses in the mesocorticolimbic system as well as in the subventricular zone (SVZ) olfactory bulb (OB) axis has also been shown to lead to two major non-motor symptoms, namely memory deficits and hyposmia, which is an important early diagnostic marker of the disease.

Adult human adipose-derived mesenchymal stem cells (MSC) have been shown to induce neuroprotective effects in models for PD. They can be easily derived, are anti-inflammatory and secrete growth factors important for neuronal differentiation. Consequently, they are ideal candidates for the induction of neurogenesis and repair in neurodegenerative disorders.

There is evidence that the effects mentioned above depend on the phenotype of the grafted MSC. Because these effects have not yet been sufficiently evaluated on a time-dependent scale, they were subdivided into acute, intermediate and long-term effects. In the present study, we therefore compared the effects of monolayer-cultured (aMSC) and spheroid (sMSC) MSC following transplantation into the SN of 6-OHDA lesioned rats after three days, three weeks and six months.

The transplanted cells were analyzed for their secretion and expression patterns and for their resulting effects on the local microenvironment, including neuroprotection of dopaminergic neurons. Accordingly, the resulting motor symptoms and memory function were measured in the intermediate and long-term experiments. We also examined neurogenesis in both neurogenic zones, the hippocampal dentate gyrus (DG) and the SVZ-OB-axis.

Three days after transplantation, subventricular neurogenesis was significantly increased in both groups of MSC-transplanted animals. Grafted cells expressed brain-derived neurotrophic factor (BDNF).

Three weeks after transplantation, aMSC significantly increased tyrosine hydroxylase (TH) and BDNF as well as the glial fibrillary acidic protein (GFAP) levels in the SN and improved motor functions compared to untreated and sMSC treated animals. In contrast, sMSC grafting induced increased local microgliosis, decreased TH levels in the SN and reduced the numbers of newly generated cells in the DG without affecting hippocampal learning and memory function.

After six months, dopamine levels were maintained by the graft of both MSC phenotypes. Hippocampal and subventricular neurogenesis also were significantly improved by MSC transplantation.

To summarize the result of these three studies, the MSC graft has protective effects on the dopaminergic system and modulatory effects on neurogenesis in the hippocampus and SVZ-OB-axis. Further investigation on MSC therapy appears to be promising, as it may lead to causal disease-modifying therapeutic strategies with respect to motor as well as non-motor symptoms.

Einleitung

Das Idiopathische Parkinsonsyndrom (IPS) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die durch die spezifischen motorischen Symptome Rigor, Tremor, Bradykinese und posturale Instabilität

gekennzeichnet ist. Sie geht aus einer Degeneration dopaminerger Perikarien in der Substantia Nigra (SN) und dem resultierenden striatalen Dopamindefizit hervor. [1, 2] Die lokale Applikation von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) induziert eine Läsion dopaminerger Neurone in der SN und wird daher zur Untersuchung der nigrostriatalen Dopamindepletion eingesetzt. [3, 4] Neben den bekannten motorischen Symptomen sind auch mnestiche Defizite sowie Hyposmie wichtige Frühsymptome. [5-7] Nicht-motorische Symptome können das Krankheitsbild durchaus dominieren. [8]

Hinsichtlich der Mnestic wird in der Literatur auf eine Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses verwiesen. [9, 10] Es gibt Anzeichen dafür, dass das belohnungsabhängige räumliche Gedächtnis durch eine Zerstörung mesolimbischer dopaminerger Neurone gehemmt wird. [11-13] Eine Denervierung dopaminerger Fasern im mesostriatalen und mesolimbischen System führt zu einer signifikanten Abnahme der Neurogenese in der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus (DG) und beeinträchtigt folglich Lernen und Kognition sowie Adaptationsprozesse [14, 15], da die (räumliche) Gedächtnisfunktion maßgeblich mit hippocampaler Neurogenese im Zusammenhang steht. [16]

Neben der SN können α -Synuclein-positive Einschlüsse beim IPS ebenfalls in dopaminergen Neuronen des Bulbus olfactorius (OB) nachgewiesen werden. [17, 18] Diese gehen mit einer gestörten Neurogenese entlang der subventrikulären-Zone-(SVZ)-OB-Achse [18, 19] und dem Frühsymptom der Hyposmie einher. [7] Im Tierversuch wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Dopamindepletion im Parkinsonmodell und verringerter Neurogenese in der SVZ festgestellt. [20]

Derzeitige Behandlungsansätze fokussieren eine symptomatische Neurotransmittersubstitution, die keinen Einfluss auf den fortschreitenden Zellverlust hat und im Hinblick auf nicht-motorische Symptome meist ungenügend bleibt. Restaurative und neuroprotektive Ansätze können wegweisende komplementäre Therapiemöglichkeiten bieten. Adulte multipotente mesenchymale Stammzellen (MSC), die aus Fettgeweben isoliert werden können [21], sind immunprivilegiert. Sie haben das Potential, sich zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren und haben in vorangegangenen Experimenten zur Linderung motorischer Symptome beigetragen. [22-24] Die zugrundeliegenden Mechanismen der beobachteten Effekte sind bislang nicht erschöpfend erforscht; derzeit wird die Induktion lokaler Reparaturmechanismen infolge einer Sekretion von parakrinen Faktoren durch die transplantierten Zellen und hierdurch hervorgerufene Veränderungen des lokalen Mikromilieus diskutiert. [25] Adipogene MSC exprimieren brain derived neurotrophic factor (BDNF), glia derived neurotrophic factor (GDNF) und neuronal growth factor (NGF) [26, 27], die zu neuroprotektiven Effekten in neurodegenerativen Erkrankungen beitragen. [28] In früheren Studien führte die Transplantation von MSC zur partiellen Wiederherstellung dopaminerger Bahnen im Rattenmodell. [29, 30]

Es gibt Hinweise darauf, dass sphärische MSC-Konglomerate (sMSC) einzelschichtkultivierten adhären MSC (aMSC) in der Fähigkeit der neurogenen Transdifferenzierung sowie in anti-inflammatorischen Zelleigenschaften überlegen sind. [31-33] Unterschiedliche Oberflächenproteine auf s- und aMSC [32] können außerdem zu unterschiedlichen Reaktionen des Zielgewebes auf das Transplantat führen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die lokalen und systemisch-funktionellen Effekte sphärischer und adhärenter MSC im 6-OHDA Rattenmodell zu untersuchen und einander gegenüberzustellen. Dabei sollen folgende Schwerpunkte ausgearbeitet werden¹:

1. Untersuchung der transplantierten Zelltypen hinsichtlich Sekretion protektiver und neurogener Faktoren, Expression von Markern, die Hinweise auf Plastizität, Transdifferenzierung sowie auf neurogenes und neuroprotektives Potential geben und Untersuchung der Migration der MSC.
2. Auswirkungen der Transplantate auf das unmittelbare Mikromilieu, die Degeneration bzw. Neuroprotektion dopaminergener Neurone.
3. Strukturelle und funktionelle Effekte im Rahmen dopaminergener Projektionen:
 - a. Motorische Symptome
 - b. Hippokampale Neurogenese und Gedächtnisleistung
 - c. Neurogenese der SVZ-OB-Achse

Methodik

1. Studiendesign

Betrachtet werden drei voneinander losgelöste Untersuchungen, die sich im Studiendesign teilweise gleichen, sich in manchen Punkten aber wesentlich unterscheiden.

In allen drei Versuchen bekamen adulte männliche Wistar Ratten zwei unilaterale Injektionen 6-OHDA in das mediale Vorderhirnbündel (engl.: medial forebrain bundle, MFB) verabreicht. In der Kurzzeitstudie wurden die lädierten Tiere (n = 30) in drei Gruppen (n = 10) aufgeteilt und erhielten am siebten Versuchstag eine stereotaktische Transplantation mit aMSC, sMSC oder eine Scheintransplantation mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl). Eine weitere Gruppe (n = 10) bekam eine Scheinläsion und eine Scheintransplantation jeweils mit 0,9 % NaCl in die identischen stereotaktischen Koordinaten. Diese Gruppeneinteilung erfolgt gleichermaßen in allen drei Studien, sodass die vier Gruppen im Folgenden zur Vereinfachung als „aMSC“, „sMSC“, „Scheintransplantationsgruppe“ bzw. „6-OHDA“ und „Scheinläsionsgruppe“ bezeichnet werden. Wird lediglich „MSC“ verwendet, wurden die Gruppen aMSC und sMSC aufgrund fehlender Unterschiede zusammengefasst. Am Tag der Transplantation und an den beiden darauffolgenden Tagen erhielten alle Tiere eine Injektion mit BrdU 50 mg/kg KG aufgelöst in NaCl intraperitoneal (i.p.). Am zehnten Tag wurden die Ratten in tiefer Anästhesie transkardial perfundiert und danach zur histologischen Aufarbeitung dekapitiert. (Siehe Fig. 1 in [34]) In der mittelfristigen und langfristigen Untersuchung wurde eine Woche nach der Läsion das ipsilaterale Rotationsverhalten nach D-Amphetaminsulfat Injektion i.p. geprüft. In der mittelfristigen Studie wurde die Läsion als erfolgreich erachtet, wenn eine Mindestrotationszahl von 5 rpm erreicht wurde. Ratten, die dieses Kriterium nicht erfüllten, wurden

¹Dabei werden im Hinblick auf die Zeitachse (kurz-, mittel- und langfristig) unterschiedliche inhaltliche Schwerpunkte gesetzt. Während im Ergebnisteil die hier formulierten Ziele als Gliederung dienen und somit die Struktur dieses Abschnitts vorgeben, ist es für die Diskussion sinnvoller, die Zeitachse als übergeordnete Gliederung heranzuziehen, um Schwerpunkte und Unterschiede im zeitlichen Verlauf in den Vordergrund zu stellen. Die jeweiligen Ergebnisse werden dann gemäß der formulierten Zielsetzung subsumiert und diskutiert.

vom Versuch ausgeschlossen. Gemessen an der durchschnittlichen Rotationszahl wurden die Tiere gleichmäßig in drei Gruppen aufgeteilt. Am Folgetag wurde an ihnen eine stereotaktische Transplantation mit aMSC (n = 10), sMSC (n = 10) oder eine Scheintransplantation mit 0,9 % NaCl (n = 11) vorgenommen. Eine Scheinläsionsgruppe (n = 16) erhielt eine Scheinläsion und eine Scheintransplantation jeweils mit 0,9 % NaCl in die identischen stereotaktischen Koordinaten und wurde denselben Prozeduren des Versuchs unterzogen, wie alle anderen Gruppen. In der Langzeitstudie wurde kein Cut-off – gemessen an der Rotationszahl im ersten Rotameter-Versuch – gesetzt und alle lädierten Tiere wurden entsprechend der durchschnittlichen Rotationszahl gleichmäßig in drei Gruppen aufgeteilt und erhielten am Folgetag eine stereotaktische Transplantation mit aMSC (n = 7), sMSC (n = 7) oder eine Scheintransplantation mit 0,9 % NaCl (n = 7). Eine scheinlädierte Gruppe bestand hier ebenfalls aus n = 7 Tieren. Die anschließende Versuchsphase verlief zunächst identisch für die mittelfristige Studie und die Langzeitstudie: Am Tag der Transplantation und an den beiden darauffolgenden Tagen erhielten alle Tiere eine Injektion mit BrdU 50 mg/kg KG aufgelöst in NaCl i.p. Zwei Wochen nach der Transplantation wurde der Acht-Arm-Radial-Maze-Test durchgeführt. Im Anschluss wurde erneut das D-Amphetamin-induzierte Rotationsverhalten getestet, um Unterschiede zur Situation vor der Transplantation abzubilden. Am Tag nach der Verhaltenstestung wurden die Ratten der mittelfristigen Studie in tiefer Anästhesie transkardial perfundiert und danach zur histologischen Aufarbeitung dekapitiert oder zur weiteren Charakterisierung mittels qPCR nach Anästhesierung unmittelbar dekapitiert. (Siehe Fig. 1 in [35]) In der Langzeitstudie erfolgte ein dritter Rotameter-Versuch an Tag 182, später am selben Tag die transkardiale Perfusion. (Siehe Fig.1 in [36]) Vergleiche hierzu auch Abbildung 1a-c in Anlage 1.

