

Aus der Klinik für Neurologie  
Zentrum für Nervenheilkunde  
Medizinische Fakultät der Universität Rostock  
(Direktor: Prof. Dr. R. Benecke)

**Biologische Charakterisierung von striatalen  
neurogenen Progenitorzellen der Ratte nach  
Transfektion des  
*ciliary neurotrophic factors*  
und des  
*glial cell line derived neurotrophic factors.***

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades  
„Doktor der Medizin“ (Dr.med.)  
an der medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von  
Sabine Fürstenberg, geb. Peters,  
geboren am 12.05.1978 in Neuruppin.  
Neustrelitz, Juli 2007.

*urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0104-9*

Dekan: Prof. Dr. med. Gebriele Nöldge-Schomburg

1. Gutachter: Prof. Dr. Arndt Rolfs, Klinik für Neurologie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Robert Jaster, Klinik für Innere Medizin, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. Olaf Rieß, Institut für Humangenetik, Universität Tübingen

Tag der Verteidigung: 1. April 2008



# Inhaltsverzeichnis

INAUGURALDISSERTATION.....	1
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>9</b>
<b>Abstract (english).....</b>	<b>11</b>
<b>Einleitung.....</b>	<b>13</b>
<b>Arbeitshypothese .....</b>	<b>19</b>
<b>Methoden .....</b>	<b>20</b>
Arbeiten mit Zellen.....	20
Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	22
Arbeiten mit Proteinen.....	25
Testverfahren .....	28
<b>Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
Metabolische Aktivität .....	32
DNA-Synthese .....	38
Apoptose .....	39
Metabolischer Streß.....	40
Toxischer Streß.....	42
<i>Wnt-5a</i> -Expression .....	44
<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
Metabolische Aktivität .....	53
DNA-Synthese .....	56
Apoptose .....	57
Reaktion auf Stress-Situationen .....	59
Expression eines endogenen Regulatormoleküls.....	62
<b>Anhang A: Materialien .....</b>	<b>67</b>
Puffer und Lösungen.....	67
Oligonukleotide .....	70
Bezeichnung.....	70
Antikörper .....	70
Biochemikalien einschließlich Kits.....	71
Verbrauchsmaterial .....	71
Bezeichnung.....	71
Geräte .....	72
Software .....	72
<b>Anhang B Ergebnisse .....</b>	<b>73</b>
Daten zu Abb. 1a .....	73
Daten zu Abb. 1b .....	73
Daten zu Abb. 1c .....	73
Daten zu Abb. 1d .....	73
Daten zu Abb. 2a .....	74
Daten zu Abb. 2b .....	74
Daten zu Abb. 2c .....	75
Daten zu Abb. 2d .....	76
Daten zu Abb. 3a und 3b .....	76
Daten zu Abb. 4a und 4b .....	79
Daten zu Abb. 5a und 5b .....	82
Daten zu Abb. 6a und 6b .....	84
Daten zu Abb. 6c und 6d .....	86
Daten zu Abb. 7a und 7b .....	89
Daten zu Abb. 7c und 7d .....	92
Daten zu Abb. 7e und 7f.....	94
Sequenz des Intron 1 des Ratten- <i>Wnt-5a</i> .....	98
<b>Anhang C Literatur.....</b>	<b>99</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>117</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>Erklärung .....</b>	<b>118</b>

## ***Abkürzungsverzeichnis***

A	Ampere
ATP	Adenosin-5-triphosphat
BIP	Immunoglobulin heavy chain-binding protein, die schwere Kette eines Immunglobulin bindenden Proteins
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
BCA	Bicinchoninic acid, Chinarindensäure
Bcl-2	B-cell lymphoma protein 2, B-Zelllymphomprotein 2, Apoptosesuppressor
Bcl-X <sub>L</sub>	Bcl-2-related protein, long isoform, Bcl-2 verwandtes Protein, lange Isoform, Apoptosesuppressor
cDNA	Komplementäre DNA
C/EBP	CCAAT/ enhancer binding protein, CCAAT-Verstärker bindendes Protein
CHOP	C/EBP-homologous protein, C/EBP-homologes Protein
Ci	Curie
<i>CNTF</i>	Ciliary neurotrophic factor, ciliärer neurotropher Faktor
<i>CNTFR</i> $\alpha$	<i>CNTF</i> -Rezeptoruntereinheit $\alpha$
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
cpm	Counts per minute, Signale pro Minute
c-ret	<i>GDNF</i> -Rezeptoruntereinheit, Tyrosinkinase und Protoonkogen
CTP	Cytidin-5-triphosphat
d	Tag(e)
d-	Desoxy-
dd-	Didesoxy
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium, Kulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dsh	Dishevelled, Protein der Wnt-Signaltransduktion
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence, verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal regulated kinase, durch extrazelluläre Signale regulierte Kinase = MAPK
EOR	Endoplasmatic reticulum overload response, Stressantwort durch Proteinakkumulation
FACS	Fluorescence cell sorter, Durchflußzytometriegerät
FBS	Fetal bovine serum, fetales Rinderserum
FITC	Fluorescein
x g	Erdbeschleunigung
g	Gramm

gadd 153	Growth arrest and DNA-damage-inducible protein, durch Wachstumsstillstand und DNA-Schaden induzierbares Protein
<i>GDNF</i>	Glial cell line derived neurotrophic factor, neurotropher Faktor aus glialen Zelllinien
GFR $\alpha$ -1	<i>GDNF</i> - Rezeptoruntereinheit $\alpha$ -1, G-Protein-gekoppelt
grp78	78kD glucose regulated protein precursor, Vorläufer des 78kD glucoseregulierten Proteins
gp130	Glykoprotein 130, Bestandteil des <i>CNTF</i> -Rezeptors
GTP	Guanidin-5-triphosphat
h	Stunde
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL6	Interleukin 6
JAK	Janus Kinase
JNK	Jun-N-Terminal-Kinase
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
L	Liter
LEF	Lymphoid enhancer factor, Transcriptionsfaktorfamilie
LIF	Leukemia inhibitory factor, Leukämie inhibierender Faktor
LIF $\alpha$	LIF-Rezeptoruntereinheit $\alpha$
LRP	low density lipoprotein receptor related protein, LDL-Rezeptorverwandtes Protein
MAO-B	Monoaminoxidase B
MAPK	Mitogen activated protein kinase, mitogenaktivierte Proteinkinase = ERK
MEK	MAPK-Kinase/ERK-Kinase
$\mu$	Mikro = $\times 10^{-6}$
m	Milli = $\times 10^{-3}$
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute(n)
MW	Mittelwert
n	Nano = $\times 10^{-9}$
NCAM	Neuronal cell adhesion molecule, neuronales Zelladhäsionsmolekül
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NTP	Nukleotidtriphosphat
OD	Optische Dichte
P	Piko = $\times 10^{-12}$
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
p.c.	Post conceptionem, nach Empfängnis

PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3-Kinase	Phosphoinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
Raf	= MEK-Kinase, Serin-Threonin-Kinase, Protoonkogen
Ras	Rat sarcoma virus related proto-oncogene, GTP-bindendes Protein, ursprünglich aus virusinduzierten Nagertumoren isoliert
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standard error of mean, Standardabweichung der Grundgesamtheit
Src-Kinase	Rous Sarcoma Virus Transforming Gene Product, Protein-Tyrosin-Kinase
STAT	Signal transducer and activator of transcription, Signalüberträger und Transkriptionsaktivator
ST14A	Immortalisierte, striatale Progenitorzelllinie aus Rattenembryonen 14 Tage post conceptionem
TBE	Tris-Natriumborat-EDTA
TCF/	T-cell specific transcription factor, T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
TE	Tris-EDTA
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$ , transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidin-5-triphosphat
TUNEL	Terminal deoxynukleotidyl-transferase (TdT)-mediated FITC-(ddUTP) nick-end-labeling technique, klassische Apoptosenachweismethode
UPR	Unfolded protein response, Stressantwort durch ungefaltete Proteine
UTP	Uridin-5-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
w	With, mit
w/o	Without, ohne

## **Zusammenfassung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung des Einflusses der Transfektion immortalisierter neuraler Progenitorzellen mit den neurotrophen Faktoren *ciliary neurotrophic factor* (*CNTF*) und *glial cell line derived neurotrophic factor* (*GDNF*) auf die biologischen Eigenschaften metabolische Aktivität, DNA-Synthese, Apoptoseaktivität und Stressresistenz, sowie auf die Expression des differenzierungsrelevanten Morphogenes Wnt-5a. Dazu wurden *CNTF*-transfizierte, *GDNF*-transfizierte, scheintransfizierte und nichttransfizierte striatale Rattenzellen vom 14. Embryonaltag, die durch das temperatursensitive SV40 tsA58/U19 Large T Antigen immortalisiert waren (ST14A), miteinander verglichen. Die Zell-Linie ST14A bietet außer ihrer nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit den Vorteil, durch Temperaturerhöhung von 33°C auf 39°C von der Proliferation in die Differenzierung zu Astroglia und vereinzelt Neuronen überzugehen.

Es wurden Unterschiede sowohl zwischen nativen ST14A, *CNTF*-transfizierten und *GDNF*-transfizierten ST14A, als auch zu scheintransfizierten ST14A gefunden. Die Immortalisierung war durch die Transfektion mit den neurotrophen Faktoren nicht beeinträchtigt. In den transfizierten Zellen war zuvor die Transkription und Translation der neurotrophen Faktoren nachgewiesen worden (Weinelt et al., 2003; Pahnke et al., 2004). Für *CNTF* konnte auch die biologische Aktivität des sequenzierten Proteins belegt werden (Weinelt et al., 2003).

Die eigenen Ergebnisse beziehen sich auf die Untersuchung der Proliferation über den <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau, der Stoffwechselaktivität mit dem Wst-1-Test, der Apoptoserate mittels TUNEL-Assay und der Expression von Wnt-5a auf Transkriptions- und Translationsebene. Die wichtigsten Befunde lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Proliferation von ST14A-*CNTF* ist bei 33°C signifikant höher als die aller anderen untersuchten Zellen. Sie sinkt allerdings nach 3 Tagen unter Differenzierungsbedingungen bei 39°C auf das Niveau der nichttransfizierten ST14A ab.
- Die metabolische Aktivität ist in den transfizierten gegenüber den nichttransfizierten und nativen Zellen während der Differenzierung gesteigert, und zwar am stärksten in ST14A-*CNTF*.
- Unter metabolischen und toxischen Streßbedingungen, die durch Serumentzug bzw. Staurosporingabe induziert wurden, sind sowohl die Proliferation als auch die metabolische Aktivität in transfizierten Zellen weniger beeinträchtigt als in nativen und scheintransfizierten Zellen, und zwar am wenigsten in ST14A-*CNTF*.
- Transfizierte Zellen weisen unter Differenzierungsbedingungen im Gegensatz zu nichttransfizierten Zellen einen tendenziellen Abfall der Apoptoserate auf.
- Wnt-5a wird sowohl in transfizierten als auch in nichttransfizierten Zellen transkribiert, translatiert und sezerniert. Der Nachweis gelingt mittels RT-PCR, Western-blot und Durchflußzytometrie.
- ST14A-*CNTF* exprimieren in der Proliferationsphase mehr Wnt-5a als alle anderen untersuchten Zellen.

Die Arbeit zeigt, dass durch die Transfektion neurotropher Faktoren essentielle Eigenschaften der Zelllinie ST14A für eine Transplantation vorteilhaft beeinflusst werden.