2. Liposuktion

Die verwendeten Fettgewebsproben wurden von vier verschiedenen Spenderinnen (zwischen 28 und 32 Jahre alt) während elektiver Tumescenz-Liposuktionen gewonnen. Entsprechend der Richtlinien der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin sowie dem International Code of Medical Ethics der World Medical Association (Declaration of Helsinki) wurden die Probandinnen aufgeklärt. Sie stimmten der Verwendung des entnommenen Materials zu. Während der Tumescenz-Liposuktionen wurde das subkutane Gewebe mit Kochsalzlösung sowie einem Anästhetikum und Epinephrin mit einer Kanüle infundiert. Anschließend wurden Lösung und Fettgewebe gemeinsam abgesaugt.

3. Zellisolierung und Kultivierung

Der erste Schritt bei der Isolierung der MSC bestand in einer intensiven Spülung des entnommenen Gewebes mit magnesium- und calciumfreier phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Die Fett-PBS-Suspension wurde bei 350 g für 3 min zentrifugiert, sodass drei Schichten entstanden. Nachdem die obere ölige Phase und die untere wässrige Phase entfernt waren, wurden die Proben mit 0,2 IE Kollagenase NB4 pro ml Fettgewebe zur Gewebsdigestion in sterilen Kulturplatten für 60 min bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Während der Inkubation wurden die Platten im Abstand von 15 min behutsam

geschwenkt. Durch erneutes Zentrifugieren bei 350 g für 10 min wurde die stromal-vaskuläre Fraktion (SVF) isoliert, der Überstand wurde entfernt und das verbleibende Pellet in PBS re-suspendiert. Zur Entfernung von Gewebsresten und zurückgebliebenen Aggregaten wurde die Suspension durch ein 70 µm Zellsieb (BD, Heidelberg, Germany) gefiltert. Danach wurde die Zellsuspension zweimal in PBS gewaschen und die Zellen wurden in ein Kulturmedium bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10 % fetalem Kalbsserum (engl.: fetal calf serum, FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin re-suspendiert. Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer quantifiziert (Marienfeld, Lauda Königshofen, Germany). Eine tabellarische Auflistung aller verwendeter Substanzen inklusive der Dosierungen bzw. Verdünnungen und Herstellerangaben ist in Anlage 4 (Tabelle 1) zu finden.

a. Adhärenz MSC (aMSC)

Die Zellen wurden auf einer Kulturplatte in der Konzentration von $1,6 \times 10^5$ Zellen/cm² ausgesät und in einem befeuchteten Inkubator (Heracell 240i, Thermo Scientific, Bonn, Germany) bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Wenn eine Konfluenz von 80 bis 90 % erreicht war, wurden die Zellen mithilfe von 0,05 % Trypsin passagiert, in einer Neubauer Zählkammer quantifiziert und erneut mit einer Zellkonzentration von 2000 Zellen/cm² ausgesät. Nach der dritten Passage wurden die Zellen geerntet und für weitere vier Tage in einem Medium bestehend aus D-MEM (niedrige Glucosekonzentration), 2 % B27 Supplement, 1 % Penicillin/Streptomycin, 40 ng/ml Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (engl.: basic fibroblast growth factor, bFGF), 20 ng/ml Epidermaler Wachstumsfaktor (engl.: epidermal growth factor, EGF) inkubiert. Nach vier Tagen wurden die MSC trypsinisiert und für weitere Experimente genutzt.

b. Sphärische MSC (sMSC)

Multizelluläre MSC Sphären wurden mittels Hanging-Drop-Methode [37] gewonnen, indem die MSC nach der dritten Passage in einer Konzentration von 300 Zellen/µl re-suspendiert und in 20 µl großen Tropfen (das entspricht 6000 MSC in einem Tropfen) an einen umgedrehten Deckel einer Zellkulturplatte gesetzt wurden. Der Deckel wurde danach gewendet und rasch auf eine mit PBS gefüllte Kulturplatte gesetzt, um das Verdunsten der Tropfen zu verhindern. Die Tropfen wurden schließlich im befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für vier Tage inkubiert. Eine stabile Formierung der Sphären ergab sich nach drei bis vier Tagen.

4. *FACS-Analyse: Zellviabilität und Charakterisierung der aMSC*

Nach der vierten Passage wurden eine Mio. Zellen geerntet, in FACS-Puffer (bestehend aus PBS und 10 % FCS) suspendiert und mit einer Konzentration von etwa 60.000 Zellen pro 100 µl FACS-Puffer auf FACS-Tubes verteilt. Die relevanten Fluorochromen-verbundenen Antikörper wurden hinzugefügt und die Zellsuspension bei 4 °C geschützt vor UV-Licht für 25 min inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 500 µl FACS-Puffer re-suspendiert. Für eine Negativkontrolle wurde die gleiche Anzahl ungefärbter

Zellen verwendet. Die Zellen wurden mittels LSR2 FACS-Zytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, Vereinigte Staaten von Amerika) mit einem negativ Marker Mix (CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45) verbunden mit V450 Fluorochrome sowie den positiven Selektionsmarkern CD105 konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), CD29 verbunden mit Phosphatidylethanolamin (PE), CD90 verbunden mit Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex-Cyanin-5.5 (PerCPCy5.5), CD44 verbunden mit Phycoerythrin-Cyanin 7 (PECy7) und CD90 verbunden mit Allophycocyanin (APC) analysiert.

5. Zellviabilität der sMSC

Die Viabilität der sMSC wurde mittels 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI) Färbung nachgewiesen indem intakte Zellkerne visualisiert wurden. Nachdem die sMSC geerntet wurden, wurden sie zweimal mit PBS gewaschen, danach für 10 min in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die sMSC wurden mit Ethanol und Xylen dehydriert und dann in flüssigem Paraffin bei 65 °C über Nacht eingebettet. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit Paraffin bei 65 °C an einer Einbettungskassette fixiert. Auf einer Kühlplatte wurden diese zur Aushärtung bis auf -4 °C abgekühlt. Die Blöcke wurden über Nacht bei -20 °C gelagert und mit einem Leica RM2255 Microtom (Leica, Bensheim, Germany) in 4 µm starke Sektionen geschnitten. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger (superfrost, Menzel/Thermo Fisher Scientific, Loughborough, UK) übertragen und zur Fixierung bei 37 °C für 24h inkubiert. Vor der Färbung wurden die Zellen in einer absteigenden Ethanolreihe (100-90-80-70 %) und PBS rehydriert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt und die Schnitte anschließend bei einer 20fachen Vergrößerung mit einem Olympus BX61 Mikroskop in Kombination mit einer Olympus cell-P Imaging Software untersucht. Jede Probe wurde fünfmal ausgezählt und der durchschnittliche Prozentsatz viabler Zellen als Anteil aller Zellen der Sphären ermittelt. Hinsichtlich des Differenzierungsprofils der MSC und der Homogenität der Zellen von unterschiedlichen Spendern wurde ferner eine Immunfluoreszenzfärbung mit humanen Antikörpern (AK) gegen Vimentin, Ratte Anti-CD34-AK und den Sekundär-AK Alexa647 und Alexa488 durchgeführt.

6. Adipogenes und osteogenes Differenzierungspotential

Um das Differenzierungspotential der MSC nachzuweisen, wurden die Zellen in Medien kultiviert, die adipogene und osteogene Differenzierung induzieren. Das Medium zur osteogenen Differenzierung enthielt D-MEM (niedriger Glucosegehalt), 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 mM β -Glycerolphosphat, 0,1 µM Dexamethason und 50 µM Ascorbinsäure-2-Phosphat. Das Medium zur adipogenen Differenzierung enthielt D-MEM (niedriger Glucosegehalt), 10 % FCS, 1 µM Dexamethason, 10 µg/ml Insulin, 0,5 mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin und 0,2 mM Indomethacin. Das Medium wurde jeden dritten Tag erneuert. Nach drei bis vier Wochen wurden die differenzierten MSC sowie undifferenzierte Kontrollen mit Oil-Red-O-Lösung zum Nachweis der adipogenen und mit Alizarin-Red-Lösung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung angefärbt.

7. RNA-Isolierung, reverse Transkription und qPCR in vitro

Die *in-vitro*-Analyse der MSC wurde mit den Zellen aller vier Spender durchgeführt. aMSC und sMSC wurden nach der vierten Passage bzw. nach viertägiger Phase der Sphärenformierung mittels RNeasy Lysepuffer lysiert. Zur Isolierung der RNA wurde ein Qiagen RNeasy Mini Kit® (Qiagen, Hilden, Germany) verwendet. Die RNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop spectrophotometer® (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington DE, USA) bestimmt. 1 µg der totalen RNA wurde unter Verwendung eines SuperScript III® (Invitrogen-Gibco Carlsbad, USA) entsprechend den Herstellerangaben in cDNS revers-transkribiert. Danach wurde die qPCR mit einem SybrGreen PCR Master Mix® (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) durchgeführt. mRNA Level wurden mit einem Eppendorf realplex ep gradient S Mastercycler® (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) bestimmt. Die genutzten Primer wurden mit einem Primer3 Designprogramm und Datenbank von Metabion (Metabion international AG, Martinsried, Germany) hergestellt. Die Quantifizierung wurde mittels $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode mit GAPDH als Haushaltsgen vorgenommen. Eine Auflistung der genutzten Primer ist in Tabelle 1 in [35] sowie in Tabelle 1 in [34] zu finden.

8. Tiere und stereotaktische Operationen

Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales in Berlin und gemäß der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt. Männliche Wistar Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln, Germany; 280-320 g) wurden unter Standardbedingungen (12h-Tag/Nacht-Rhythmus und freier Zugang zu Futter und Wasser, vier Tiere pro Käfig) gehalten, alle Experimente wurden am Tag durchgeführt. Zur stereotaktischen Operation (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) wurden die Ratten mit Pentobarbital (60 mg/kg i.p.) gelöst in isotoner NaCl-Lösung anästhesiert. Der Rattenschädel wurde in den stereologischen Rahmen eingespannt und die Schädeldecke mittels Skalpell freigelegt. Danach wurde die Kalotte mit einem Zahnbohrer mit zwei kleinen Löchern versehen, durch welche die unilaterale Läsion mit zwei Injektionen zu 6,5 µg 6-OHDA gelöst in 2 µl 0,9 % NaCl-Lösung mit 0,1 % Ascorbinsäure in zwei Punkte des MFB induziert wurde. Die scheinladierte Gruppe bekam das gleiche Volumen 0,9 % NaCl-Lösung injiziert. Die Infusion der Lösungen erfolgte mit einer Kanüle aus rostfreiem Stahl, Durchmesser 25 µm, die mit einem Polyethylen-Schlauch mit einer 20 µl Mikrospritze (Hamilton, Massy, France) verbunden war. Die Lösung wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 µl/min infundiert. Nach Abschluss der Infusion wurde die Injektionsnadel für weitere 5 min in situ belassen, um die Diffusion der Flüssigkeit zu optimieren und einen Rückfluss durch den Stichkanal beim Abziehen der Kanüle zu minimieren. Die Injektionsdaten lauten wie folgt (Bregma): Toothbar (TB): +3,4; anterior-posterior (AP): -4,0; medio-lateral (ML): +0,8; dorso-ventral (DV): -8,0 und TB: -2,4; AP: -4,4; ML: +1,2; DV: -7,8 (Angaben in mm).

Acht Tage nach der Läsion erhielten die Ratten eine intranigrale MSC-Tansplantation bzw. eine Infusion mit 0,9 % NaCl-Lösung. Die Infusion der Zellsuspension bzw. der Kochsalzlösung erfolgte mit einer Kanüle aus rostfreiem Stahl, Durchmesser 0,9 mm (Sterican®, B. Braun, Melsungen, Germany). Die Flüssigkeiten wurden erneut mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 µl/min infundiert und die

Injektionsnadel für 5 min in situ belassen. Die MSC-Transplantation erfolgte mit 3×10^5 Zellen in 5 μ l PBS. Die Injektionsdaten lauten (Bregma): TB: -3.3, AP -5.3, ML +2.4, DV -7.4.

9. Verhaltensversuche

Sieben Tage vor Beginn und während der Verhaltensexperimente wurden die Ratten täglich für 2 min an den Umgang mit dem Untersucher gewöhnt. Die Konditionen und Abläufe der Versuche waren für alle Gruppen während der Studie konstant.

a. D-Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten

Eine Woche nach der Läsion (Tag 8) und 20 Tage nach der Transplantation (Tag 29) sowie an Tag 182 (nur Langzeitstudie) wurde das Rotationsverhalten nach Injektion von D-Amphetaminsulfat gemessen, vgl. hierzu [38]. Nach der Injektion wurden die Tiere in die automatisierten Rotameterschüsseln (TSE Systems, Bad Homburg, Germany) gesetzt, 15 min nach der Injektion begann die Messung, bei der Drehungen größer als 180 Grad aufgezeichnet wurden. Tiere, deren Durchschnittswerte in der ersten Messung über 5 rpm lagen, wurden in den Versuch aufgenommen.

b. Acht-Arm-Radial-Maze

Das Radial-Maze aus dunkelgrauem Polyvinylchlorid bestand aus einem oktogonalen Zentrum, Durchmesser: 50 cm, und acht kongruenten Armen, 42 cm lang und 10 cm breit, welche dieses Zentrum radiär verließen. Eine halbkreisförmige Schale am Ende eines jeden Arms (Durchmesser: 3 cm) beinhaltete den Verstärker in Form einer viertel Erdnuss. Dieser Versuchsapparat befand sich auf dem Boden eines Raumes mit weißen Wänden sowie einer gleichmäßigen indirekten Beleuchtung durch vier 40 W Glühbirnen. Weiterhin war der Raum mit drei Orientierungshinweisen außerhalb des Labyrinths ausgestattet, die über die Versuchsdauer konstant blieben. Drei Tage vor dem Start der Untersuchung wurde die Nahrungsdeprivation begonnen und über die gesamte Versuchsdauer aufrechterhalten. Die Ratten erhielten in diesem Zeitraum reduzierten Zugang zu Futter (für 2 h am Tag), Wasser ad libitum, sodass sich das Gewicht auf durchschnittlich 85 % des Ausgangswertes reduzierte. Das KG wurde täglich kontrolliert. Während der ersten beiden Tage fand eine Phase der Habituation statt, in der alle Arme des Labyrinths mit einem Verstärker bestückt waren. Die Ratten konnten während einer Testzeit von 10 min lernen, die Erdnüsse zu finden. An den darauffolgenden sechs Tagen wurden die Gedächtnistests durchgeführt. In dieser Phase wurden konstant drei Arme mit Erdnüssen bestückt. Die Ratten wurden im Zentrum des Radial Maze platziert und konnten sich frei bewegen. Wenn sie alle drei Nüsse gefunden hatten, spätestens aber nach 10 min, wurde der Test beendet. Jeder Eintritt oder Wiedereintritt in ein initial unbestückten Arm wurde als Fehler des Referenzgedächtnisses (engl.: Reference Memory Error, RME) gewertet, Wiedereintritte in einen vormals bestückten Arm zählten als Fehler des Arbeitsgedächtnisses (engl.: Working Memory Error, WME).

10. Immunhistochemie

Nach Beendigung der Verhaltensversuche wurden die Ratten am Tag 30 mit Chloralhydrat anästhesiert (50 mg/kgKG, i.p.) und danach mit 0,1 M PBS gefolgt von 4 % eiskaltem PFA in 0,1 M PBS transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen und über Nacht in 4 % PFA in 0,1 M PBS postfixiert. Dann wurden diese in 30 % Saccharose in 0,1 M PBS dehydriert und in Isopentan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) bei $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 50 s eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Schneiden der koronalen Sektionen mit einer Stärke von $40\text{ }\mu\text{m}$ erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mittels Mikrotom (Leica, Bensheim, Germany). Die Schnitte wurden in einem Kryoprotektivum bestehend aus 25 % Ethylenglycol, 25 % Glycerin und 50 % 0,1 M PBS bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für die Peroxidasefärbungen wurden die Schnitte zunächst mit 0,6 % H_2O_2 behandelt, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Für die BrdU-Färbung wurde die DNS mit 2 M HCl für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Boratpuffer und Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) gewaschen und über Nacht mit dem Erstantikörper (AK) in 0,1 % Triton- X, 3 % Esel- oder Ziegen Serum in TBS (TBS plus) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Für die Substratfärbung wurden die Schnitte, nach erneutem Waschen in TBS und TBS plus, für 2 h bei Raumtemperatur (RT) mit dem biotinierten Zweitantikörper und anschließend für 1 h mit ABC (ABC-Reagenz Vectastain Elite, Vector Laboratories, USA) inkubiert. Als Chromogen wurde Diaminobenzidin (DAB) verwendet (TBS mit 0,01 % H_2O_2 und 0,04 % Nickelchlorid). Folgende Primär-AK wurden genutzt: anti-BrdU, anti-Iba-1, anti-GFAP, anti-TH.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte zur Demaskierung der Antigene für 15 min in 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05 % Tween 20 gekocht, danach mit 0,1 M Borat Puffer gespült und in TBS gewaschen. Primäre und sekundäre AK wurden mit TBS plus verdünnt. Die Schnitte wurden für 24 h bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem Primär-AK inkubiert, mit TBS und TBS plus gewaschen und danach UV-geschützt für 4 h bei RT mit dem Sekundär-AK in TBS plus inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut mit TBS gewaschen und mit Polyvinylalkohol auf Objektträgern eingedeckelt. Folgende Primär-AK wurden genutzt: anti-Nuclear Mitotic Apparatus Protein-AK, anti-Brain-derived neurotrophic factor-AK, anti-CD34-AK, anti-HuD-AK, anti-human-specific major histocompatibility complex-AK, anti-human-specific mitochondria/MAB1273-AK, anti-NG2-AK, anti-Tyrosinhydroxylase-AK, anti-Vimentin-AK, anti-BrdU-AK und anti-von Willebrand Factor-AK.

Als Sekundär-AK wurden genutzt: anti-Ratte/Maus/Hase/Ziege Rhodamin X, anti-Ratte/Maus/Hase/Ziege Alexa647, anti-Huhn/Maus/Hase/Ziege Alexa488.

11. Morphologische Analyse und Quantifizierung

Die topographische Zielgenauigkeit in der Durchführung von Läsion und Transplantation wurden post mortem histo-morphologisch überprüft. Hierzu wurde jeder sechste Gewebsschnitt (das entspricht einem Abstand von $240\text{ }\mu\text{m}$, für TH-Färbungen wurde jeder zwölfte Schnitt gefärbt) von fünf Tieren aus jeder Gruppe DAB-gefärbt. BrdU-positive Zellen wurden mithilfe eines computergestützten Bildsystems (Axio Vision 3.0, 2000, Carl Zeiss, Germany), das über eine Zeiss AxioCam mit einem

Zeiss Axioskop verbunden war, über die komplette rostrocaudale Länge der SGZ ausgezählt. Die Anzahl der ausgezählten Zellen wurde mit sechs multipliziert und somit die Gesamtzahl der BrdU positiven Zellen in der SVZ ästimiert. GFAP-, Iba-1- und TH-positive Zellen wurden mithilfe stereologischer Auswertungsmethoden quantifiziert. Die Messungen wurden mit einem Leica DMRA Mikroskop verbunden mit einer Retiga-2000R Kamera (QImaging, Canada) und einem Computerarbeitsplatz mit der Software Stereo Investigator 7 (MicroBrightField, Williston, VT, USA) durchgeführt. Die Quantifizierung der GFAP- und Iba-1-positiven Zellen fand im unmittelbaren Transplantationsumfeld und in einem spiegelsymmetrischen Areal auf der kontralateralen Seite statt. Es wurden jeweils vier Schnitte, entsprechend einer rostrocaudalen Länge von 920 µm, ausgewertet, wobei die untersuchte Region (engl.: Region of interest, ROI) durch eine annähernd quadratische Fläche um die Transplantationsregion gebildet wurde (Seitenlänge: 3 mm), die mit den lateralen und ventralen Grenzen des Rattenhirns abschloss. TH-positive Zellen wurden in jedem zwölften Schnitt ausgewertet. Hierbei wurden die SN der Läsionsseite und der kontralateralen Seite auf jeweils vier vergleichbaren Schnitten ausgewertet, was einer rostrocaudalen Länge von 1840 µm entspricht.

Die ausgewerteten Regionen wurden jeweils mit einem 2.5 × Objektiv definiert. Die Optical-Fractionator-Methode wurde genutzt, um die Zellen dann bei einer hohen Auflösung (20fach für Iba-1 und GFAP und 10fach für TH) auszuzählen. [39, 40] Die Zellen wurden in den vorgegebenen Counting Frames (dt.: Zählrahmen) ausgezählt, das System kalkulierte danach die Gesamtsumme der Zellen im vorgegebenen Gewebsquader. Die hier angegebenen Auflösungen beziehen sich auf die mittelfristige Studie, für die Angaben der kurz- und langfristigen Studie siehe bitte [34, 36].

Für die Detektion der MSC wurden repräsentative Schnitte aus jeder Gruppe mit den oben genannten human-spezifischen AK gefärbt. Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgt am konfokalen Mikroskop (Leica TCS SP2, Heidelberg, Germany) mit einer 40fachen Auflösung. Auch die Immunfluoreszenzfärbung der SVZ wurde mittels Konfokalmikroskopie quantifiziert. Für jede Gruppe (n = 5), wurden 40 µm dicke Schnitte mit anti-BrdU und anti-HuD angefärbt, sodass Neurogenese bei Co-Eprimierung beider Antigene abgebildet wurde. Auch die weiteren zweifach-, dreifach und vierfach-Färbungen wurden mithilfe des konfokalen Mikroskops analysiert und quantifiziert. Folgende Wellenlängen wurden für den Anregungslaser genutzt: ultraviolett: 405 nm, blau: 488 nm, grün: 532 nm und rot: 635nm. Die Sektionen wurden mit DAPI gegengefärbt, um Zellkerne zu visualisieren.

12. Quantitative Real-Time PCR post Transplantation

Die für eine qPCR vorgesehenen Ratten wurden in tiefer Narkose dekapitiert; die Gehirne wurden innerhalb von 30 s entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Koronale Schnitte mit einer Stärke von 1 mm (zwischen AP: -4,8 und -5,8 mm, gemessen am Bregma) wurden bei -20 °C mit einem Mikrotom (Leica, Bensheim, Germany) angefertigt. Gewebsproben wurden mit einer Mikrostanze (Durchmesser: 1 mm) entnommen. (Vgl. hierzu [41])

Die relativen nigralen Konzentrationen von BDNF- und GFAP-mRNS wurden für vier Tiere aus jeder Gruppe mittels qPCR bestimmt. Die Gewebsproben wurden mit einem Einweg BioMasher (Biolap

products, Bebensee, Germany) homogenisiert. Die Gesamt-RNS wurde mit einem NucleoSpin® RNA/Protein Kit (Machery-Nagel, Düren, Germany) entsprechend den Herstellerangaben entnommen. Anschließend wurden die RNS mit einem Thermal Cycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg, Germany) mithilfe eines High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben zu cDNS transkribiert. Die Gesamt-DNS Konzentration wurde mit einem NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Products, Wilmington DE, USA) Spektrophotometers und einem Computerarbeitsplatz mit der entsprechenden ND-1000 Software (NanoDrop Technologies, Wilmington DE, USA) bestimmt. Für die qPCR wurde die Gesamt-DNS in Nuklease-freiem Wasser auf eine annähernde Konzentration von 100 ng cDNS/µl (± 10 ng/µl) verdünnt. Für die spätere externe Normalisierung wurde die exakte Menge der verwendeten cDNS genutzt. Die qPCR wurde mit einem StepOne real-time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) und einem Reaktionsmix, bestehend aus 2 µl cDNA-Lösung, 7 µl DNase-freiem H₂O, 10 µl TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) und 1 µl BDNF- oder GFAP-TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Beim Vergleich von Gewebeproben unterschiedlicher Spender, insbesondere wenn die RNA aus soliden bzw. festen Gewebeproben entnommen werden soll, stellt die Identifikation eines passenden Haushaltsgens mit einem vergleichbaren Expressionsmuster in der zu untersuchenden Gewebsstruktur eine Herausforderung dar. [42, 43] Daher wurde die Quantifizierung mittels Ct-(cycle-threshold)-Analyse mit externer Normalisierung anhand der Menge der initial genutzten cDNS (= RNS) durchgeführt. [42-44] Die Quantifizierung erfolgte mithilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Fold-Change-Werte wurden auf die kontralaterale Seite der scheintransplantierten Gruppe bezogen.