Ziel zukünftiger Experimente wird es sein, die erhobenen Befunde an humanem Material zu überprüfen. Dabei sollte die Aufklärung der Rolle von Wnt-Molekülen und Signalwegen für die dopaminerge Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen einen Schwerpunkt bilden. Auf der Basis der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnte ein humanes genetisch modifiziertes Transplantationsmaterial hergestellt und untersucht werden.

## ***Abstract (english)***

It is the aim of the present study to explore the influence of the transfection of immortalized neural progenitor cells with neurotrophic factors *ciliary neurotrophic factor* (*CNTF*) and *glial cell line derived neurotrophic factor* (*GDNF*) on the biological properties metabolic activity, DNA-synthesis, apoptosis and stress resistance as well as on the expression of the morphogen Wnt-5a. For this purpose, the study compared *CNTF*-transfected, *GDNF*-transfected, sham-transfected (mock) and untransfected (native) rat neural progenitor cells derived from the 14<sup>th</sup> embryonic day of striatum (ST14A) that were immortalized by transfection of the temperature sensitive mutant SV40 tsA58/U19 large T Antigen. This cell line has the advantage to be almost indefinitely available and to differentiate into astroglial and neuronal cells upon shifting of the culture temperature from 33°C to 39°C. Previous studies confirmed the expression of the transfected *CNTF* and *GDNF* on transcriptional (mRNA) and translational (protein) level (Weinelt et al., 2003; Pahnke et al., 2004). For *CNTF* the biological activity of the secreted protein could also be detected (Weinelt et al., 2003). Transfection with *CNTF* and *GDNF* does not affect the immortalization and stability of the ST14A cells. However, there are differences concerning the above mentioned biological properties between native, *CNTF*-transfected and *GDNF*-transfected cells as well as to sham-transfected cells. The main results can be summarized as follows:

- The proliferative activity of ST14A-*CNTF* cells as detected by <sup>3</sup>H-Thymidine-incorporation is significantly higher at 33°C than that of all other cell lines investigated. However, under differentiation conditions (39°C) it decreases to the level of native ST14A cells.
- The metabolic activity measured by Wst-1-clearage is higher in *CNTF*- and *GDNF*-transfected cells compared to sham-transfected and untransfected cells under differentiation conditions with ST14A-*CNTF* revealing the highest activity.
- Under metabolic or toxic stress conditions, which are induced by serum withdrawal or staurosporin treatment, proliferative and metabolic activities are less reduced in *CNTF*- and *GDNF*-transfected cells than in native and sham-transfected cells, with ST14A-*CNTF* cells revealing the lowest reduction.
- In contrast to native and sham-transfected cells, *CNTF*- and *GDNF*-transfected cells show a tendency of reduced apoptosis under differentiation conditions.
- Wnt-5a is transcribed, translated and secreted in all cell types investigated as confirmed by RT-PCR, Western blot and flow cytometry.
- ST14A-*CNTF* cells express higher levels of Wnt-5a as compared to all other cell types under proliferation conditions.

In conclusion transfection of neural progenitor cells of ST14A-type with the neurotrophic factors *CNTF* and *GDNF* improves biological properties in view of their transplation in animal models of neurodegenerative diseases. It will be the aim of future experiments to reappraise the results in human

neural progenitor cell lines with focus on the role of Wnt molecules and signal pathways for the dopaminergic differentiation.

## ***Einleitung***

Aufgrund der demographischen Entwicklungen in den Industriestaaten wird erwartet, dass die Erkrankungen des älteren Menschen in der Zukunft immer häufiger auftreten (Dinkel et al., 1997; Diczfalusy, 2002). Dazu gehören in erster Linie degenerative Erkrankungen des Nervensystems. Gegenwärtig sind etwa 250/100.000 Einwohner von der Parkinsonschen Krankheit und 5 bis 10/100.000 Einwohner von der Huntingtonschen Krankheit betroffen (Siderowf, 2001; Kordower et al., 1999).

Die Pathogenese der Parkinson Krankheit ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben der Mehrzahl sporadischer Fälle treten familiäre Parkinsonerkrankungen auf, die auf Mutationen der Gene für PARK 1 bis 12 beruhen. Das hauptsächliche morphologische Korrelat beider Erkrankungsformen ist ein selektiver Untergang von dopaminergen Zellen der Pars compacta der Substantia nigra. Der daraus entstehende Dopaminmangel in den Projektionsgebieten dieser Zellen, Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus und Nucleus subthalamicus führt zu dem charakteristischen klinischen Bild der Erkrankung mit den Kardinalsymptomen Ruhetremor, Rigor und Hypo-/Brady-/Akinese sowie vegetativen und psychischen Störungen (Siderowf, 2001).

Die aktuelle Therapie der Parkinson Krankheit ist symptomorientiert. Sie beinhaltet pharmakologisch hauptsächlich die Anwendung von Levodopa-Präparaten plus nicht ZNS-gängigen Decarboxylaseinhibitoren, ZNS-gängigen Dopaminagonisten, Anticholinergika, Inhibitoren der Enzyme des Katecholaminabbaus MAO-B und COMT, sowie peripher wirksamen Dopaminrezeptorantagonisten. Auch nichtpharmakologische invasive Verfahren wie die thermokoagulatorische Pallidotomie und die tiefe Hirnstimulation (THS) werden angewendet. Die medikamentöse Therapie ist mit unerwünschten Nebenwirkungen belastet, die von Hypotension, Diarrhoe, Nausea, Hepatotoxizität und Hämaturie bis zu Sedation und psychotischer Exacerbation reichen. Trotz einer Verzögerung der Krankheitsprogression und einer Verbesserung der Lebensqualität wird der Krankheitsfortschritt weder durch die Pharmakotherapie noch durch die Elektrotherapie dauerhaft gestoppt. Die Pharmako- und die Elektrotherapie sind ausserdem in der Wirksamkeit begrenzt, da sie überwiegend eine Linderung des Tremors jedoch weniger der Hypokinese und des Rigors bewirken. Die bis zu einer Symptomreduktion von 50 % führende Pallidotomie ist mit einem hohen chirurgischen Risiko von 1 % bis 8 % verbunden (Deep-Brain Stimulation for Parkinson's disease study group, 2001; Marjama-Lyons, Koller, 2001; Witt et al., 2004; Volkmann et al., 2004; Funkiewiez et al., 2004).

Für die genetisch bedingte Huntington-Erkrankung ist eine Insertionsmutation mit sehr hoher Penetranz im IT 15 Gen (Sieradzan, Mann, 2001) auf Chromosom 4p16.3 (Mak, Ho, 2001) verantwortlich. Die instabile Trinukleotid-(CAG)-Expansion führt zu einem abnormal langen

Polyglutaminabschnitt nahe des N-Terminus des Proteins Huntingtin. Dadurch unterliegt das Huntingtin einem erhöhten proteolytischen Abbau mit Freisetzung seiner N-terminalen Polyglutamin-Fragmente. Diese sind toxisch und neigen zu zytoplasmatischer Aggregation. In der Folge transloziert das mutierte Huntingtin in den Zellkern und bildet dort mit intranukleären Proteinen Aggregate, die neurotoxisch, einschließlich apoptoseinitierend wirken (Sieradzan, Mann, 2001). Diese Vorgänge führen zu einer progredienten Degeneration von Neuronen der Basalganglien (Francis et al., 2000). Klinische Folgen sind konstante, unkontrollierbare, choreatische Bewegungen, Verminderung kognitiver Funktionen und weitere psychiatrische Probleme, am häufigsten Persönlichkeitsveränderungen und Depressionen, aber auch psychotische Episoden (Francis et al., 2000; Naarding et al., 2001).

Eine kausale Therapie der Huntington-Erkrankung ist bisher nicht möglich. Die Palliativtherapie stützt sich auf die Gabe von selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren, atypischen Neuroleptika, trizyklischen Antidepressiva und MAO-Inhibitoren, sowie auf physiotherapeutische und pflegerische Hilfen. Diese Maßnahmen zielen auf die Erhaltung der Lebensqualität über einen möglichst langen Zeitraum. Es gelingt jedoch nicht, den Fortschritt der Krankheit aufzuhalten (Naarding et al., 2001; Moskowitz, Marder, 2001).

Beiden Krankheiten gemeinsam ist der selektive Untergang von Neuronen der Basalganglien mit den der jeweiligen Krankheit entsprechenden charakteristischen klinischen Folgeerscheinungen.

Die Entwicklung selbst palliativer Therapien ist für beide Erkrankungen schwierig, da der Wirkort nur schwer zugänglich ist. Nur kleine hydrophile Moleküle sind in der Lage die Blut-Hirn-Schranke in ausreichender Menge zu passieren. Eine direkte Medikamentenapplikation an den Wirkort birgt auch bei einer Intervall-Depotsetzung chirurgische und infektiologische Risiken.

Ein alternativer therapeutischer Ansatz ist die Zellersatztherapie mit neurogenen Vorläuferzellen. Dabei werden zwei Ziele verfolgt. Einerseits sollen Zellen zum Ersatz der untergegangenen Neuronen zur Verfügung gestellt werden, andererseits sollen die Zellen nach Transfektion mit geeigneten Vektoren als Applikatoren neurotropher Faktoren zum Schutz verbliebener Neuronen dienen (Mazurova, 2001; Blits et al., 2000). Zellbasierte Therapien werden für verschiedene neurobiologische Erkrankungen in Erwägung gezogen. Zu ihnen gehören neben den erwähnten neurodegenerativen Erkrankungen auch cerebrovaskuläre Erkrankungen (Schlaganfall), traumatische Schädigungen (Querschnittslähmungen) und demyelinisierende Erkrankungen (Bechmann et al., 2005; Pluchino et al., 2005; Pluchino, Martino, 2005). Dabei werden neben dem direkten Zellersatz auch protektive „Bystander-Effekte“ transplanteder Stamm- und Vorläuferzellen für den therapeutischen Effekt diskutiert (Martino, Pluchino, 2005). Therapieversuche mit der Applikation humaner fetaler neurogener Vorläuferzellen in Form von Geweben und Zellsuspensionen werden seit fast 30 Jahren durchgeführt (Zager, Black, 1988; Widner et al., 1992; Hagell et al., 1999; Hauser et al., 1999; Brundin et al., 2000; Piccini et al., 2000; Mendez et al., 2000; Freed et al., 2001). Dabei bieten Zellsuspensionen gegenüber Geweben die Vorteile einer atraumatischen und von präformierten

Höhlen unabhängigen Transplantationstechnik (Dunnett et al., 1999). Ein nicht unerheblicher Nutzen dieser innovativen Behandlung für die Patienten konnte 2001 in der ersten veröffentlichten Doppel-Blind-Plazebo-Kontroll-Studie (Freed et al., 2001) gezeigt werden.

Da langfristig die experimentelle Erforschung von Therapiemöglichkeiten neuronaler Krankheiten am Menschen ethische Probleme aufwirft (Sacks, 2001; Doerflinger, 1999; Macklin, 2000) und die Arbeit mit humanen embryonalen Stammzellen internationalen Richtlinien (Boer, 1994) und in Deutschland darüber hinaus gesetzlichen Einschränkungen unterliegt (EmbSchG), entsteht die Notwendigkeit der Etablierung von Tiermodellen.