13. Statistik

Die Analyse der qPCR *in vitro* erfolgte mittels t-Test. Die Verhaltensexperimente wurden mit zweifaktorieller Varianzanalyse mit Messwiederholung und gemischtem Design (mit den Faktoren „Gruppenzugehörigkeit“ als Zwischensubjektfaktor und „Testtag“ als Innersubjektfaktor) untersucht. Die statistische Analyse der Immunhistochemie und der qPCR post Transplantation erfolgt mit zweifaktorieller Varianzanalyse mit gemischtem Design (mit den Faktoren „Gruppenzugehörigkeit“ als Zwischensubjektfaktor und „Hemisphäre“ als Innersubjektfaktor). Als post-hoc-Test wurde ein Holm-Sidak-Test in der mittelfristigen, ein LSD- oder Tamhanes-Test in der kurz- und langfristigen Studie durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und dem Standardfehler (SEM, engl.: standard error of the mean) angegeben.

Ergebnisse

1. Untersuchung der transplantierten Zelltypen hinsichtlich Sekretion, Expression und Migration

*a. Zellviabilität und Differenzierungspotential von aMSC und sMSC *in vitro**

In der Durchflusszytometrie (englisch: fluorescence-activated cell sorting, FACS) konnte gezeigt werden, dass 98,8 % der aMSC vor der Transplantation vital waren. Darüber hinaus exprimierten aMSC

typische Marker für mesenchymale Stammzellen, nämlich CD29 (96,1 %), CD44 (98,9 %), CD90 (98,6 %), CD105 (71,2 %). (Siehe Fig. 2 [35])

Zur Demonstration der Viabilität von sMSC *in vivo* wurden Sphären repräsentativ mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt, um intakte Zellkerne darzustellen. Somit konnten vitale Zellen in gleichem Maß in allen Bereichen der Sphären nachgewiesen werden. Fig. 3A in [35] veranschaulicht eine exemplarische Färbung.

Neben der Zellviabilität wurde auch die Homogenität der Zellen von unterschiedlichen Spendern untersucht. Hier zeigten sich gleiche Phänotypen in immunhistochemischen Färbungen hinsichtlich Vimentin, CD34 und DAPI *in vitro* bei Zellen aller vier Spender. (Siehe Fig. 3A und Fig. 4 [35])

Das Differenzierungspotential der MSC konnte sowohl für die adipogene als auch für die osteogene Zelllinie nachgewiesen werden. Mittels Oil Red O (fettlöslicher, rot färbender Azofarbstoff, Färbung von Triglyceriden in Adipozyten) und Alizarin Red (Färbung von Calcium Phosphat Kristallen in Osteozyten) wurden erfolgreiche Differenzierungen für aMSC und sMSC bei allen Spendern verifiziert. (Siehe Fig. 3D-H in [35])

b. Charakterisierung von aMSC und sMSC *in vitro* mittels qPCR

Auf Ebene der Genexpression konnte im t-Test eine Hochregulierung des Nerve-Growth-Factor-Rezeptors (NGFR), von GDNF sowie von CD49b (Integrin alpha Untereinheit, die sowohl bei der Zelladhäsion als auch bei der Membran-assoziierten Signaltransduktion eine Rolle spielt) für sMSC im Vergleich zu aMSC nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Bei nicht-neuralen Faktoren (c-myc, BGLAP (osteocalcin), RUNX2 (Core-binding-factor Untereinheit alpha-1, assoziiert mit osteoblastärer Differenzierung) wurden keine Unterschiede zwischen den beiden MSC-Gruppen festgestellt ($p > 0,05$). (Siehe Fig. 5 [35])

c. Migration und *in vivo* Charakterisierung

Mithilfe immunhistochemischer Färbung konnten die transplantierten Zellen zu allen Zeitpunkten der Untersuchungen mit unterschiedlichen human-spezifischen Antikörpern *in vivo* nachgewiesen werden. Vergleiche Abbildung 3 in Anlage 3.

In der Kurzzeitstudie wurden MHC-1-positive MSC von zwei Tieren repräsentativ stereologisch im unmittelbaren Transplantationsgebiet ausgezählt; am dritten Tag nach der Transplantation ließ sich eine Überlebensrate von 30,37 % ermitteln. Die MSC exprimierten unter anderem BDNF. (Siehe Fig. 7d und Fig. 8a in [34])

Am 21. Tag nach der Transplantation wurden mittels Antikörpern gegen das humane Nucleus Mitoseapparat Protein (NuMa) sowohl vitale aMSC als auch vitale sMSC nachgewiesen. (Siehe Fig. 13 [35]) Eine Quantifizierung und weitere Spezifizierung der Zellen fand zu diesem Zeitpunkt nicht statt.

In der Langzeituntersuchung wurden die transplantierten Stammzellen mit verschiedenen robusten humanspezifischen Markern immunhistochemisch nachgewiesen (HuMi, MHC-1, CD44). Die MSC wurde zumeist in der Arachnoidea Mater in der Nähe der SN angetroffen und exprimierten CD34 (siehe

Fig. 8a, 8b, 8d, 8f, 8h und 8m in [36]), NG2 (siehe Fig. 8u und 8w in [36]), von-Willebrandt-Faktor (vWF; siehe Fig. 8f und 8i in [36]), und BDNF (siehe Fig. 8p und 8r in [36]), eine Expressierung von Vimentin konnte jedoch nicht mehr nachgewiesen werden.

2. Auswirkungen der Transplantate auf das Mikromilieu, die Degeneration bzw. Neuroprotektion dopaminerger Neurone

a. Kurzfristige Lokalbefunde

Im Vergleich zu den scheinläderten Tieren führte die unilaterale 6-OHDA Läsion zu einer signifikanten Reduktion TH-positiver Zellen in der SN. Es gab einen signifikanten Gruppenunterschied ($F(2,37) = 29,77, p < 0,001$) in der zweifaktoriellen ANOVA. Der Tamhanes-post-hoc-Test zeigte eine signifikant höhere TH-Expression in der scheinläderten Gruppe verglichen mit allen anderen Gruppen ($p < 0,001$), ein Unterschied zwischen den MSC-Gruppen und der scheintransplantierten Gruppe bestand nicht. (Siehe Fig. 11 in [34])

Drei Tage nach der Transplantation konnte in keiner Versuchsgruppe eine Co-Expression von TH/BrdU ausgemacht werden. Zu diesem Zeitpunkt gibt es also keine Hinweise auf eine dopaminerge Neurogenese.

b. Mittelfristige Lokalbefunde

In der Analyse der TH-positiven Zellen in der SN zeigte die zweifaktorielle ANOVA für die Faktoren Gruppe ($F(3,32) = 31,494, p < 0,001$) und Hemisphäre ($F(1,32) = 352,942, p < 0,001$) ANOVA Signifikanzen auf. Ferner ergab sich eine statistisch signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Gruppe und Hemisphäre ($F(3,32) = 24,737, p < 0,001$).

In den immunhistochemischen Färbungen wurde mittels Holm-Sidak-post-hoc-Analyse in allen 6-OHDA-läderten Gruppen eine signifikante Reduktion TH-positiver Zellen auf der Läsionsseite (ipsilateral) verglichen mit der kontralateralen Seite festgestellt ($p < 0,05$). Ferner differierten die Zahlen der ipsilateralen Hemisphären der läderten Gruppen signifikant von der scheinläderten Gruppe ($p < 0,05$). Auf der kontralateralen Seite wurde in der aMSC-Gruppe gegenüber der sMSC-Gruppe ein signifikanter Anstieg TH-positiver Zellen festgestellt ($p < 0,05$). Nichtsdestotrotz konnte kein Unterschied zwischen den MSC-Gruppen und der scheintransplantierten Gruppe ausgemacht werden ($p > 0,05$). (Siehe Fig. 6 [35])

Bei der Untersuchung der BDNF-RNA-Expression wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse für den Faktor Hemisphäre ($F(1,52) = 4,097, p = 0,048$) signifikante Unterschiede aufgezeigt, nicht jedoch für Gruppe ($F(3,52) = 2,306, p = 0,087$). Es ergaben sich keine Hinweise auf Interaktionen zwischen Gruppe und Hemisphäre ($F(3,52) = 1,692, p = 0,180$).

Die post-hoc-Analyse zeigt einen signifikanten Anstieg der BDNF-RNA-Expression in der kontralateralen Hemisphäre der aMSC-Gruppe im Vergleich zur sMSC-Gruppe ($p = 0,004$) und zur scheintransplantierten Gruppe ($p = 0,009$). Auf der ipsilateralen Seite konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. (Siehe Fig. 7 [35])

In der stereologischen Quantifizierung GFAP-positiver Zellen zeigten sich mittels zweifaktorieller ANOVA signifikante Effekte für die Faktoren Gruppe ($F(3,32) = 8.505, p < 0.001$) und Hemisphäre ($F(1,32) = 103.744, p < 0.001$), auch eine Interaktion zwischen beiden Faktoren ($F(3,32) = 4.720, p = 0.008$) wurde deutlich.

In der post-hoc-Analyse wurde in allen Gruppen ein Anstieg der GFAP positiven Zellen auf der Seite des Eingriffs verglichen mit der nativen Seite ($p < 0,05$) aufgezeigt. Auf der ipsilateralen Seite konnten bei beiden MSC-Gruppen erhöhte GFAP Level verglichen mit der 6-OHDA und der scheinladierten Gruppe festgestellt werden ($p < 0,05$), ohne dass sich Unterschiede zwischen den MSC-Gruppen ($p = 0,429$) oder zwischen den nicht-transplantierten Gruppen ($p > 0,05$) zeigten. (Siehe Fig. 8A [35])

Bei der Analyse der GFAP-RNA-Expression mittels zweifaktorieller ANOVA wurden signifikante Effekte für den Faktor Gruppe ($F(3,52) = 6.049, p = 0.001$) deutlich. Es ergaben sich keine Signifikanzen für den Faktor Hemisphäre ($F(1,52) = 3.023, p = 0.088$) sowie keine statistisch signifikanten Interaktionen zwischen Gruppe und Hemisphäre ($F(3,52) = 2.121, p = 0.109$).

Auf mRNA-Ebene wurde post hoc eine signifikant höhere Expression von GFAP in der aMSC-Gruppe festgestellt ($p < 0,05$). Ferner zeigte die ipsilaterale Hemisphäre dieser Gruppe eine signifikant höhere Expression als die aller anderen Gruppen ($p < 0,05$).

Die lokale Immunantwort bzw. Entzündungsreaktion wurde anhand der Iba-1-positiven Mikroglia stereologisch ausgewertet. In der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurden signifikante Differenzen für die Faktoren Gruppe ($F(3,31) = 115.385, p < 0.001$) und Hemisphäre ($F(1,31) = 380.140, p < 0.001$) sowie eine statistisch signifikante Interaktion zwischen den beiden Faktoren ($F(3,31) = 85.712, p < 0.001$) festgestellt.

Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der ipsilateralen Hemisphäre beider MSC-transplantierten Gruppen im Vergleich mit den Gruppen, die keine Zellen erhalten hatten ($p < 0,05$). Zwischen den beiden MSC-Gruppen gab es ferner eine signifikante Differenz mit einer verstärkten Entzündungsreaktion in der Transplantationsregion der sMSC-Gruppe ($p < 0,05$). (Siehe Fig. 11 [35])

c. Langfristige Lokalbefunde

Sechs Monate nach der Transplantation gab es bei der Analyse TH-positiver Zellen in der SN einen signifikanten Gruppeneffekt ($F(2, 25) = 26,61, p < 0.001$). Der LSD-post-hoc-Test zeigte eine signifikant höhere Anzahl TH-positiver Zellen nach MSC-Transplantation verglichen mit Scheintransplantation ($p < 0,001$), das gilt auch für die scheinladierte Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen ($p < 0,001$). (Siehe Fig. 9a-d in [36])

Sechs Monate nach der Transplantation konnte in keiner Versuchsgruppe eine Co-Expression von TH/BrdU ausgemacht werden, zu diesem Zeitpunkt gibt es also keine Hinweise auf dopaminerge Neurogenese.

3. Strukturelle und funktionelle Effekte im Rahmen dopaminergischer Projektionen

a. Motorische Symptome

Im Rotameter-Versuch wurden in den mittelfristigen Versuchsgruppen am achten Versuchstag in den 6-OHDA lädierten Gruppen Durchschnittswerte zwischen 9,630 und 8,936 ipsilaterale Rotationen pro Minute (rpm) erzielt, in der scheinlädierten Gruppe durchschnittlich 0,963 rpm.

In der zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung wurde ein signifikanter Gruppeneffekt ($F(3,41) = 25.192$, $p < 0.001$) mit signifikanten Unterschieden zwischen 6-OHDA lädierten Gruppen und der scheinlädierten Gruppe ($p < 0,05$) aufgezeigt. Allerdings ließen sich keine Signifikanzen zwischen den einzelnen 6-OHDA lädierten Gruppen im Zeitverlauf ($p > 0,05$) in der post-hoc-Analyse feststellen. Neben dem Gruppeneffekt war kein signifikanter Zeiteffekt ($F(1,41) = 3.581$, $p = 0.066$), jedoch eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Gruppe und Testtag ($F(3,41) = 2.894$, $p = 0.047$) erkennbar. Drei Wochen nach der Transplantation wurde eine signifikante Reduktion der durchschnittlichen Rotationszahl in der aMSC-Gruppe gemessen ($p < 0,05$). (Siehe Fig. 9 [35]). Vergleiche hierzu auch Abbildung 2 in Anlage 2.

In den langfristigen Versuchsgruppen wurden eine Woche nach der Läsion durchschnittliche Werte von 2,34 rpm für die MSC-Gruppe, 3,38 rpm für die scheintransplantierte Gruppe sowie 0,52 rpm für die scheinlädierte Gruppe gemessen. In der zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung wurde hier lediglich ein signifikanter Gruppeneffekt gesehen ($F(2,23) = 4,89$, $p = 0,02$). Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den scheintransplantierten Tieren und den anderen Gruppen an allen gemessenen Testtagen ($p < 0,05$), jedoch keine relevante Reduktion der Rotationen innerhalb einer Gruppe. (Siehe Fig. 10b in [36])

b. Hippokampale Neurogenese und Gedächtnisleistung

BrdU-positive Zellen wurden durch die komplette rostrocaudale Länge der SGZ ausgezählt und somit die hippokampale Zellproliferation ermittelt.

Drei Wochen nach der Transplantation konnte eine Signifikanz in der zweifaktoriellen ANOVA für den Faktor Gruppe ($F(3,32) = 3.841$, $p = 0.019$), allerdings nicht für Hemisphäre ($F(1,32) = 0.00139$, $p = 0.971$) oder eine Interaktion ($F(3,32) = 0.701$, $p = 0.558$) gezeigt werden.

Einhergehend mit der stärker ausgeprägten lokalen Entzündungsreaktion (siehe Fig. 11 [35]) und lokalen Dopamindepletion (siehe Fig. 6 [35]) in der sMSC-Gruppe wurde ebenfalls eine signifikant niedrigere Anzahl BrdU-positiver Zellen im Hippokampus dieser Gruppe in Kontrast zur aMSC-Gruppe im Holm-Sidak-post-hoc-Test gemessen ($p < 0,01$). Darüber hinaus waren die absoluten Zahlen neu generierter Neurone im Gyrus dentatus in der sMSC-Gruppe niedriger als in allen anderen Gruppen, die zuvor einer 6-OHDA Läsion unterzogen wurden ($p < 0.01$, $F(3,32)$). (Siehe Fig. 10 [35])

Sechs Monate nach der Transplantation konnte ein signifikanter Gruppeneffekt festgestellt werden ($F(2,16) = 14,7$, $p < 0.001$), im LSD-post-hoc-Test wurden signifikante Unterschiede zwischen den MSC-Gruppen und der scheintransplantierten Gruppe ($p < 0,05$) sowie zwischen der scheinlädierten und der scheintransplantierten Gruppe ($p < 0,05$) deutlich. (Siehe Fig. 6a-d in [36])

In der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung des Radial-Maze-Testes der mittelfristigen Gruppe wurde bei der Analyse des Arbeitsgedächtnisses kein signifikanter Gruppeneffekt gemessen ($F(3,205) = 1,655, p = 0,191$), es ergab sich jedoch ein signifikanter Zeiteffekt ($F(5,205) = 10,449, p < 0,001$), der im post-hoc-Test in der Abnahme der WME vom ersten zum sechsten Testtag in allen Gruppen Ausdruck fand ($p < 0,05$) und auf eine homogene Gedächtnisleistung aller Gruppen hinweist. Es wurde weiterhin eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Gruppe und Testtag ($F(15,205) = 2,649, p = 0,001$) festgestellt.

Interessanterweise wurde am ersten Testtag eine signifikant höhere Anzahl von WME in der aMSC-Gruppe gezählt ($p < 0,05$), die allerdings an späteren Testtagen nicht mehr festzustellen war ($p > 0,05$). Im Hinblick auf das Referenzgedächtnis kam es zu einem äquivalenten Ergebnis, nämlich einer uniformen Abnahme der RME aller Gruppen, sprich ein signifikanter Zeiteffekt ($F(5,212) = 8,639, p < 0,001$). Trotz eines positiven Gruppeneffektes ($F(3,212) = 3,261, p = 0,030$) konnten jedoch keine signifikanten Differenzen an den relevanten ersten und sechsten Testtagen in der post-hoc-Analyse gemessen werden (jeweils $p > 0,05$). Eine signifikante Interaktion wurde ausgeschlossen ($F(15,212) = 0,971, p = 0,487$). (Siehe Fig. 12 [35])

In der langfristigen Gruppe wurde der Radial-Maze-Test am gleichen Testtag durchgeführt, die Ergebnisse wichen allerdings von den Ergebnissen der mittelfristigen Gruppe ab. Im Hinblick auf das Arbeitsgedächtnis wurde eine erfolgreiche Lernleistung über die Testperiode deutlich ($F(5,21) = 8,79, p < 0,001$), außerdem wurde ein signifikanter Gruppeneffekt ($F(10,44) = 2,13, p = 0,04$) mit einer signifikant geringeren Anzahl an WME ab dem vierten Testtag in der MSC-Gruppe und in der scheinladierten Gruppe verglichen mit der 6-OHDA-Gruppe (alle $p < 0,05$) festgestellt. Für das Referenzgedächtnis wurde lediglich ein signifikanter Zeiteffekt ausgemacht ($F(5,21) = 8,73, p < 0,001$).

c. Neurogenese der SVZ-OB-Achse

Drei Tage nach der Transplantation wurde eine signifikant höhere Anzahl BrdU-positiver Zellen in der SVZ der 6-OHDA- und der MSC-Gruppe verglichen mit der scheintransplantierten Gruppe gesehen ($F(1, 23) = 4,40, p < 0,05$). Eine Induktion der Zellproliferation in der SVD durch eine 6-OHDA-Läsion, wie sie hier deutlich wird, wurde bereits früher beschrieben. [45] Ferner wurde die Co-Expression von BrdU/HuD (hinweisend auf neu generierte neuronale Zellen) analysiert und ein signifikanter Gruppeneffekt aufgezeigt ($F(7, 21) = 10,13, p < 0,001$). Im post-hoc-Test wurde eine signifikant höhere Anzahl neuronaler Progenitorzellen verglichen mit allen anderen Gruppen gesehen ($p < 0,01$) sowie eine signifikant niedrigere Zellzahl in der scheintransplantierten verglichen mit der scheinladierten Gruppe. (Siehe Fig. 5a und b sowie Fig. 6 in [34]).

Sechs Monate nach der MSC-Transplantation wurde ein signifikanter Gruppeneffekt bei der Varianzanalyse der ipsilateralen BrdU-positiven Zellzahlen festgestellt ($F(2,25) = 3,73, p = 0,04$). Der LSD-post-hoc-Test zeigte zwar signifikante Unterschiede zwischen Scheinläsion und Scheintransplantation, die mit MSC versorgten Tiere weisen jedoch keine maßgeblichen Unterschiede zu den anderen Gruppen auf (Siehe Fig. 3a in [36]). Bei der Analyse der Co-Expression von BrdU/HuD

wurde erneut ein Gruppeneffekt gesehen ($F(2,25) = 7,17, p = 0.003$). Sowohl die MSC-Gruppen als auch die scheintransplantierte Gruppe zeigten signifikant mehr BrdU/HuD-positive Neurone als die 6-OHDA-Gruppe ($p = 0,003$ bzw. $p = 0,04$; Siehe Fig. 3b in [36]).

Diskussion

Stammzelltherapie eröffnet neue Perspektiven für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen. Vorausgegangene Untersuchungen haben neuroprotektive und neurogene Effekte nach der Transplantation von MSC nachgewiesen. Abhängig vom betrachteten Zeitfenster und vom Studiendesign wurden in dieser Arbeit teilweise differierende Ergebnisse für die untersuchten Zellphänotypen aufgezeigt. Der in der Literatur beschriebene Unterschied in der Wirkung verschiedener MSC-Kulturen [46] präsentiert sich in der vorliegenden Studie als transients mittelfristiger Effekt, der vom Grad der Läsion abzuhängen scheint. Frühere Arbeiten hatten Vorteile der sMSC beim Differenzierungspotential *in vitro*, aber auch beim Zellüberleben und der anti-inflammatorischen Wirkung *in vivo* gezeigt. [31-34, 47] Mit diesen Ergebnissen einhergehend fanden wir eine Hochregulation neurotropher Faktoren der sMSC im Vergleich zu aMSC *in vitro*. Nach der Transplantation allerdings wurden neuroprotektive Effekte in der kurz- und langfristigen Untersuchung gleichermaßen durch beide Phänotypen erzielt, in der mittelfristigen Untersuchung zeigt sich sogar eine Überlegenheit der aMSC-Gruppe.

In allen drei Versuchsparadigmen konnte für beide Zellarten eine homogene Viabilität *in vitro* mittels FACS- und DAPI-Färbung nachgewiesen werden.

Da Hyposmie ein wichtiges Frühsymptom darstellt [7], stand in der Kurzzeitstudie die Untersuchung neurogener Effekte entlang der OB-SVZ-Achse im Fokus. Einhergehend mit den Angaben in der Literatur [48] wurde eine reduzierte Anzahl neuronaler Vorläuferzellen (BrdU- und HuD-positiv) in der SVZ der 6-OHDA-Gruppe gefunden. Die Transplantation von MSC nach der Läsion führte dagegen zu einer Steigerung der neuronalen Vorläuferzellen. Als zugrundeliegender Mechanismus kommt die BDNF-Expression der MSC *in vivo* in Betracht. Die neuronale Differenzierung sowie das Überleben von Progenitorzellen hängen maßgeblich von einem kontinuierlichen BDNF-Spiegel ab. [49-51] Da aktuelle lokale BDNF-Spiegel in der vorliegenden Studie nicht bestimmt wurden, sind weitere Untersuchungen für eine präzisere Interpretation notwendig. Ferner beschränkte sich diese Arbeit auf die SVZ, eine zusätzliche Auswertung des OB sowie ein funktioneller Test zur Verifizierung einer bestehenden Hyposmie ließen hier eine genauere Einschätzung zu.

In der mittelfristigen Untersuchung konnten durch eine immunhistochemische Färbung phänotypisch intakte a- und sMSC im Transplantationsareal nachgewiesen werden.

Signifikante Unterschiede in der TH-Expression wurden lediglich auf der kontralateralen Seite gesehen. Denkbar wäre, dass parakrine Faktoren keine substantielle Grundlage für eine mögliche Protektion aufgrund des massiven Zellverlustes durch die OHDA-Läsion auf der ipsilateralen Seite hatten. Ein Mindestmaß an Restsubstanz könnte hier Voraussetzung für messbare Effekte sein und konnte im vorliegenden Versuch in mittelbarer Angrenzung an das Transplantat erst wieder auf der unbeschädigten

kontralateralen Seite angetroffen werden. Der lediglich kontralateral erhöhte BDNF-RNS-Spiegel nach der sMSC-Transplantation lässt zwei Interpretationen zu: Einerseits könnte auch hier das Maß an Restsubstanz ausschlaggebend sein, sodass dem Transplantat die Stimulation einer lokalen BDNF-Hochregulation zuzuschreiben wäre. Andererseits könnte man von einer direkten Sekretion durch die transplantierten Zellen ausgehen, die dann aufgrund von lokalen Effekten durch die Läsion unterdrückt zu sein scheint. Eine Unterdrückung der BDNF-Exprimierung durch toxische Effekte im Mikromilieu könnte allerdings den Effekt auf der kontralateralen Seite nicht ausreichend begründen (und ist daher unwahrscheinlicher). Unabhängig vom zugrundeliegenden Mechanismus kann der gemessene BDNF-Anstieg als protektiver Mechanismus für dopaminerge Zellen aufgefasst werden. [52, 53]

Der lokale Anstieg GFAP-positiver Zellen nach der aMSC-Transplantation kann als positiver Effekt interpretiert werden. Im Kontext von Schädigungen des ZNS gilt GFAP als Marker für reaktive Astroglia, die einen ubiquitären Abwehrmechanismus infolge von pathologischen Prozessen im ZNS darstellen. [54, 55] Astroglia sind an der Aufrechterhaltung der regulären Hirnfunktion beteiligt, indem sie anti-oxidative Enzyme exprimieren und damit aktiv Neuroprotektion fördern. [56-59] In Tiermodellen für das IPS wurde eine anti-inflammatorische sowie neuroprotektive Wirkung auf dopaminerge Nervenzellen nachgewiesen. [60-62] Im Rahmen der adulten Neurogenese gehen neue Neurone ferner aus GFAP-exprimierenden Zellen hervor. [63-67] Tatsächliche neuroprotektive und neurorestaurative Effekte der Astroglie im aktuellen Versuchsdesign bedürfen allerdings weiterer Untersuchungen. Da GFAP in der aMSC-Gruppe auch auf RNA-Ebene stärker exprimiert wurde, kann hier infolge der gesteigerten Proteinbiosynthese von einem protrahierten GFAP-Effekt ausgegangen werden.