Etablierte Modelle des Morbus Parkinson an der Ratte sind die Läsionierung mit striataler Injektion von 6-Hydroxydopamin (Rodriguez et al., 2001) bzw. Methylphenyltetrahydropyridin (Beal, 2001), während ein Modell des Morbus Huntington an der Ratte durch Läsionierung mit Injektion von Quinolinsäure erzeugt wird (Francis et al., 2000). In diesen Modellen ist es möglich, neurale Vorläuferzelllinien zu untersuchen. Vorläuferzelllinien weisen zahlreiche Vorteile auf, u.a. unbegrenzte Verfügbarkeit, standardisierte Qualität, Langzeitstabilität in vitro, genetische Modifizierbarkeit, reproduzierbare Zelldifferenzierung in gewünschte Zelltypen und Ermöglichung reproduzierbarer Analysen von Signalwegen und deren molekularbiologische und pharmakologische Beeinflussung (Lindvall, Bjorklund, 2004a; Lindvall, Bjorklund, 2004b).

Zur Gewinnung von geeigneten Zellen im Rattenmodell haben Cattaneo und Mitarbeiter 1998 aus Rattenembryonen 14 Tage post conceptionem striatale Progenitorzellen isoliert und zur Immortalisierung mit dem SV40 tsA58/U19 Large T Antigen unter Einschluß eines Neomycinresistenzgens transfiziert (Cattaneo, Conti, 1998). Nach entsprechender Selektion wurden die Progenitorzellen ST14A gewonnen. Sie sind in der Lage, in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur zu proliferieren oder zu differenzieren. Während bei der „permissiven“ Kulturtemperatur von 33°C das tsA58/U19 Large T Antigen sehr stark exprimiert wird und die Zellen proliferieren, findet bei der „nicht-permissiven“ Kulturtemperatur von 39°C, die der physiologischen Temperatur des Rattengehirns entspricht, nur noch eine verminderte Large-T-Antigen-Expression mit Proliferationsarrest und Differenzierungsbeginn statt (Cattaneo, Conti, 1998).

Die ST14A-Zellen wurden morphologisch anhand zytoskelettaler Proteine charakterisiert. Im einzelnen umfaßte dies den Nachweis von (1) *Nestin* und (2) *Neurofilament 160* (NF 160), beide spezifische Zytoskelettproteine für frühe unreife ZNS-Progenitorzellen, von (3) *Neurofilament 200* (NF 200), einem Marker für unreife Neuronen und von (4) *Mikrotubulin-assoziiertes Protein 5* (MAP5), einem frühen Marker der Axogenese (Weinreich, 2004). Ferner wurde der Einfluß der nicht-permissiven Temperatur 39°C und der Einfluß von Retinsäure auf die Ausprägung der genannten Markerexpressionen untersucht. Beide Einflußgrößen ließen eine differenzierungsfördernde Wirkung erkennen (Cattaneo, Conti, 1998; Weinreich, 2004). Der Nachweis von Tyrosinhydroxylase, dem Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese, gelang allerdings nur inkonsistent, am ehesten nach

Kultur bei 39°C (Weinreich, 2004). Sicher konnte dagegen in den 33°C-Kulturen die Expression von Jak2, einer Komponente des zu Proliferation führenden JAK/STAT Weges, nachgewiesen werden (Cattaneo et al., 1996).

Funktionelle Effekte der Expression des tsA58/U19 Large T Antigen, die dem JAK/STAT Weg nachgeschaltet sind sowie die Reaktion der ST14A-Zellen auf exogene Streßfaktoren, die nach Transplantation in läsioniertes oder degeneriertes Gewebe zu erwarten sind, wurden bisher nicht untersucht.

Der Einsatz zellulärer Transplantate zur Therapie neurodegenerativer Krankheiten kann mit mehreren Zielen erfolgen, wobei der Ersatz untergegangener Neuronen und die Applikation neurotropher Faktoren im Vordergrund stehen. Da im Fall der ST14A-Zellen bei Temperaturerhöhung auf 39°C etwa 95 % der Zellen in gliale Richtung und nur etwa 5% zu Neuronen differenzieren (Lundberg et al., 1997), ist ihre Anwendung zunächst stärker auf die Applikation neurotropher Faktoren als auf den mittelfristig ebenfalls angestrebten Ersatz untergegangener Neurone gerichtet. Jüngere Ergebnisse mit Fetalzellen des ventralen Mesenzephalons sprechen für die Möglichkeit einer gezielten Differenzierung neurogener Vorläuferzellen. Beispielsweise kann durch geeignete Kulturbedingungen die Herstellung dopaminergener Neuronen unterstützt werden (Peaire et al., 2003; Storch et al., 2003). Ergebnisse analoger Versuche mit ST14A-Zellen liegen für die dopaminerge Differenzierung (Ehrlich et al., 2001) und für die GABAerge Differenzierung vor (Bosch et al., 2004). Die ST14A-Zellen erwiesen sich ferner als geeignet für die Transfektion mit Genen von Enzymen zur Behandlung von lysosomalen Speicherkrankheiten, wie Galactocerebrosidase bei Morbus Krabbe (Torchiana et al., 1998), und zur Tumorthherapie, wie Cytosindesaminase bei Gliomen (Barresi et al., 2003). Das unterstreicht ihre Bedeutung als Modellzellen für vielfältige Versuche der Zellersatztherapie.

ST14A-Zellen wurden mit Genen der neurotrophen Faktoren *ciliary neurotrophic factor (CNTF)* und *glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF)* retroviral transfiziert (Weinelt et al., 2003; Pahnke et al., 2004).

Der *CNTF* wird unter physiologischen Bedingungen in glialen Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems gebildet. Er stimuliert in den Zielzellen die Expression verschiedener Gene, die das Überleben und die Differenzierung dieser Zellen kontrollieren (Sleeman et al., 2000). Empfänger des *CNTF*-Signals sind beispielsweise sensorische, sympathische, ciliäre und motorische Neuronen. Auch Wirkungen auf Oligodendrozyten, sowie denervierte und intakte Skelettmuskelzellen wurden beschrieben (Sleeman et al., 2000). Die physiologische Bedeutung des *CNTF* wird jedoch weniger in der embryonalen Entwicklung und Reifung neuraler Gewebe als viel mehr in einer Antwort auf Trauma und andere Stressfaktoren gesehen. *CNTF* ist das erste Glied einer Signaltransduktionskette, die über die Bindung an den Rezeptorkomplex aus den Komponenten *CNTR $\alpha$* , *LIF $\alpha$*  und gp130, die Aktivierung des JAK/STAT-Weges, alternativ die Aktivierung des Raf/ERK-Weges zu einer

verstärkten Transkription responsiver Gene führt, die zytoprotektive Wirkungen entfalten. Es wurde ausserdem gezeigt, dass *CNTF* und *CNTF*-Analoga die striatale Neuronenaktivität im Huntington-Tiermodell von Nagern und Primaten stimulieren (Sleeman et al., 2000).

Für die Transfektion der ST14A-Zellen wurde ein Konstrukt aus einem 660-bp-Fragment des Ratten-*CNTF*-Genes mit dem retroviralen Vektor pRetro-on in ST14A-Zellen eingebracht. Aus mehreren mit dem Antibiotikum Puromycin selektierten Klonen wurde ein Klon mit sehr starker Konstruktexpression zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Die Proteinexpression und -Sekretion des *CNTF* wurde an dem ausgewählten Klon mit Western blot und FACS-Analyse qualitativ belegt (Weinelt et al., 2003) und dieser Klon ST14A-*CNTF* durch eine Genchipdatenanalyse näher charakterisiert (Bottcher et al., 2003). Dabei wurde eine selektive Heraufregulierung von Genen der oxidativen Stressantwort gefunden.

Der *GDNF* ist ein Glykoprotein mit transforming-growth-factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) -verwandter Struktur. Er wurde erstmalig aus der glialen Rattenzelllinie B49 isoliert (Lin et al., 1993). Zu den Zielzellen des *GDNF* gehören motorische, sensorische, sympathische, noradrenerge und dopaminerge, cholinerge und serotoninerge Neuronen, wie Purkinjezellen und Neuronen des Plexus myentericus (Bohn, 1999). *GDNF* bindet an einen Rezeptorkomplex aus GFR $\alpha$ -1 und dem proto-oncogen c-ret. Die Wirkung umfaßt sowohl protektive, als auch restaurative Effekte (Bohn, 1999).

Für die Transfektion wurde ein Konstrukt aus einem 660-bp-Fragment des Ratten-*GDNF*-Genes mit dem retroviralen Vektor pRetro-on in ST14A-Zellen eingebracht. Analog zu dem *CNTF*-transfizierten Klon wurde aus mehreren mit dem Antibiotikum Puromycin selektierten Klonen ein Klon mit sehr starker *GDNF*-Konstruktexpression zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Die *GDNF*-Proteinexpression und Sekretion dieses ausgewählten Klones wurde ebenfalls mit Western blot und FACS-Analyse qualitativ belegt und eine Analyse der Genexpression durchgeführt. Diese ergab eine Heraufregulierung von differenzierungsrelevanten Genen (Pahnke et al., 2004).

Die genetische Modifizierung durch die Transfektion könnte in Metabolismus und Funktion der ST14A-Zellen eingreifen. Es erscheint daher wichtig, funktionelle Eigenschaften, wie Stoffwechselaktivität, DNA-Synthese und Apoptose zur Abschätzung der Eignung *CNTF*- bzw. *GDNF*-transfizierter ST14A für in vivo Versuche im Vergleich zu nichttransfizierten ST14A zu untersuchen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Eignung von Progenitorzellen für die Zellersatztherapie ist die Expression von sogenannten Morphogenen. Das sind Moleküle, die eine zentrale Rolle für die Zell-, Gewebs- und Organentwicklung während der Embryogenese spielen. Sie könnten derartige Funktionen auch für Reparatur- und Regenerationsprozesse des adulten Organismus haben.

Eine wichtige Gruppe von Regulatormolekülen der embryonalen Morphogenese ist die Wnt-Familie. Sie wird heute in so genannte kanonische Wnt's, die den  $\beta$ -Catenin-Signalweg aktivieren, und nicht kanonische Wnt's (Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-11), die mehrere  $\beta$ -Catenin-unabhängige Signalwege aktivieren können, unterteilt (Gordon, Nusse, 2006; Mikels, Nusse, 2006).