Eine gesteigerte Anzahl von Mikrogliazellen kann dagegen als eine herabgesetzte neuroprotektive Wirkung gesehen werden. [68-71] Eine signifikant höhere Anzahl Iba-1-positiver Zellen wurde nach der sMSC-Transplantation verglichen mit aMSC ermittelt. Da MSC innerhalb großer Zellkonglomerate aufgrund der Distanz zum umgebenden Gewebe einen relativ schlechteren Zugang zu Sauerstoff und Nährstoffen haben, kann es folglich vermehrt zur Apoptose und konsekutiv zur verstärkten Mikroglie kommen. Daneben müssen die bereits *in vitro* festgestellten Unterschiede in der Proteinexpression von aMSC/sMSC als potentielle Ursachen für pro- und anti-inflammatorische Effekte in Betracht gezogen werden. In der Literatur finden sich Hinweise auf eine Beteiligung von Mikroglia an der Pathogenese von IPS sowie an einer Mikroglia-vermittelten Degeneration dopaminerger Neurone. [71, 72] Eine Inhibition der Mikroglia hat im Tiermodell dagegen zu einer verminderten dopaminergen Degeneration geführt. [73] Diese Daten untermauern unsere Ergebnisse.

Hinsichtlich der systemischen und funktionellen Effekte wird eine stabile Homöostase dopaminerger Neurone im Mesencephalon als Stimulator neuraler Vorläuferzellen in neurogenen Regionen des adulten Gehirns betrachtet [74-78] – damit einhergehend nahm die adulte Neurogenese nach der Dopamindepletion ab. [14, 48, 76] In Bezug auf das Gedächtnisdefizit beim IPS wurde gezeigt, dass die hippocampale Neurogenese wesentlichen Einfluss auf (räumliche) Lernprozesse und die Gedächtnisleistung hat. [79] Mnestiche Defizite beim IPS werden in der Literatur durch die

Unterbrechung kortiko-striato-thalamo-kortikaler Schleifen beschrieben, die wiederum durch einen Abfall des striatalen Dopamins begründet wird. [80, 81] Hierbei wird insbesondere von einem Leistungsabfall des Arbeitsgedächtnisses berichtet. [9, 10] Nach der sMSC-Transplantation zeigte sich eine Verringerung der hippocampalen Neurogenese und zunächst eine signifikant erhöhte Anzahl der WME am ersten Testtag. Während der darauffolgenden sechstägigen Testperiode wurden jedoch keine weiteren Unterschiede zu den anderen Gruppen festgestellt, was einer homogenen mnestischen Leistung aller Gruppen entspricht. Die Reduktion der hippocampalen Neurogenese nach der sMSC-Transplantation war möglicherweise nicht ausgeprägt genug, um eine Einschränkung des Arbeitsgedächtnisses zu verursachen. In einer vorangegangenen Studie wurde konsistent gezeigt, dass die intrahippokampale Transplantation von MSC zu einer gesteigerten Neurogenese bei ebenfalls unveränderter Gedächtnisleistung führte. [56]

In der Langzeituntersuchung waren keine unterschiedlichen lokalen und systemisch-funktionellen Auswirkungen der beiden Zellphänotypen nachweisbar.

Die Viabilität der Zellen konnte auch nach sechs Monaten mit drei unterschiedlichen human-spezifischen AK immunhistochemisch bestätigt werden. Außerdem ließ sich eine Migration in die nächstgelegene Arachnoidea mater feststellen, die ein protektives Mikromilieu für lokale und körperfremde Stammzellen bietet und daher Überleben und Differenzierung begünstigt [82-84]. Die MSC exprimierten weiterhin BDNF, was auf eine fortbestehende neurogene und neuroprotektive Eigenschaft der MSC schließen lässt. Es wurden allerdings auch Hinweise auf eine Transdifferenzierung hin zu Perizyten (Exprimierung von NG2, CD43) sowie Endothelien (vWF) gefunden. Ein bedeutendes Protein im Zyotskelett von MSC, Vimentin [85], konnte dagegen nicht mehr nachgewiesen werden, was ebenfalls auf eine Veränderungen der Zelllinie sowie der Plästizität hinweist.

Als Lokaleffekt wurde eine Abmilderung der Depletion dopaminerger Neurone festgestellt. Nach der Transplantation von MSC waren die TH-Zahlen signifikant höher als nach einer Scheintransplantation, das TH-Niveau der scheinlädierten Gruppe konnte durch eine MSC-Transplantation jedoch auch nicht aufrechterhalten werden. Es wurde keine Neurogenese dopaminerger Zellen (Co-Expression von TH und BrdU) gesehen.

Das Studiendesign der Langzeit- und der mittelfristigen Untersuchung sah einen Radial-Maze- und einen Rotameter-Test zum jeweils gleichen Zeitpunkt vor, es kam dabei allerdings zu abweichenden Ergebnissen. Im Rotameter wurde in der Langzeitstudie für alle Gruppen eine gleichbleibende motorische Leistung nach der Transplantation gemessen (mittelfristiger Versuch: Reduktion der Rotationen in der aMSC-Gruppe), im Radial Maze zeigte sich eine signifikante Reduktion der WME in den MSC-Gruppen verglichen mit der scheintransplantierten Gruppe (mittelfristiger Versuch: homogenes Lernergebnis ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen). Als ein potentieller Einflussfaktor für diese Abweichungen sei hier ein Unterschied im Studiendesign der beiden Untersuchungen genannt. Während der mittelfristige Versuch eine Mindestrotationszahl von 5 rpm im ersten Rotameter-Versuch als Einschlusskriterium festlegte, was zu einer durchschnittlichen

Rotationszahl zwischen 9,63 rpm und 8,94 rpm für die 6-OHDA-lädierten Gruppen führte, gab es in der Langzeitstudie keinen solchen Cut-off und eine durchschnittliche Rotationszahl von 3,38 rpm wurde nach der 6-OHDA-Läsion gemessen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Tiere der Langzeituntersuchung durchschnittlich eine weniger stark ausgeprägte Läsion hatten. Das Transplantat traf vermutlich auf eine größere Menge physiologischer Restsubstanz. Leider liegen in diesem Kontext keine histologischen TH-Auswertungen vor, die den gleichen Zeitpunkt abbilden und somit diese These morphologisch belegen könnten.

In der Literatur wird eine Mindestrotationszahl häufig definiert, um sowohl motorisch als auch histologisch von einer sicheren und homogenen Läsion ausgehen zu können. Dieses Kriterium führt zu einem gewissen Ausschuss an Versuchstieren, dessen Notwendigkeit diskutiert werden kann. In der Langzeitstudie konnte gezeigt werden, dass auch bei den klinisch weniger beeinträchtigten Tieren eine deutliche Läsion mittels TH-Färbung nachgewiesen werden konnte.

Beim Rotationsverhalten wäre denkbar, dass ein vergleichsweise hohes Funktionsniveau auf motorischer Ebene bei den Tieren der Langzeituntersuchung durch lokale Einflüsse der MSC nur wenig beeinflusst werden konnte. Protektive Effekte würden aufgrund der noch wesentlich vorhandenen Restsubstanz kaum ins Gewicht fallen. Setzt man diesen Gedanken fort, würden wiederum geringe Unterschiede im Effekt der beiden MSC-Phänotypen unter diesen Bedingungen weitestgehend verborgen bleiben. Bei einem großen Substanzdefekt (mittelfristige Untersuchung) hingegen könnten diese Unterschiede stärker ausfallen. Die Aussagefähigkeit des Rotameter-Versuchs wird allerdings in der Literatur, obwohl er etabliert ist, teilweise kritisch betrachtet, da nur ein Teil der motorischen Symptome betrachtet wird [86, 87], und eine tiefergehende Auslegung der Befunde ohne weitere histologische Untermauerung sehr vage ist.

Anders scheint es sich mit dem Einfluss auf Gedächtnisleistung und hippocampale Neurogenese zu verhalten. Während hier im mittelfristigen Versuch (ausgeprägte Läsion) keine wesentlichen Unterschiede im Arbeitsgedächtnis zwischen den Gruppen trotz Reduktion der hippocampalen Neurogenese nach sMSC-Transplantation gesehen wurden, zeigte sich in der Langzeitstudie (schwache Läsion) eine verbesserte Arbeitsgedächtnisleistung und eine Steigerung der hippocampalen Neurogenese nach MSC-Transplantation im Vergleich zur Scheintransplantation². Als Grundlage für die aufgezeigten Unterschiede kann die Annahme dienen, dass die Transplantation der MSC in ein weniger toxisches Mikromilieu bei weniger ausgeprägter Läsion, die neurogenen Eigenschaften der MSC fördert bzw. weniger stark beschränkt. Es kann also auf eine gesteigerte hippocampale Neurogenese einhergehend mit besserer Leistung des Arbeitsgedächtnisses geschlossen werden. [79] Im Falle der sMSC-Transplantation der mittelfristigen Gruppe kam es möglicherweise zu einer Überlagerung lokaler toxischer Prozesse im Rahmen der Läsion sowie zu einer durch das Transplantat induzierten Entzündungsreaktion. Welche Prozesse genau letztendlich zur verminderten hippocampalen Neurogenese in dieser Gruppe geführt haben, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend

² Die BrdU-Injektionen fanden in beiden Studien zum gleichen Zeitpunkt statt, sodass die Ergebnisse hier trotz unterschiedlicher Versuchsdauer vergleichbar sind.

gesagt werden. Weiterhin sei hier kritisch angemerkt, dass eine einseitige motorische Funktionseinschränkung, egal welcher Ausprägung, durchaus als Confounder im Versuchsdesign des Radial-Maze-Tests infrage kommt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass adipogene MSC ein Potential für regenerative Therapieansätze bei neurodegenerative Erkrankungen, hier beim IPS, bieten. Bis zum klinischen Einsatz gibt es allerdings durchaus noch Spielraum für eine genauere Untersuchung der Zellen und deren Interaktion mit dem Empfängergewebe sowie des optimalen Transplantationsmodus. Die in der vorliegenden Untersuchung deutlich gewordenen Unterschiede treten hauptsächlich in einem der betrachteten Zeitfenster auf und scheinen von der Ausprägung der Läsion abzuhängen. Hier wäre sowohl eine kleinschrittigere Analyse des Längsverlaufs als auch eine Abstufung hinsichtlich der Erkrankungsausprägung (klinisch und paraklinisch) aufschlussreich.