Wnt sind phylogenetisch hochkonservierte, sezernierte palmylierte Glykoproteine (Cadigan, Nusse, 1997). Derzeit sind mindestens 19 für humane Wnt kodierende Gene bekannt, und mindestens 10 Gene, die für den Rezeptor Frizzled beim Menschen kodieren (Huelsken, Birchmeier, 2001). Wnt-Orthologe in Mensch und Krallenfrosch (*Xenopus*) bestehen zu 84 % aus identischen Aminosäuren (Miller, 2002). Wnt-Moleküle binden als Liganden an komplexe Rezeptoren, die im Falle kanonischer Wnt's aus der Familie der 7-transmembranären Frizzled-Rezeptoren und einem Corezeptor der LRP-Familie (low density lipoprotein receptor related protein) zusammengesetzt sind. Kanonische Wnt-Moleküle sind zunächst als virale Onkogene (Nusse et al., 1991) und Morphogene der frühen Embryonalentwicklung (Rijsewijk et al., 1987) und seit 1989 aus den Untersuchungen karzinomatös transformierter Gewebe, kleinzelliges Bronchialkarzinom, Mammakarzinom und Neuroblastom, als auch in embryonalem und adultem Hirngewebe bekannt (Melino, 1989; Roelink et al., 1990; Schuurin et al., 1989). Eine Rolle des kanonischen Wnt-Signalweges bei neoplastischer Transformation wurde an zahlreichen Beispielen belegt (Polakis, 2000; Karim et al., 2004). Schon 1990 wurde das Vorkommen des kanonischen Wnt-1 in fetalen Hirnzellen der Maus nachgewiesen (McMahon, Bradley, 1990; Gavin et al., 1990) und eine transiente Expression während der Neuralrohrentwicklung vermutet (Roelink, Nusse, 1991). Wnt-Effekte auf nervale Gewebe sind insbesondere die Induktion von Proliferation, Migration, Axonaussprossung, Axonremodellierung und Synaptogenese (Hall et al., 2000; Miller et al., 1999; Lange et al., 2006). Dabei sind z.B. Wnt-1 und Wnt-3a essentiell in die frühe Entwicklung des ventralen Mittelhirns bzw. des Hippocampus involviert (Lie et al., 2005). Auch für die Organisation der neurogenen Nische des Gyrus dentatus (Pozniak, Pleasure, 2006) und die neuronale Entwicklung neuraler Vorläuferzellen (Kasai et al., 2005) sind Wnt-Moleküle von Bedeutung. Eine zentrale Rolle für die Differenzierung embryonaler Mittelhirn-Progenitorzellen zu dopaminergen Neuronen kommt dem Wnt-Molekül Wnt-5a zu (Castelo-Branco et al., 2003; Schulte et al., 2005; Rawal et al., 2006).

Die Erforschung des Vorkommens von Wnt-Molekülen in ST14A könnte interessante Informationen zur biologischen Charakterisierung liefern. Die Expression solcher endogen sezernierten Regulatormoleküle der Embryonalentwicklung und Differenzierung wurde bisher weder in nativen noch in *CNTF*- bzw. *GDNF*-transfizierten ST14A untersucht. Ihre Expression in ST14A könnte die Induktion einer dopaminergen Differenzierung begünstigen. Beim Einsatz in Transplantationsversuchen könnte ihre funktionelle Bedeutung sowohl in Richtung einer Förderung der Differenzierung und Regeneration, aber auch in Richtung einer Onkogenese liegen.

## ***Aufgabenstellung***

Die Transfektion der Gene für die Neurotrophine *CNTF* und *GDNF* in ST14A-Zellen wurde methodisch so durchgeführt, dass keine Kontrolle über den Ort der Integration der Insertion in das Genom bestand. Daher kann eine zufällige transfektionsbedingte Beeinflussung der Funktion anderer Gene möglich sein. Diese durch die Methode der Transfektion bedingten etwaigen Veränderungen müßten sich, soweit sie funktionell relevant sind, in einem Unterschied der Eigenschaften von nativen und transfizierten ST14A zeigen.

Außerdem kämen auch durch die transfizierten Gene selbst bedingte charakteristische Effekte ursächlich für eventuelle Unterschiede zwischen nativen und transfizierten ST14A in Betracht. Soweit solche Effekte eindeutig letzterem zugeordnet werden könnten, wäre dies hinweisend für die Existenz eines autokrinen Loop und die biologische Aktivität der Expressionsprodukte der transfizierten Gene.

Die vorliegende Arbeit soll zeigen, ob es biologische Unterschiede zwischen nativen und transfizierten ST14A gibt. Dabei sollen Untersuchungen durchgeführt werden, die insbesondere die folgenden sich aus den Signaltransduktionswegen von *CNTF* (Sleeman et al., 2000) und *GDNF* (Takahashi, 2001; Airaksinen, Saarma, 2002) ergebenden Fragen beantworten:

- Besteht eine Proliferations- und/oder Metabolismusänderung der transfizierten Zellen?
- Sind Änderungen von DNA-Synthese und Stoffwechselaktivität zwischen transfizierten und nicht transfizierten Zellen zu beobachten?
- Zeichnen sich die transfizierten Zellen durch eine geänderte Streß- und Apoptoseresistenz aus?

Ferner soll herausgefunden werden, ob neben den transfizierten neurotrophen Faktoren eine Expression von embryonalen Regulatormolekülen besteht, was am Beispiel des für die dopaminerge Differenzierung bedeutsamen Morphogens Wnt-5a untersucht werden soll.

## **Methoden**

### **Arbeiten mit Zellen**

#### **Zelllinien**

Die striatalen Progenitorzellen ST14A der norwegischen Sprague-Dwaley Ratte wurden in der Gruppe von Elena Cattaneo (Cattaneo, Conti, 1998) durch Transfektion des Promotors für das Gen des SV40 Large T Antigens immortalisiert. Die transfizierten Zellen sind bei der „permissiven“ Temperatur von 33°C in der Lage zu proliferieren, während sie bei der „nicht-permissiven“ Temperatur von 39°C differenzieren.

ST14A-Zellen wurden mit einem Genkonstrukt des *CNTF* von Sabine Weinelt (Weinelt et al., 2003) retroviral transfiziert und auf die Expression von *CNTF* untersucht. Es konnten 16/38 *CNTF*-überexprimierende Klone identifiziert werden. Ein Klon mit hoher *CNTF*-Expression (Klon 31) wurde für alle weiteren Versuche und Analysen ausgewählt. Ferner wurde für einige Versuche Klon 13 (ebenfalls mit hoher *CNTF*-Expression) vergleichend eingesetzt.

Weitere ST14A-Zellen wurden mit einem Genkonstrukt des *GDNF* von Beke Schubert (Pahnke et al., 2004) retroviral transfiziert und auf die Expression des *GDNF* untersucht. Diese Versuche ergaben 17/35 *GDNF*-überexprimierende Klone. Ein Klon mit hoher *GDNF*-Expression (Klon B4) wurde für alle weiteren Versuche und Analysen ausgewählt. Für einige Versuche wurden die Klone A3 und E2, beide mit geringer bzw. nicht nachweisbarer *GDNF*-Expression, vergleichend eingesetzt.

Zur Kontrolle wurden ST14A-Zellen außerdem mit einem retroviralen Vektor ohne Gen-Insertion mittels Elektroporation scheintransfiziert. Die Stabilität dieser Transfektion wurde durch permanenten Puromycin-Selektionsdruck in der Kultivierung sichergestellt. Der daraus entstandene gepoolte Klon wurde als „ST14A-mock“ bezeichnet.

#### **Zellkultivierung**

Die Zellen werden als Monolayer in serumhaltigem, komplettem Kulturmedium<sub>(L1)</sub> in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre bei 5 % CO<sub>2</sub> und 2 verschiedenen Temperaturen, der permissiven Temperatur von 33°C bzw. der nicht permissiven Temperatur von 39°C, kultiviert. Bereits bei der Zellkultivierung bei 33°C ließ sich regelmäßig beobachten, dass im Vergleich zu nichttransfizierten Zellen eine Konfluenz der Kulturgefäße am schnellsten durch *CNTF*-transfizierte Zellen und am langsamsten durch *GDNF*-transfizierte Zellen erreicht wurde. Scheintransfizierte Zellen unterschieden sich darin nicht von nativen Zellen.

Das Volumen des Kulturmediums<sub>(L1)</sub> variiert zwischen 100 µL in 96-well-Platten<sub>(V1)</sub> und 20 mL in 185-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen<sub>(V4)</sub>.

Dem Kulturmedium der Klone ST14A-mock und ST14A-*GDNF* wird zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks permanent das Antibiotikum Puromycin<sub>(B1)</sub> in einer Konzentration von 3 µg/mL zugesetzt. ST14A-*CNTF* wird alle 4 Wochen für 3 Tage in puromycinhaltigem (3 µg/mL) Medium<sub>(L1)</sub> kultiviert, da hier eine stabilere Transfektion vorliegt.

### **Zellernte**

Die adhärent wachsenden Zellen werden bei Konfluenz mit der Trypsin/EDTA-Methode geerntet. Das Kulturmedium wird dabei vorsichtig abgesaugt, Mediumreste mit kalter phosphatgepufferter Saline (PBS<sub>(L3)</sub>) abgespült und die Zellen mit Trypsin/EDTA<sub>(L4)</sub> in Volumina zwischen 50 µL (für 96-well-Flachbodenplatten) und 5 mL (für 185-cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen) 8 bis 10 min bei 37°C unter mikroskopischer Kontrolle inkubiert. Anschließend wird zur Inhibition des Trypsins Kulturmedium<sub>(L1)</sub> im Überschuß (doppeltes Volumen der Trypsin/EDTA-Menge) zugegeben.

Die Zellen werden einmal in Kulturmedium<sub>(L1)</sub> gewaschen, gezählt und auf von den weiteren Versuchen abhängige Konzentrationen eingestellt.

### **Zellzählung**

Die Zellen werden in 1 mL Kulturmedium<sub>(L1)</sub> homogen resuspendiert. 10 µL Zellsuspension wurden (evt. nach vorheriger Verdünnung mit Kulturmedium<sub>(L1)</sub>) mit 10 µL Trypanblau-Lösung<sub>(L5)</sub> gemischt und in eine Bürker-Zählkammer<sub>(G1)</sub> gefüllt. Gezählt werden die in 25 Kleinquadraten befindlichen ungefärbten, vitalen Zellen. Dieser Wert multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor unter Berücksichtigung der Trypanblauverdünnung und 10.000 ergibt die Anzahl vitaler Zellen in 1 mL.

### **Zellagerung**

Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wird die konfluente Zellkultur einer 100-mm-Petrischale<sub>(V3)</sub> geerntet, das Zellpellet in 1 mL Gefriermedium<sub>(L6)</sub> aufgenommen und in ein Kryoröhrchen<sub>(V5)</sub> überführt. Das Einfrieren erfolgt in einem geeigneten Isolierbehälter, z.B. mit Zellstoff ausgestopfter Blechdose, mindestens 1 Tag bis höchstens 7 Tage bei – 80°C. Danach werden die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **Rekultivierung**

Die eingefrorenen Zellen werden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, mit 10 mL kaltem Kulturmedium<sub>(L1)</sub> gemischt und zentrifugiert (600 x g, 7 min, RT). Nach Absaugen des

Überstandes wird das Zellpellet in 1 mL Kulturmedium<sub>(L1)</sub> resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf zwei im Brutschrank vorgewärmten 60-mm-Kulturschalen<sub>(V2)</sub> mit je 5 mL Medium<sub>(L1)</sub> aufgeteilt. Nach einem Tag werden durch einen Mediumwechsel tote Zellen aus der Kultur entfernt.

Die speziellen Kulturbedingungen für funktionelle Tests werden bei den Testbeschreibungen angegeben.

## Arbeiten mit Nukleinsäuren

### Extraktion von DNA

Die Extraktion von DNA aus Zellen erfolgt nach Angaben des Herstellers mit dem High Pure PCR Template Preparation Kit<sub>(K1)</sub> der Methode nach Vogelstein und Gillespie folgend (Vogelstein, Gillespie, 1979). Dabei werden die Zellen in Gegenwart des Nukleaseinhibitors Guanidinhydrochlorid mit Proteinase K lysiert. Die DNA bindet an Glasfasern, die sich im Filter der zum Kit gehörigen Röhrchen befinden. Mit einer Serie von Waschschrritten wird sie von allen anderen Zellbestandteilen gereinigt. Zuletzt erfolgt die Eluierung mit einem salzhaltigen Puffer, Aufnahme in Aqua bidestillata und Lagerung bei 4°C.

### Extraktion von RNA

Zur Gewinnung von RNA wird die Einzelschritt-Flüssigphasenseparation angewendet (Chomczynski, Sacchi, 1987). Alle RNA-Präparationsschritte werden mit autoklavierten RNase-freien Geräten (Pipettenspitzen, Reaktions- und Glasgefäße) durchgeführt, wäßrige Lösungen mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt.

Die Zellen einer konfluenten 100-mm-Petrischale werden nach Ernte und Zählung in RNase-freie Röhrchen<sub>(V9)</sub> überführt. Durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff werden die Zellmembranen aufgebrochen. Anschließend werden die gefrorenen Zellen bis zum Auftauen des Zellpellets mit 200 µL Trizol<sub>(B2)</sub> versetzt. Durch Zentrifugation (700 x g, 5 min, 4°C) und Überführung in ein neues Röhrchen werden verbliebene Membranfragmente entfernt. Dann werden 200µL PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> und 20% des Suspensionsvolumens Chloroform<sub>(B3)</sub> dazugegeben. Nach 30 s Vortexen wird die Suspension 3 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation (40.000 x g, 15 min, 4°C) entstehen nun 3 Phasen.

Die obere wässrige Phase enthält die RNA, die mittlere weiße Phase enthält Proteine und die untere rote Phase enthält Proteine, DNA und Trizol. Sehr vorsichtig wird die obere Phase ohne Kontamination mit Proteinen in ein neues Röhrchen<sub>(V9)</sub> überführt. In dieses Röhrchen werden 500µL Isopropanol<sub>(B4)</sub> langsam am Rand herunterlaufend hineinpipettiert.

Anhand langsam aufsteigender Gasblasen kann der Beginn der RNA-Fällungsreaktion beobachtet werden. Die weitere Ausfällung der RNA findet bei  $-20^{\circ}\text{C}$  über Nacht statt.

Nach Zentrifugation ( $40.000 \times g$ , 30 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und Abpipettieren des Überstandes bleibt am Boden des Röhrchens ein RNA-Pellet zurück. Durch Zugabe von  $200 \mu\text{L}$  70%-igem Ethanol und Zentrifugation ( $40.000 \times g$ , 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wird das RNA-Pellet einmal gewaschen.

Anschließend kann die RNA nach 10-minütigem Lufttrocknen vorsichtig in  $55 \mu\text{L}$  autoklaviertem DEPC-Wasser<sub>(L7)</sub> gelöst und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### **Konzentrationsbestimmung von RNA**

Von den  $55 \mu\text{L}$  RNA-Lösung werden  $5 \mu\text{L}$  entnommen und mit  $95 \mu\text{L}$  autoklaviertem DEPC-Wasser<sub>(L7)</sub> (1:20) verdünnt. Die Konzentration der RNA der verdünnten RNA Lösung wird mit dem Photometer<sub>(G7)</sub> nach Angaben des Herstellers durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Aus dem Produkt des Verdünnungsfaktors (20) und dem Meßwert des Photometers ergibt sich die RNA-Konzentration der verbliebenen  $50 \mu\text{L}$  RNA-Lösung in  $\mu\text{g}/\text{mL}=\text{ng}/\mu\text{L}$ . Je nach Ergebnis wird die RNA-Lösung so verdünnt, dass Aliquots von  $500 \text{ ng}/\mu\text{L}$  oder  $1.000 \text{ ng}/\mu\text{L}$  bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### **Reverse Transkription**

Je Ansatz werden  $1.000 \text{ ng}$  RNA in ein RNase-freies Röhrchen pipettiert. Das Volumen der Probe wird mit autoklaviertem DEPC-Wasser<sub>(L7)</sub> auf  $9 \mu\text{L}$  aufgefüllt. Anschließend werden  $2 \mu\text{L}$  Hexanukleotide<sub>(B5)</sub> ( $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) zugegeben und 10 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Sofort danach wird die Lösung 2 min auf Eis gestellt. Es werden  $9 \mu\text{L}$  frischer Mastermix<sub>(L8)</sub> dazupipettiert und zunächst 10 min bei Raumtemperatur danach 50 min bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Dann wird die gewonnene cDNA 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Mit  $15 \mu\text{L}$  Aqua ad injectionem wird das Volumen auf  $35 \mu\text{L}$  ergänzt. Es resultiert eine Endkonzentration der cDNA von etwa  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ .  $5 \mu\text{L}$  dieser cDNA werden für eine Kontroll-PCR, die das House-keeping  $\beta$ -Actin mit dem Primerpaar 3180/3181 nachweist, eingesetzt und der Rest in 3 Aliquots von je  $10 \mu\text{L}$  bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **PCR**

Auf den Boden dünnwandiger  $0,2 \text{ mL}$  Reaktionsröhrchen<sub>(V6)</sub> werden  $2 \mu\text{L}$  Primer ( $10 \mu\text{M}$ ) pipettiert. Darüber werden  $10 \mu\text{L}$  Wachs<sub>(V7)</sub> gegeben. Unmittelbar danach wird das Reaktionsröhrchen auf Eis gestellt. Es werden  $18 \mu\text{L}$  Mastermix<sub>(L9)</sub> und  $5 \mu\text{L}$  DNA ( $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) dazupipettiert, so dass ein Gesamtreaktionsvolumen von  $25 \mu\text{L}$  resultiert. Das optimierte Thermocyclerprogramm wird entsprechend dem benutzten Primerpaar gewählt. Die Primersequenzen für das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin und für *Wnt-5a* und die zugehörigen Thermocyclerprogramme sind im Anhang A aufgeführt. Nach Ablauf der Reaktion im Thermocycler<sub>(G3)</sub> werden die PCR-Produkte bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## **Agarose-Gel-Elektrophorese**

Zum gelelektrophoretischen Nachweis der PCR-Produkte wird ein 2%-iges Agarosegel (0,58g Agarose, 25 mL TBE<sub>(L9)</sub>, 1 µL Ethidiumbromid) mit 2 µL 6 x GLP<sub>(L10)</sub> und 3 µL PCR-Produkt beladen. Die Auftrennung der DNA erfolgt bei 96 V innerhalb von 30 min. Unter UV-Licht<sub>(G4)</sub> wird das PCR-Produkt sichtbar gemacht und fotografiert<sub>(G5)</sub>. Als Molekulargewichtsmarker dienen Marker VI<sub>(B6)</sub> und Marker VII<sub>(B7)</sub>.

## **Sequenzierung**

### **Prinzip**

Nach der Kettenterminationsmethode (Sanger et al., 1977) wird in einem zyklischen Verfahren, aus Denaturierung, Annealing der Sequenzierprimer, Extension und Termination, mit Hilfe der DNA-Polymerase ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Die zu sequenzierenden PCR-Produkte müssen dazu eine dem Sequenzierprimer komplementäre Startsequenz enthalten. Üblicherweise werden Strang und Gegenstrang sequenziert und dazu die universell einsetzbaren Sequenzierprimer M13 und M13-revers verwendet. Die Extension einer neuen Nukleotidkette wird durch Didesoxynukleosidanaloga (ddNTP) unterbrochen. Da das Fehlen der 3'-OH-Gruppe die nächste Phosphodiesterbindung unmöglich macht, ist das letzte Nukleotid des 3'-Endes der entstehenden DNA-Fragmente immer ein ddNTP. Das Verhältnis von Desoxynukleosiden (dNTP) zu Didesoxynukleosiden (ddNTP) wird so gewählt, dass statistisch an jeder Stelle der wachsenden Nucleotidkette ein ddNTP eingebaut wird. Dazu werden je DNA-Strang und Richtung vier parallele Reaktionen angesetzt, die spezifisch durch jeweils einen ddNTP-Typ unterbrochen werden.

Die vier Arten von Kettenendstücken lassen sich ihrer Größe entsprechend in getrennten Spuren im Polyacrylamidgel auftrennen. Zur Detektion der Fragmente sind die Sequenzierprimer am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert, der mit einem Argonlaser zur Fluoreszenz angeregt und detektiert wird.

### **Isolierung von PCR-Produkten**

In Vorbereitung auf die Sequenzierung werden die Amplifikate einer PCR aus der PCR-Reaktionslösung nach der Hochsalzmethode unter Verwendung des Qiaquick Spin Purifikation Kit<sub>(K2)</sub> entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Anschließend befindet sich das gereinigte Amplifikat in Aqua bidestillata und wird bei 4°C gelagert.

### **Sequenzierreaktion**

Nach Angaben des Herstellers wird die Sequenzierung mit dem „Thermosequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza dGTP“<sub>(K3)</sub> durchgeführt.

Dazu wird in 2 x vier Reaktionsgefäße 200 bis 500 ng der zu sequenzierenden DNA auf Eis mit folgenden Komponenten gemischt:

- 1 bis 2 pmol FITC-markierter Sequenzierprimer M13 Universal bzw. M13-reverse
- Nukleotidgemisch (2  $\mu$ L dATP + 2  $\mu$ L ddATP, analog dTTP, dCTP, dGTP) mit der enthaltenen Menge Thermostable DNA-Polymerase,
- 7-Deaza-dGTP nur im dGTP/ddGTP-Gemisch zur Verhinderung von Artefakten

Nach Ablauf des Thermoprogramms gemäß den Herstellerangaben wird die Sequenzierreaktion mit 5  $\mu$ L Formamid/EDTA-Lösung in Gelladepuffer, die ebenfalls Bestandteil des Kits ist, gestoppt. Die Proben werden 3 min bei 92°C denaturiert.

#### **PAGE**

Die Reaktionsprodukte werden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und automatisch mit dem Sequenzer A.L.F. <sub>(G6)</sub> sequenziert.

#### **Fragmentanalyse**

Die analysierten DNA-Sequenzen werden unter Verwendung der Software Chromas<sub>(S1)</sub> in einem Chromatogramm dargestellt, in dem die den vier Basen zugeordneten Peaks farblich voneinander unterschieden sind.

## **Arbeiten mit Proteinen**

### **Extraktion von Proteinen**

#### **Intrazelluläre, lösliche Proteine**

Zur Herstellung von Extrakten für den Western-blot-Nachweis nicht membrangebundener Proteine wird nach Zellernte und -zählung die Zellsuspension in 1,5 mL Reaktionsröhrchen<sub>(178)</sub> überführt. Durch Zentrifugation (200 x g, 5 min, RT) und Absaugen des Überstandes wird das Medium vom Zellpellet entfernt. Mit 100  $\mu$ L RIPA-Puffer nach P70<sup>S6k</sup>-Assay<sub>(L12)</sub> (Jaster et al., 1997) je 3 x 10<sup>6</sup> Zellen werden die Zellen bei 4°C lysiert. Die schweren Membranbestandteile werden abzentrifugiert (17.000 x g, 5 min, RT) und der Überstand weiterverwendet. Innerhalb von 12 Stunden (Halbwertszeit der Proteaseinhibitoren des RIPA-Puffers) nach Aufnahme des Zellpellets in den RIPA-Puffer<sub>(L12)</sub> wird die Konzentration der Proteine bestimmt und die Probe mit vierfachem Laemmli-Puffer<sub>(4 x L13)</sub> auf eine Konzentration von 5  $\mu$ g/ $\mu$ L eingestellt. Durch Denaturierung 5 min bei 95°C werden sämtliche Proteasen und Proteaseinhibitoren inaktiviert. In diesem Zustand werden die Proteinproben bei – 20°C gelagert.