Literaturverzeichnis

1. Hornykiewicz, O., *Imbalance of brain monoamines and clinical disorders*. Progress in brain research, 1982. **55**: p. 419-29.
2. Ehringer, H. and O. Hornykiewicz, [*Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system*]. Klinische Wochenschrift, 1960. **38**: p. 1236-9.
3. Ungerstedt, U. and G.W. Arbuthnott, *Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system*. Brain research, 1970. **24**(3): p. 485-93.
4. Schwarting, R.K. and J.P. Huston, *The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments*. Progress in neurobiology, 1996. **50**(2-3): p. 275-331.
5. Cummings, J.L., *Depression and Parkinson's disease: a review*. Am J Psychiatry, 1992. **149**(4): p. 443-54.
6. Pillon, B., et al., *Cognitive slowing in Parkinson's disease fails to respond to levodopa treatment: the 15-objects test*. Neurology, 1989. **39**(6): p. 762-8.
7. Doty, R.L., *Olfactory dysfunction in Parkinson disease*. Nat Rev Neurol, 2012. **8**(6): p. 329-39.
8. Chaudhuri, K.R., D.G. Healy, and A.H. Schapira, *Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management*. Lancet neurology, 2006. **5**(3): p. 235-45.
9. Baddeley, A., *Working memory*. Science, 1992. **255**(5044): p. 556-9.
10. Perez, V., et al., *Effect of the additional noradrenergic neurodegeneration to 6-OHDA-lesioned rats in levodopa-induced dyskinesias and in cognitive disturbances*. Journal of neural transmission, 2009. **116**(10): p. 1257-66.
11. Zweifel, L.S., et al., *Role of NMDA receptors in dopamine neurons for plasticity and addictive behaviors*. Neuron, 2008. **59**(3): p. 486-96.
12. Zweifel, L.S., et al., *Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(18): p. 7281-8.
13. Hamilton, T.J., et al., *Dopamine modulates synaptic plasticity in dendrites of rat and human dentate granule cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(42): p. 18185-90.
14. Suzuki, K., et al., *Destruction of dopaminergic neurons in the midbrain by 6-hydroxydopamine decreases hippocampal cell proliferation in rats: reversal by fluoxetine*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9260.
15. Lenington, J.B., et al., *Midbrain dopamine neurons associated with reward processing innervate the neurogenic subventricular zone*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2011. **31**(37): p. 13078-87.
16. Marin-Burgin, A. and A.F. Schinder, *Requirement of adult-born neurons for hippocampus-dependent learning*. Behav Brain Res, 2012. **227**(2): p. 391-9.
17. Braak, H., et al., *Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease*. Neurobiol Aging, 2003. **24**(2): p. 197-211.
18. Ubeda-Banon, I., et al., *alpha-Synucleinopathy in the human olfactory system in Parkinson's disease: involvement of calcium-binding protein- and substance P-positive cells*. Acta Neuropathol, 2010. **119**(6): p. 723-35.
19. Pearce, R.K., C.H. Hawkes, and S.E. Daniel, *The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease*. Mov Disord, 1995. **10**(3): p. 283-7.
20. Hoglinger, G.U., et al., *Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease*. Nat Neurosci, 2004. **7**(7): p. 726-35.

21. Lattanzi, W., et al., *Neurotrophic features of human adipose tissue-derived stromal cells: in vitro and in vivo studies*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2011. **2011**: p. 468705.
22. Chi, G.F., et al., *Schwann cells differentiated from spheroid-forming cells of rat subcutaneous fat tissue myelinate axons in the spinal cord injury*. Experimental neurology, 2010. **222**(2): p. 304-17.
23. Kim, J.M., et al., *Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model*. Brain research, 2007. **1183**: p. 43-50.
24. Ashjian, P.H., et al., *In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors*. Plastic and reconstructive surgery, 2003. **111**(6): p. 1922-31.
25. Wei, X., et al., *Adipose stromal cells-secreted neuroprotective media against neuronal apoptosis*. Neuroscience letters, 2009. **462**(1): p. 76-9.
26. Zhang, H.T., et al., *Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: a comparative study*. Cytotherapy, 2012. **14**(10): p. 1203-14.
27. Reid, A.J., et al., *Nerve repair with adipose-derived stem cells protects dorsal root ganglia neurons from apoptosis*. Neuroscience, 2011. **199**: p. 515-22.
28. Allen, S.J., et al., *GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration*. Pharmacology & therapeutics, 2013. **138**(2): p. 155-75.
29. Hellmann, M.A., et al., *Increased survival and migration of engrafted mesenchymal bone marrow stem cells in 6-hydroxydopamine-lesioned rodents*. Neuroscience letters, 2006. **395**(2): p. 124-8.
30. Bouchez, G., et al., *Partial recovery of dopaminergic pathway after graft of adult mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson's disease*. Neurochemistry international, 2008. **52**(7): p. 1332-42.
31. Bartosh, T.J., et al., *Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(31): p. 13724-9.
32. Cheng, N.C., S. Wang, and T.H. Young, *The influence of spheroid formation of human adipose-derived stem cells on chitosan films on stemness and differentiation capabilities*. Biomaterials, 2012. **33**(6): p. 1748-58.
33. Wang, W., et al., *3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2009. **30**(14): p. 2705-15.
34. Schwerk, A., et al., *Human adipose-derived mesenchymal stromal cells increase endogenous neurogenesis in the rat subventricular zone acutely after 6-hydroxydopamine lesioning*. Cytotherapy, 2015. **17**(2): p. 199-214.
35. Berg, J., et al., *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 Hippocampal Neurogenesis and Hippocampal Memory Function when Cultured in Spheroids*. Stem Cell Rev, 2014.
36. Schwerk, A., et al., *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**(4): p. 431-46.
37. Bartosh, T.J. and J.H. Ylostalo, *Preparation of anti-inflammatory mesenchymal stem/precursor cells (MSCs) through sphere formation using hanging-drop culture technique*. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2014. **28**: p. Unit 2B 6.

38. Steiner, B., et al., *Enriched environment induces cellular plasticity in the adult substantia nigra and improves motor behavior function in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease*. *Experimental neurology*, 2006. **199**(2): p. 291-300.
39. Gundersen, H.J., *Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson*. *Journal of microscopy*, 1986. **143**(Pt 1): p. 3-45.
40. West, M.J., L. Slomianka, and H.J. Gundersen, *Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator*. *The Anatomical record*, 1991. **231**(4): p. 482-97.
41. Winter, C., et al., *Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia*. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*, 2009. **12**(4): p. 513-24.
42. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. *Journal of molecular endocrinology*, 2000. **25**(2): p. 169-93.
43. Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. *Journal of molecular endocrinology*, 2002. **29**(1): p. 23-39.
44. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic acids research*, 2001. **29**(9): p. e45.
45. O'Keeffe, G.C., R.A. Barker, and M.A. Caldwell, *Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(18): p. 2888-94.
46. Zavan, B., et al., *Neural potential of adipose stem cells*. *Discov Med*, 2010. **10**(50): p. 37-43.
47. Suon, S., M. Yang, and L. Iacovitti, *Adult human bone marrow stromal spheres express neuronal traits in vitro and in a rat model of Parkinson's disease*. *Brain research*, 2006. **1106**(1): p. 46-51.
48. Hoglinger, G.U., et al., *Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease*. *Nature neuroscience*, 2004. **7**(7): p. 726-35.
49. Lindholm, D., et al., *Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by IGF-1 and the neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4*. *Eur J Neurosci*, 1996. **8**(7): p. 1452-60.
50. Kirschenbaum, B. and S.A. Goldman, *Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(1): p. 210-4.
51. Ahmed, S., B.A. Reynolds, and S. Weiss, *BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors*. *J Neurosci*, 1995. **15**(8): p. 5765-78.
52. Hyman, C., et al., *BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra*. *Nature*, 1991. **350**(6315): p. 230-2.
53. Levivier, M., et al., *Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 1995. **15**(12): p. 7810-20.
54. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. *Trends in neurosciences*, 2009. **32**(12): p. 638-47.
55. Sofroniew, M.V. and H.V. Vinters, *Astrocytes: biology and pathology*. *Acta neuropathologica*, 2010. **119**(1): p. 7-35.

56. Coquery, N., et al., *Intrahippocampal transplantation of mesenchymal stromal cells promotes neuroplasticity*. *Cytotherapy*, 2012. **14**(9): p. 1041-53.
57. Fernandez-Fernandez, S., A. Almeida, and J.P. Bolanos, *Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes*. *The Biochemical journal*, 2012. **443**(1): p. 3-11.
58. Makar, T.K., et al., *Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain*. *Journal of neurochemistry*, 1994. **62**(1): p. 45-53.
59. Calkins, M.J., et al., *The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease*. *Antioxidants & redox signaling*, 2009. **11**(3): p. 497-508.
60. Jakel, R.J., et al., *Induction of the protective antioxidant response element pathway by 6-hydroxydopamine in vivo and in vitro*. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 2005. **87**(1): p. 176-86.
61. Jakel, R.J., et al., *Nrf2-mediated protection against 6-hydroxydopamine*. *Brain research*, 2007. **1144**: p. 192-201.
62. Burton, N.C., T.W. Kensler, and T.R. Guilarte, *In vivo modulation of the Parkinsonian phenotype by Nrf2*. *Neurotoxicology*, 2006. **27**(6): p. 1094-100.
63. Doetsch, F., *The glial identity of neural stem cells*. *Nature neuroscience*, 2003. **6**(11): p. 1127-34.
64. Garcia, A.D., et al., *GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain*. *Nature neuroscience*, 2004. **7**(11): p. 1233-41.
65. Steiner, B., et al., *Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis*. *Glia*, 2006. **54**(8): p. 805-14.
66. Kronenberg, G., et al., *Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli*. *The Journal of comparative neurology*, 2003. **467**(4): p. 455-63.
67. Kempermann, G., et al., *Milestones of neuronal development in the adult hippocampus*. *Trends in neurosciences*, 2004. **27**(8): p. 447-52.
68. Hanisch, U.K., *Microglia as a source and target of cytokines*. *Glia*, 2002. **40**(2): p. 140-55.
69. Little, A.R. and J.P. O'Callaghan, *Astroglia in the adult and developing CNS: is there a role for proinflammatory cytokines?* *Neurotoxicology*, 2001. **22**(5): p. 607-18.
70. Akiyama, H. and P.L. McGeer, *Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions*. *Brain research*, 1989. **489**(2): p. 247-53.
71. Marinova-Mutafchieva, L., et al., *Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease*. *Journal of neurochemistry*, 2009. **110**(3): p. 966-75.
72. Kim, Y.S. and T.H. Joh, *Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease*. *Experimental & molecular medicine*, 2006. **38**(4): p. 333-47.
73. Wu, D.C., et al., *Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2002. **22**(5): p. 1763-71.
74. Baker, S.A., K.A. Baker, and T. Hagg, *Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone*. *The European journal of neuroscience*, 2004. **20**(2): p. 575-9.
75. Freundlieb, N., et al., *Dopaminergic substantia nigra neurons project topographically organized to the subventricular zone and stimulate precursor cell proliferation in aged*

- primates*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2006. **26**(8): p. 2321-5.
76. Winner, B., et al., *Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb*. Experimental neurology, 2006. **197**(1): p. 113-21.
 77. Borta, A. and G.U. Hoglinger, *Dopamine and adult neurogenesis*. Journal of neurochemistry, 2007. **100**(3): p. 587-95.
 78. Coronas, V., et al., *Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone*. Journal of neurochemistry, 2004. **91**(6): p. 1292-301.
 79. Shors, T.J., et al., *Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning*. Hippocampus, 2002. **12**(5): p. 578-84.
 80. Alexander, G.E., M.R. DeLong, and P.L. Strick, *Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex*. Annual review of neuroscience, 1986. **9**: p. 357-81.
 81. Alexander, G.E. and M.D. Crutcher, *Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing*. Trends in neurosciences, 1990. **13**(7): p. 266-71.
 82. Decimo, I., et al., *Meninges: from protective membrane to stem cell niche*. Am J Stem Cells, 2012. **1**(2): p. 92-105.
 83. Nakagomi, T., et al., *Leptomeningeal-derived doublecortin-expressing cells in poststroke brain*. Stem Cells Dev, 2012. **21**(13): p. 2350-4.
 84. Popescu, B.O., et al., *Telocytes in meninges and choroid plexus*. Neurosci Lett, 2012. **516**(2): p. 265-9.
 85. Steinert, P.M. and D.R. Roop, *Molecular and cellular biology of intermediate filaments*. Annu Rev Biochem, 1988. **57**: p. 593-625.
 86. Lundblad, M., et al., *Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease*. Eur J Neurosci, 2002. **15**(1): p. 120-32.
 87. Meredith, G.E. and U.J. Kang, *Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem*. Mov Disord, 2006. **21**(10): p. 1595-606.