#### **Membranständige Proteine**

Extrakte für den zusätzlichen Nachweis membrangebundener Proteine werden nach dem gleichen Schema hergestellt, jedoch unter Auslassung der Entfernung der

Membranbestandteile. Dadurch wird die Proteinprobe insgesamt inhomogener und die Konzentrationsangabe ungenauer.

### **Extrazelluläre, lösliche Proteine**

Zur Herstellung von Extrakten für den Nachweis sezernierter Proteine aus Zellkulturüberständen werden die Zellen 24 h in modifiziertem (farblosem) serumfreiem, adaptiertem Kulturmedium<sub>(L2)</sub> (Cattaneo et. al.) gezüchtet. Der Kulturüberstand wird in ein 15-mL-Zentrifugenröhrchen<sub>(V13)</sub> überführt und zentrifugiert (1000 x g, 5 min, RT), um tote Zellen und deren Trümmer abzutrennen. Der Überstand wird weiterverarbeitet. Die Konzentration der Proteine mit einem Molekulargewicht über 5.000 Da wird mit einem Vivaspin 6 Konzentratoren<sub>(V14)</sub> etwa 25-fach erhöht. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration werden die Kulturüberstandsproteinproben mit vierfachem Laemmli-Puffer<sub>(4 x L13)</sub> auf eine Konzentration von 1,5 µg/µL eingestellt und zur Inaktivierung der Proteasen 5 Minuten bei 95°C denaturiert. In diesem Zustand werden die Proteinproben bei – 20°C gelagert.

### **Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Konzentration der Proteine im Lysat wird photometrisch nach der Methode von Smith (Smith et al., 1985) durchgeführt. Dabei werden durch Peptidbindungen in einer Biuretreaktion Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu Cu<sup>1+</sup>-Ionen reduziert. In einer nachfolgenden Reaktion komplexieren die Cu<sup>1+</sup>-Ionen mit Chinarindensäure (Bicinchoninic acid = BCA), was sich durch einen Farbumschlag nach Rot zeigt, der bei 562 nm meßbar ist.

Aus vier Verdünnungsstufen des Zelllysates werden mit dem BCA Protein Assay kit<sub>(K4)</sub> am Photometer<sub>(G8)</sub> unter Verwendung der Herstellersoftware easy-win-fitting<sub>(S2)</sub> die Proteinkonzentrationen anhand einer Standardreihe bestimmt. Die Meßwerte der vier Verdünnungen werden mit dem zugehörigen Verdünnungsfaktor multipliziert, woraus Mittelwert und Standardabweichung errechnet werden. Die Standardabweichung diente über die Einschätzung des methodischen Fehlers hinaus auch als Maß für die Homogenität des Zelllysates.

### **Western blot**

Die Auftrennung der Proteingemische wird durch eine SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese bei 150 - 200 V für 1 - 1.5 h unter Verwendung einer Criterion-Cell<sub>(G9)</sub> und eines Tris-HCl-Polyacrylamidgels<sub>(V15,V16)</sub> in Elektrodenpuffer<sub>(L14)</sub> durchgeführt. Die Konzentration des benutzten Fertiggels wird je nach Zielstellung des Versuches variiert und ist im Kapitel Ergebnisse aufgeführt. In eine Tasche des Gels werden üblicherweise 30 µg Protein einer Zellpräparation geladen. Die Lademengen der Positivkontrollen (rekombinante Proteine,

Gewebepräparate aus adultem Rattenhirn und Rattenmittelhirn) variieren. Als Gelladepuffer wird 1 x Laemmli-Puffer<sub>(L13)</sub> verwendet. Nach der Elektrophorese wird das Gel in Transferpuffer<sub>(L15)</sub> gewaschen.

Die Proteine werden mit einer Semi-dry-Blotkammer<sub>(G10)</sub> unter Verwendung von Transferpuffer<sub>(L15)</sub> gemäß den Herstellerangaben bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> 1h auf eine Nitrocellulosemembran<sub>(V17)</sub> geblottet.

Zur Kontrolle des Blotvorganges werden anschließend die im Polyacrylamidgel zurückgebliebenen Proteine mit Coomassie-Lösung gefärbt. Grundlage dieser Färbung sind elektrostatische Wechselwirkungen des Farbstoffes mit geladenen Amino- und Iminogruppen von Proteinen. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,3 bis 1 µg je Bande. Die Gele werden 2 h in Coomassie-Färbelösung<sub>(L16)</sub> und danach 4 h in Entfärbelösung<sub>(L17)</sub> im Schüttler bei RT inkubiert und anschließend zu Dokumentation photographiert.

Parallel dazu wird die Nitrocellulosemembran weiterverarbeitet. Unspezifische Antikörperbindungsstellen werden durch Schüttelinkubation (2 h, RT) der Membran in Blocklösung<sub>(L19)</sub> abgesättigt.

Der Primärantikörper wird einer frischen Blocklösung<sub>(L19)</sub> zugesetzt und die Membran damit wahlweise 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C im Schüttler inkubiert. Die Membran wird einmal in reinem PBS<sub>(L18)</sub> und 3 mal in PBS mit 0.1% Tween20 gewaschen.

Der Sekundärantikörper wird einer frischen Blocklösung<sub>(L19)</sub> zugesetzt und die Membran damit 2 h im Schüttler bei RT inkubiert. Erneut wird die Membran gewaschen, nun jedoch einmal in reinem PBS<sub>(L18)</sub>, zweimal in PBS mit 0,1% Tween20 und noch einmal in reinem PBS<sub>(L18)</sub>.

Die Proteindetektion wird mit ECL detection reagens<sub>(K5)</sub> nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dabei werden der am Sekundärantikörper gebundenen Meerrettichperoxidase Wasserstoffperoxid und das Substrat Luminol (zur Umsetzung in 3-Aminophtalat und Stickstoff) zur Verfügung gestellt. Das bei dieser Reaktion emittierte Licht führt zur Schwärzung eines Röntgenfilms. Nach einminütiger Inkubation der Membran im 1:1-Gemisch der Lösungen ECL1 und ECL2 wird die Membran sanft und ohne Reibebewegung mit saugfähigem Papier getrocknet und in eine nichtbeschichtete Röntgenfilmkassette überführt. Sofort wird die Membran mit einer Klarsichtfolie zum Schutz des Röntgenfilms vor der ECL-Lösung abgedeckt. Erschütterungsfrei wird nun der Röntgenfilm<sub>(V18)</sub> in der Dunkelkammer unter Rotlichtbeleuchtung in die Röntgenkassette gelegt. Nach einer variablen Belichtungszeit von 10 s bis 20 min wird der Röntgenfilm wiederum unter Rotlichtbeleuchtung erschütterungsfrei aus der Kassette entnommen und in eine neue Kassette überführt, die in den Entwicklerautomaten<sub>(G11)</sub> gelangt. Die automatische Filmentwicklung, -fixierung und -trocknung dauert 2 min. Es muß sich stets durch zügige Arbeitsweise darum bemüht werden, die ersten Minuten nach ECL-Inkubation zur Belichtung auszunutzen, da die Lumineszenzintensität exponentiell mit der Zeit abnimmt.

Für die Bestimmung des Molekulargewichts werden die Marker Prestained broad range<sub>(B3)</sub> bzw. BOA protein marker<sub>(B4)</sub> benutzt.

## Testverfahren

### Durchflußzytometrie

(modifiziert nach Jung (Jung et al., 1993))

Geerntete Zellen werden in konische 4 mL Reaktionsröhrchen<sub>(V11)</sub> überführt und zweimal mit 3 mL PBS gewaschen (400 x g, 8 min, RT). Die Zellen werden 20 min mit eiskalter Fixierlösung<sub>(L20)</sub> inkubiert und zweimal in PBS mit 1 % BSA gewaschen (400 x g, 8 min, RT). Das Pellet wird in 25 µL Permeabilisierungslösung<sub>(L21)</sub> mit Primärantikörper versetzt und resuspendiert. Eine Negativkontrolle wird unter Verwendung von Normal-Ziegenserum-IgG<sub>(B13)</sub> anstelle des Primärantikörpers mitgeführt. In den serumhaltigen Lösungen werden die Zellen 15 min bei RT inkubiert. Dann werden die Zellen zweimal in Permeabilisierungslösung<sub>(L21)</sub> gewaschen und pellettiert (400 x g, 8 min, RT). Die Zellpellets werden in 25 µL Permeabilisierungslösung<sub>(L21)</sub> mit Sekundärantikörper resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte in Permeabilisierungslösung<sub>(L21)</sub>. Zuletzt werden die Zellpellets in 500 µL Konservierungslösung<sub>(L20)</sub> resuspendiert, in FACS-Röhrchen<sub>(V12)</sub> überführt und bei 4°C bis zur durchflußzytometrischen Analyse (innerhalb 3 Tagen) gelagert.

Die durchflußzytometrische Analyse wird mit dem Gerät EPICS XL<sub>(G12)</sub> durchgeführt. Von jeweils 5.000 Zellen wird die Fluoreszenzintensität bestimmt. Zum Ausschluß von Zelltrümmern wird im Lichtstreuungs-Histogramm ein elektronisches Fenster festgelegt. Die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) gilt als relatives Maß der Expression des detektierten Proteins.

### TUNEL-Test

#### Prinzip

Die Grundlage der terminal deoxynukleotidyl-transferase (TdT)-mediated FITC-ddUTP nick-end-labeling (TUNEL) – Technik, die auch Tailing-Technik genannt wird, ist eine Markierung der 3'Enden von DNA-Strangbrüchen mit fluoreszenzmarkiertem dUTP. Das Ausmaß von DNA-Strangbrüchen korreliert mit dem Ausmaß der Apoptose (Gold et al., 1994). Ausgewertet wird der durchflußzytometrisch bestimmte prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an allen analysierten Zellen, wobei die Abgrenzung zwischen apoptotischen und nichtapoptotischen Zellen durch eine Negativkontrolle (ohne TdT-Zugabe) erfolgt.

### **Präparation der Zellkulturen**

Die zu analysierenden Zellen werden in 96-well-Flachbodenplatten<sub>(V1)</sub> in einer Konzentration von 200.000 Zellen je mL in normalem Kulturmedium zur Kontrolle, in Kulturmedium mit Staurosporin<sub>(B14)</sub> in einer Konzentration von  $10^{-7}$ M und in Kulturmedium ohne Serum, zur Simulation zweier apoptoseinduzierender Stresssituationen, ausgesät. Es folgt eine Inkubation für 24 Stunden bei 33°C bzw. 39°C. Anschließend werden nicht-adhärenente Zellen durch Absaugen des Überstandes in 1,5-mL Reaktionsröhrchen<sub>(V8)</sub> überführt. Adhärenente Zellen werden mit der Trypsin-EDTA-Methode geerntet (wie unter "Arbeiten mit Zellen" beschrieben) und zu den entsprechenden nicht-adhärenenten Zellen gegeben.

Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen, werden die Zellen fixiert<sub>(L20)</sub> und permeabilisiert<sub>(L21)</sub>.