Anlage 1: Schematischer Versuchsaufbau der kurz-, mittel- und langfristigen Untersuchung

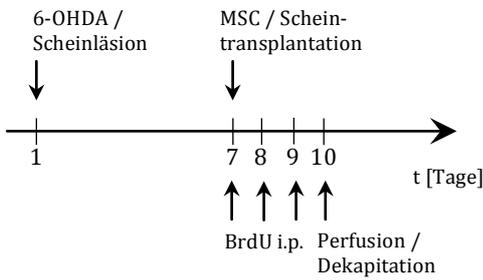


Abbildung 1a: Schematischer Versuchsaufbau der Kurzzeitstudie

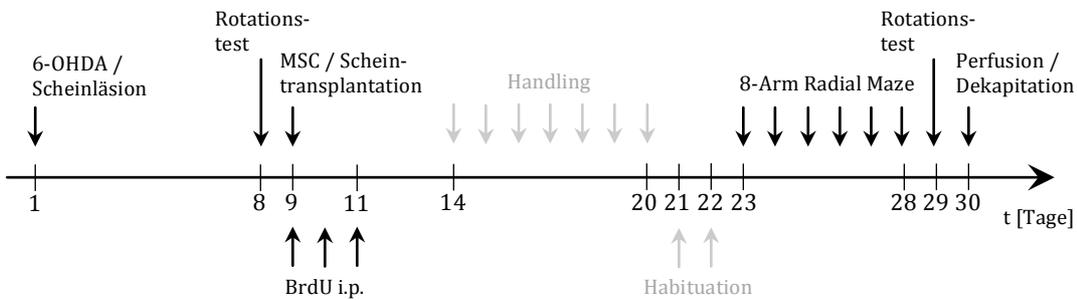


Abbildung 1b: Schematischer Versuchsaufbau der mittelfristigen Studie

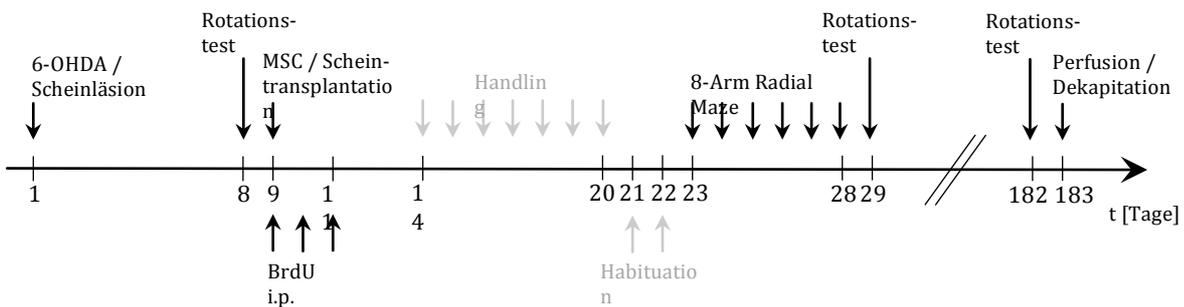


Abbildung 1c: Schematischer Versuchsaufbau der Langzeitstudie

Anlage 2: Ergebnisse des Rotameter-Versuchs

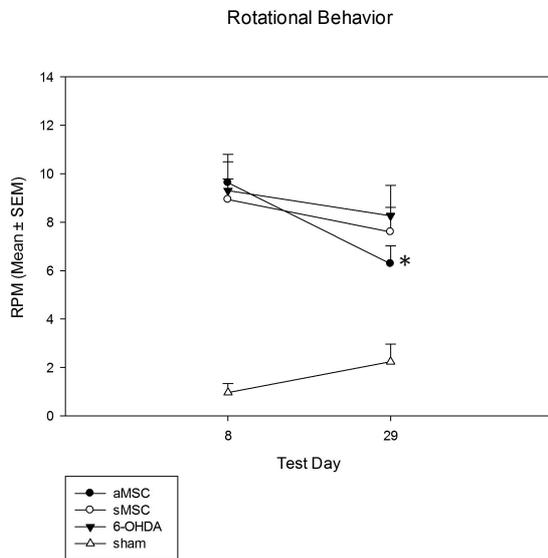


Abbildung 2: Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten. Hinweisend auf eine Linderung der motorisch-extrapyramidalen Symptome, führten in der mittelfristigen Untersuchung lediglich aMSC drei Wochen nach Transplantation zu einer signifikanten Reduktion der rpm ($p < 0,05$).

Anlage 3: Nachweis vitaler MSC in vivo

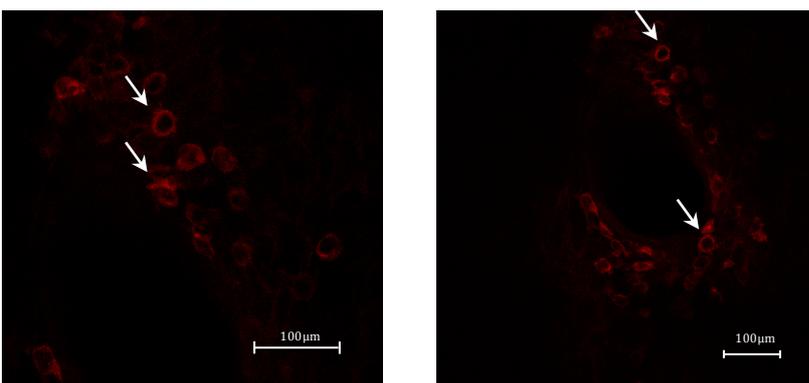


Abbildung 3: Repräsentative NuMa-Färbung. Mittels immunhistochemischer Färbung konnten in allen drei Studien lebende MSC in vivo nachgewiesen werden. Die Abbildung zeigt repräsentativ eine Färbung aus der mittelfristigen Studie (21 Tage nach Transplantation).

Anlage 4: Verwendete Substanzen

Substanz	Abkürzung	Verdünnung und Dosierung	Hersteller
3-Isobutyl-1-Methylxanthin		0,5 mM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
4',6-diamidino-2-phenylindole	DAPI	1:1000	Dianova, Hamburg, Deutschland
6-Hydroxydopamin	6-OHDA	6,5 µg gelöst in 2 µl 0,9 % NaCl-Lösung mit 0,1 % Ascorbinsäure	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika
ABC-Reagenz Vectastain Elite	ABC	9 µl/ml	Vector Laboratories, Vereinigte Staaten von Amerika
Alexa488		1:1000	Life Technologies, Carlsbad, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Alexa647		1:1000	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alizarin-Red-Lösung			Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Allophycocyanin	APC	1:1000	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
anti-5-Bromo-2-deoxyuridin-Antikörper	anti-BrdU	1:500	Harlan Seralab, Deutschland
anti-Brain-derived-neurotrophic-factor-Antikörper	anti-BDNF	1:50	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland
anti-CD34-Antikörper	anti-CD34	1:200	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland
anti-GFAP-Antikörper	anti-GFAP	1:1000	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland
anti-HuD-Antikörper	anti-HuD	1:50	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland
anti-human-specific major histocompatibility complex-Antikörper	anti-MHC-1	1:250	Abcam, Vereinigtes Königreich

anti-human-specific mitochondria/MAB1273-Antikörper	HuMi	1:100	Millipore, Temecula, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
anti-Iba-1-Antikörper	anti-Iba-1	1:500	Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan
anti-NG2-Antikörper	anti-NG2	1:200	Millipore, Temecula, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
anti-Nuclear Mitotic Apparatus Protein-Antikörper	NuMA	1:50	Abcam, Vereinigtes Königreich
anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörper	anti-TH	1:100	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
anti-Vimentin-Antikörper	anti-Vimentin	1:100	Abcam, Vereinigtes Königreich
anti-von Willebrand Factor-Antikörper	anti-vWF	1:200	Millipore, Temecula, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Ascorbinsäure-2-Phosphat		50 µM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
B27 Supplement			GIBCO, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
D-Amphetaminsulfat		2,725 mg/kgKG gelöst in 0,9 % Kochsalzlösung	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika
Dexamethason		0,1 µM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	D-MEM	niedrige Glucose mit GlutaMAX-I	GIBCO, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Epidermaler Wachstumsfaktor	EGF	20 ng/ml	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland
fetales Kalbsserum	FCS	0,1	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2	bFGF	40 ng/ml	Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland
Fluoresceinisothiocyanat	FITC	1:100	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Indomethacin		0,2 mM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Insulin		10 µg/ml	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopentan			Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kollagenase NB4		0,2 IE pro ml Fettgewebe	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
negativ Marker Mix, BD Horizon, live/dead®		1:6000, CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45	Life Technologies, Carlsbad, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Oil-Red-O-Lösung			Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	PFA	4% in 0,1 M PBS	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin		0,01	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Pentobarbital		60 mg/kg	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Vereinigte Staaten von Amerika
Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex-Cyanin-5.5	PerCPCy5.5	1:400	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
phosphatgepufferter Salzlösung	PBS	pH-Wert: 7,4	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Phosphatidylethanolamin	PE	1:100	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Phycoerythrin-Cyanin 7	PECy7	1:2000	BioLegend, San Diego, CA, Vereinigte Staaten von Amerika
Rhodamin X		1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
β-Glycerolphosphat		10 mM	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin		0,0005	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	0,006	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tabelle 1: Verwendet Substanzen inklusive Dosierung bzw. Verdünnung und Herstellerangaben

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Jürgen Berg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *„Effekte sphärischer und einzelschichtkultivierter humaner adipogener mesenchymaler Stammzellen im 6-OHDA-Rattenmodell für Morbus Parkinson: Auswirkungen auf das lokale Mikromilieu, neurogene Regionen, Motorik sowie die Gedächtnisfunktion“* 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Jürgen Berg

Anteilerklärung an den ausgewählten Publikationen

Jürgen Berg hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Berg J**, Roch M, Altschuler J, Winter C, Schwerk A, Kurtz A, Steiner B, *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 Hippocampal Neurogenesis and Hippocampal Memory Function when Cultured in Spheroids*. Stem Cell Rev, 2014.

Beitrag im Einzelnen (Anteil gesamt etwa 80%): Durchführung der stereotaktischen Operationen und der Verhaltensexperimente sowie der transkardialen Perfusion, Durchführung der immunhistologischen Färbungen und der quantitative Real-Time PCR post Transplantation, Erhebung und statistische Auswertung der Daten, Schreiben und Revision des Manuskripts.

Publikation 2: Schwerk A, Altschuler 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**(2): p. 199-214.

Beitrag im Einzelnen (Anteil gesamt etwa 20%): Stereotaktische Operationen, Verhaltensexperimente, transkardiale Perfusion, Revision des Manuskripts.

Publikation 3: Schwerk A, Altschuler J, Roch M, Gossen M, Winter C, **Berg J**, Kurtz A, Akyuz 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**(4): p. 431-46.

Beitrag im Einzelnen (Anteil gesamt etwa 20%): Stereotaktische Operationen, Verhaltensexperimente, transkardiale Perfusion, Revision des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel PD Dr. med. Barbara Steiner

Unterschrift Jürgen Berg

Folgende Originalartikel wurden aus Gründen des Copyright in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht:

Berg J, Roch M, Altschuler J, Winter C, Schwerk A, Kurtz A, Steiner B, *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 Hippocampal Neurogenesis and Hippocampal Memory Function when Cultured in Spheroids*. Stem Cell Rev, 2015. **11**(1):133-49

<http://dx.doi.org/10.1007/s12015-014-9551-y>

Schwerk A, Altschuler 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**(2): p. 199-214.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.09.005>

Schwerk A, Altschuler J, Roch M, Gossen M, Winter C, **Berg J**, Kurtz A, Akyuz 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**(4): p. 431-46.

<http://dx.doi.org/10.2217/rme.15.17>

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

Komplette Publikationsliste

Berg J, Roch M, Altschuler J, Winter C, Schwerk A, Kurtz A, Steiner B, *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 Hippocampal Neurogenesis and Hippocampal Memory Function when Cultured in Spheroids*. Stem Cell Rev, 2014.

Schwerk A, Altschuler 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**(2): p. 199-214.

Schwerk A, Altschuler J, Roch M, Gossen M, Winter C, **Berg J**, Kurtz A, Akyuz 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**(4): p. 431-46.

Danksagung

Ich danke Frau PD Dr. Barbara Steiner sehr für die mühevollen und umfangreichen Betreuung dieser Arbeit, ihre große Unterstützung, Geduld und die intensive Förderung. Ich danke Frau Prof. Dr. Christine Winter für die gründliche und fördernde Mitbetreuung. Großer Dank gilt meiner Mitstreiterin Frau Anne Schwerk sowie der gesamten Arbeitsgruppe, die mir immer hilfsbereit zur Seite standen. Insbesondere möchte ich den technischen Assistentinnen, Renate Winter und Jenifer Altschüler, für ihre Mühe und Geduld danken.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, Rosel Atzert und Hans-Joachim Berg.