### **Tailing** (unter Verwendung des Mebstain-Kits<sub>(K7)</sub>)

Vorsichtig werden die Zellen zweimal mit 1 mL PBS, das 0,2 % Rinderserumalbumin enthält (PBS-BSA), durch Zentrifugation (500 x g, 2 min, RT) gewaschen. Dann werden 200  $\mu$ L 70 %-iges Ethanol zum Zellpellet gegeben und 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Es folgen 2 weitere Waschschrirte mit PBS-BSA (700 x g, 3 min, RT). Anschließend werden die Zellen in 30  $\mu$ L Tailing-Reaktionslösung (1,5  $\mu$ L TdT, 1,5  $\mu$ L FITC-dUTP<sub>(B16)</sub>, 27  $\mu$ L TdT buffer<sub>(K7)</sub>) resuspendiert und 1 h vor Licht geschützt inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrirte mit PBS-BSA (700 x g, 3 min, RT) werden die Zellen in 500  $\mu$ L PBS-BSA resuspendiert und maximal 6 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  vor Licht geschützt gelagert

### **Analyse**

Die flußzytometrische Analyse wird mit dem Gerät EPICS XL<sub>(G12)</sub> durchgeführt. Jeweils 5.000 Zellen werden in einem elektronischen Fenster des Lichtstreuungs-Histogrammes erfaßt. Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen wird zunächst anhand einer Negativkontrolle (Tailing-Reaktionslösung ohne TdT) ein Fenster im Fluoreszenzhistogramm definiert, das nichtapoptotische Zellen ausschließt. Der prozentuale Anteil der grünfluoreszierenden Zellen in diesem Fenster wird als Anteil apoptotischer Zellen gewertet. Eine methodische Positivkontrolle wird entsprechend den Herstellerangaben durch DNase-Behandlung von ST14A ohne Stresskultivierung hergestellt. In der Negativkontrolle wird die 1,5  $\mu$ L TdT-Lösung durch 1,5 $\mu$ L TdT-Puffer ersetzt.

### **<sup>3</sup>H-Thymidin-Test**

Die Markierung neusynthetisierter DNA durch das radioaktive Nukleotid <sup>3</sup>H-Methylthymidin dient der Quantifizierung der DNA-Synthese-Aktivität von Zellen.

Die Zellen werden in Dreifachansätzen in 96-well-Flachbodenplatten<sub>(V1)</sub> in Konzentrationen von 10.000, 20.000, 50.000 bzw. 100.000 Zellen pro mL in normalem Kulturmedium zur Kontrolle, in Kulturmedium mit Staurosporin<sub>(B14)</sub> in Konzentrationen von  $10^{-7}$ M bzw.  $10^{-8}$ M und in Kulturmedium ohne Serum, zur Simulation von Stresssituationen, ausgesät. Die Platten werden bei 33°C bzw. 39°C insgesamt 24 Stunden inkubiert. Nach 14 Stunden werden die Zellen für weitere 10 Stunden mit 10 µL <sup>3</sup>H-Methylthymidin<sub>(B15)</sub> (entsprechend 1 µCi/well) behandelt. Anschließend werden die Zellen auf Titertek-Glasfaserfiltern<sub>(V19)</sub> geerntet. Der <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau wird mit einem Flüssigkeits-β-Scintillationszähler<sub>(G13)</sub> bestimmt. Die Ergebnisse werden als counts per minute (cpm) ausgedrückt.

### **Wst-1-Test**

Der Wst-1 Test<sub>(K6)</sub> basiert auf der Messung der Enzymaktivität mitochondrialer Dehydrogenasen. Diese Dehydrogenasen reduzieren ein Tetrazoliumsubstrat, was eine Formazanfärbung zur Folge hat. Die Enzymaktivität korreliert mit der durchschnittlichen metabolischen Aktivität der analysierten Zellen, wenn keine Zellvermehrung stattfindet. Nur in proliferierenden Zellen (bei 33°C) korreliert sie auch mit der Anzahl vitaler Zellen.

Zur Testdurchführung werden die Zellen 24 Stunden unter den gleichen Bedingungen kultiviert, wie für den <sup>3</sup>H-Thymidin-Test beschrieben. Vier Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit werden 10 µL Wst-1-Reagenz je Vertiefung der 96-well-Flachbodenplatten<sub>(V1)</sub> zugegeben. Die optische Dichte wird bei 450 nm spektrophotometrisch<sub>(G8)</sub> bestimmt. Die Meßwerte werden mit der Software des Photometerherstellers easyWIN screening<sub>(S3)</sub> ausgewertet.



## ***Ergebnisse***

### **Metabolische Aktivität**

Die metabolische Aktivität von ST14A-Zellen wird anhand der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen mit dem Wst-1-Test ermittelt. Zunächst ist zu klären, ob der exogene Einfluß des zur Selektion transfizierter Zellen eingesetzten Puromycins die metabolische Aktivität beeinflusst. Grundlage dafür ist die morphologische Beobachtung, dass sich zwar Zellvitalität und Zellwachstum bei 33°C durch die Anwesenheit von Puromycin nicht erkennbar ändern, aber bei 39°C in den Kulturen aller transfizierten Klone nach 2 bis 3 Tagen ein fast vollständiger Zelluntergang eintritt. Deshalb wird exemplarisch der Einfluß von Puromycin (3µg/mL) auf die metabolische Aktivität transfizierter Zellen am Beispiel von ST14A-*CNTF* untersucht.

Die Zellen werden über einen Beobachtungszeitraum von 12 Tagen in 96-well-Flachbodenplatten bei 33°C und bei 39°C kultiviert. Die metabolische Aktivität wird täglich aus drei parallelen Ansätzen (Triplets) bestimmt. In Vorversuchen wird die Aussaatdichte der Zellen ermittelt, bei der die größtmögliche Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen ist. Getestet werden 1.000, 3.000 und 5.000 Zellen je well einer 96-well- Flachbodenplatte. Als optimal erweist sich hierbei die Dichte von 3.000 Zellen je well, da hierbei nicht nur die Wiederholbarkeit der Ergebnisse, sondern auch ein aussagekräftiges Beobachtungsintervall ermöglicht wird, ohne dass die bei 33°C kultivierten Zellen Superkonfluenz erreichen. Zur Auswertung der Meßwerte werden aus jedem Triplett Mittelwert und Standardabweichung errechnet (Abbildung 1).

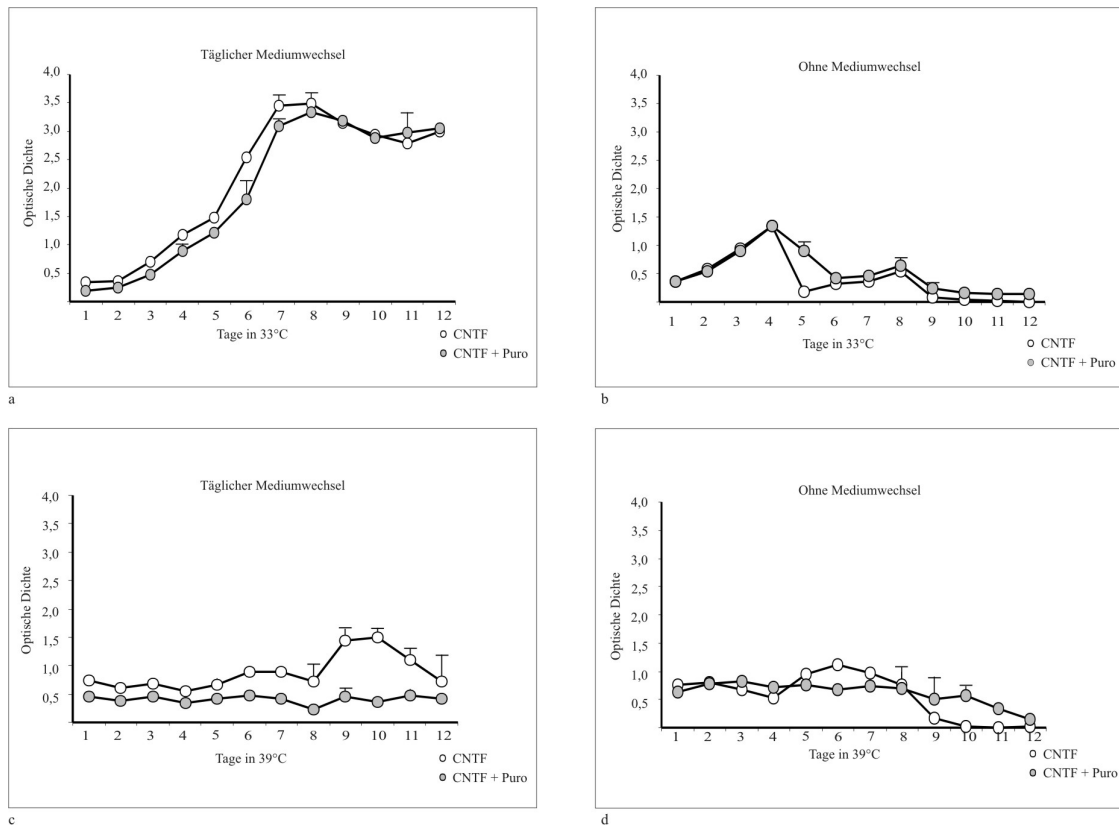


Abb.1

Abbildung 1. Wirkung des Selektionsfaktors Puromycin auf den Zellmetabolismus. Beispielhafte Untersuchung mit Wst-1-Tests. Über dem Untersuchungszeitraum von 12 Tagen wird die optische Dichte als Maß für die metabolische Aktivität angegeben. A und b stellen die Untersuchung bei 33 C, c und d bei 39 C da. A und c beziehen sich auf Untersuchungen mit täglichem Wechsel des Kulturmediums, während in b und d Ergebnisse von Untersuchungen ohne Wechsel des Kulturmediums dargestellt sind. Angegeben sind Mittelwerte aus je 3 Meßwerten und SEM.

Es zeigt sich, dass

1. bei 33°C nur ein geringer bzw. kein Hemmeffekt des Puromycins auf die metabolische Aktivität zu verzeichnen ist (Abb. 1a), jedoch der Zellmetabolismus bei 39°C unter täglichem Mediumwechsel supprimiert ist (Abb. 1c).
2. bei 39°C und täglichem Mediumwechsel ein deutlicher Hemmeffekt des Puromycins auf die metabolische Aktivität eingetreten (Abb. 1c). Ohne Mediumwechsel, d.h. auch ohne täglichen Ersatz des Puromycins, war seine Wirkung offenbar durch die kurze Halbwertszeit begrenzt (Abb. 1b und d).

Aufgrund dieses Resultats werden die transfizierten Zellklone im weiteren Vorgehen nur noch zur Expansion bei 33°C im Selektionsmedium kultiviert. Für ST14A-CNTF genügt eine Kultivierung alle 4 Wochen für 3 Tage in Selektionsmedium, um die stabile Transfektion zu erhalten (Weinelt et al.,

2003). ST14A-*GDNF* und ST14A-mock werden hingegen permanent in Selektionsmedium kultiviert, da die Transfektion hier instabiler ist (Pahnke et al., 2004).

Während der Kultivierung im Beobachtungszeitraum eines Tests wird kein Selektionsmedium mehr verwendet, um den Puromycineinfluß bei 39°C auszuschließen und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse an transfizierten und nicht-transfizierten, puromycinsensitiven Zellen zwischen 33°C und 39°C zu gewährleisten.

Im nächsten Schritt wird die Kinetik der basalen, metabolischen Aktivität der ausgewählten ST14A-*CNTF* (Klon 31) und ST14A-*GDNF* (Klon B4) im Vergleich zu nativen, nicht-transfizierten ST14A und scheintransfizierten ST14A-mock bestimmt. Dazu werden die Zellen wie oben beschrieben über 12 Tage in 96-well-Flachbodenplatten kultiviert und täglich im Wst-1-Test die metabolische Aktivität bestimmt (Abbildung 2).

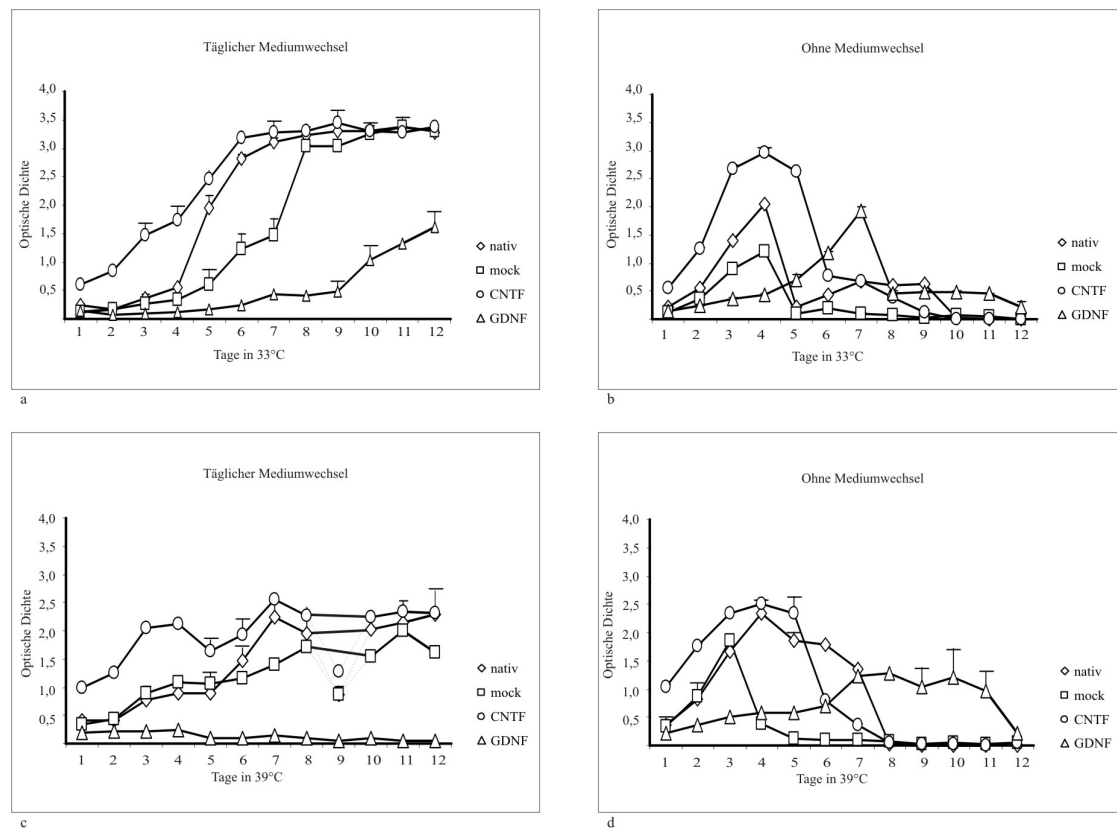


Abb. 2

Abbildung 2. Vergleich der metabolischen Aktivität verschiedener Zellklone mit dem Wst-1-Test unter den Bedingungen der zunehmenden Zelldichte in der Zellkultur. Über dem Untersuchungszeitraum von 12 Tagen wird die optische Dichte als Maß für die metabolische Aktivität angegeben. A und b stellen die Untersuchung bei 33°C, c und d bei 39°C da. A und c beziehen sich auf Untersuchungen mit täglichem Wechsel des Kulturmediums, während in b und d Ergebnisse von Untersuchungen ohne Wechsel des Kulturmediums dargestellt sind. Angegeben sind Mittelwerte aus je 3 Meßwerten und SEM.

Die folgenden Aussagen sind Ergebnisse dieser Analyse:

1. Das Maximum der metabolischen Aktivität aller Zellen ist bei 33°C höher als bei 39°C.

2. Das Maximum der metabolischen Aktivität aller Zellen wird bei 33°C zu einem früheren Zeitpunkt erreicht als bei 39°C.
3. ST14A-*CNTF* erreichen die höchste metabolischen Aktivität, sowohl bei 33°C als auch bei 39°C.
4. Bei täglichem Mediumwechsel erreichen native ST14A und ST14A-*CNTF* die maximale metabolische Aktivität sowohl bei permissiver als auch bei nicht permissiver Temperatur nach 6 bis 7 Tagen, ST14A-mock nach 8 Tagen. ST14A-*GDNF* zeigen einen stark verzögerten Anstieg der metabolischen Aktivität bei permissiver Temperatur und ein Persistieren der metabolischen Aktivität auf sehr niedrigem Niveau bei nicht permissiver Temperatur.
5. Ohne Mediumwechsel erreichen native ST14A, ST14A-mock und ST14A-*CNTF* die maximale metabolische Aktivität temperaturunabhängig bereits nach 3 bis 4 Tagen, während ST14A-*GDNF* einen langsameren Anstieg mit Maximalwert nach einer Woche zeigen.

Zur vergleichenden Analyse wesentlicher biologischer Eigenschaften (metabolische Aktivität, DNA-Synthese und Apoptose) und ihrer Beeinflussung durch Stressfaktoren in verschiedenen Stadien der Zelldifferenzierung werden folgende Kultivierungszeiten bei 39°C ausgewählt:

- 0 Tage (Kontrollwerte der proliferierenden Zellen, 33°C-Kulturen)
- 3 Tage
- 6 Tage
- 13 Tage

Um den Einfluß der Zelldichte auf die Resultate zu minimieren werden die Zellen bis zu einem Tag vor den jeweiligen Messungen in größeren Kulturschalen mit 3- bis 4-tägigem Mediumwechsel kultiviert und für die letzten 24 Stunden in konstanter Zelldichte in 96-well-Flachbodenplatten ausgesät.

In Vorversuchen wird bestimmt, welche Dichte die Zellen zur 24-stündigen Kultur in 96-Well-Flachbodenplatte benötigen, um bestmöglich reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die getesteten Aussaatdichten sind 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 und 20.000 Zellen je Well. Als Optimum erweist sich eine Dichte von 10.000 Zellen je Well. Es werden stets drei Parallelansätze je Versuch durchgeführt und gemittelt. Die Meßwerte werden auf den Wert der nativen ST14A bei 33°C normiert, so dass der metabolischen Aktivität nativer ST14A bei 33°C per definitionem der Wert 1 entspricht. Mit dem t-Test nach Student werden die Meßwerte verschiedener Zellen und Kulturtemperaturen bzw. -zeiten miteinander verglichen (Abbildung 3).

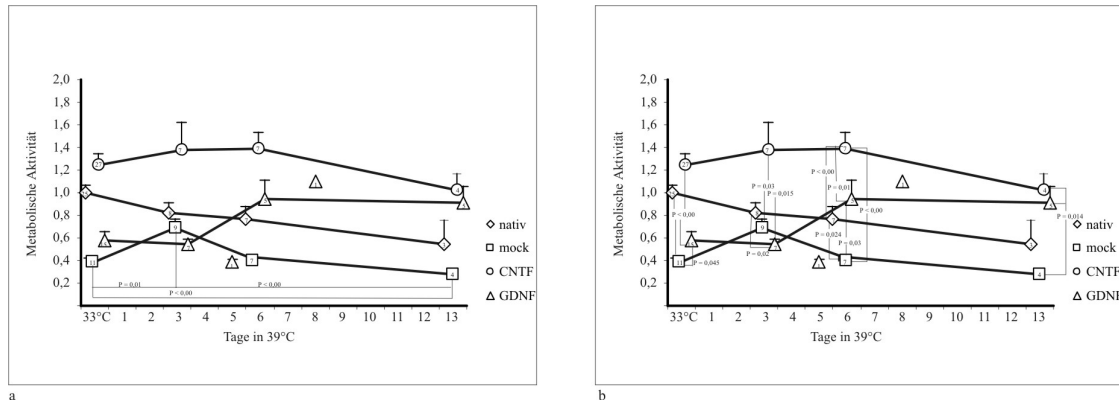


Abb. 3

Abbildung 3. Vergleich der metabolischen Aktivität verschiedener Zellklone mit dem Wst-1-Test zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung mit Angabe von Mittelwerten und SEM, wobei den nativen ST14A bei 33 C per definitionem der Wert 1 zugeordnet wurde und alle anderen Werte in Relation dazu stehen. Die Ziffern in den Symbolen geben die Anzahl (n) der Meßwerte an. In a sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte eines Zellklones zwischen 33 C und den unterschiedlichen Meßwerten zu verschiedenen Zeitpunkten bei 39 C eingetragen. In b sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte unterschiedlicher Zellklone zu gleichen Zeitpunkten angegeben.

Aus den Versuchen lassen sich folgende Aussagen ableiten:

1. Native ST14A zeigen eine stetige, tendenzielle, aber nicht signifikante rückläufige metabolische Aktivität während der Differenzierung.
2. Die metabolische Aktivität von ST14A-mock zeigt einen biphasischen Verlauf mit signifikantem Anstieg bis Tag 3 und nachfolgendem signifikantem Abfall bis Tag 13.
3. Die metabolische Aktivität von ST14A-CNTF bleibt bis zum 6. Tag auf einem höheren Niveau als die der anderen Zellen und sinkt bis zum 13.Tag tendenziell, aber nicht signifikant ab.
4. Die metabolische Aktivität von ST14A-GDNF steigt zwischen dem 3. und 6. Tag tendenziell, aber nicht signifikant an.
5. Zu allen Zeitpunkten ist die metabolischen Aktivität von ST14A-CNTF am höchsten. Der Unterschied ist nach 6 Tagen gegenüber allen anderen Zellen und an den Meßpunkten 33°C und 3 Tage 39°C gegenüber ST14A-mock und ST14A-GDNF signifikant.
6. Die metabolische Aktivität von ST14A-mock liegt unterhalb der von nativen ST14A. Der Unterschied ist an den Meßpunkten 33°C, 3 Tage 39°C und 6 Tage 39°C signifikant.
7. Die metabolische Aktivität von ST14A-GDNF liegt zu Beginn der Differenzierung an Tag 3 und 6 signifikant unterhalb der von nativen ST14A.



## DNA-Synthese

Die Aktivität der DNA-Synthese wird anhand des Einbaus von  $^3\text{H}$ -Thymidin in Zellen gemessen. Analog zur Bestimmung der metabolischen Aktivität wird in Vorversuchen zunächst ermittelt, in welcher Dichte die Zellen zur 24-stündigen Kultur in der 96-Well-Flachbodenplatte ausgesät werden müssen, um bestmöglich reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die getesteten Aussaatdichten sind 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 und 20.000 Zellen je Well. Als Optimum erweist sich die Dichte von 10.000 Zellen je Well. Es werden stets drei Parallelansätze je Versuch durchgeführt und gemittelt.

Die Meßwerte werden auf den Wert der nativen ST14A bei 33°C normiert, so dass der Aktivität der DNA-Synthese nativer ST14A bei 33°C per definitionem der Wert 1 entspricht. Mit dem t-Test nach Student werden die Meßwerte verschiedener Zellen bei den unterschiedlichen Kulturtemperaturen bzw. -zeiten miteinander verglichen

(Abbildung 4).

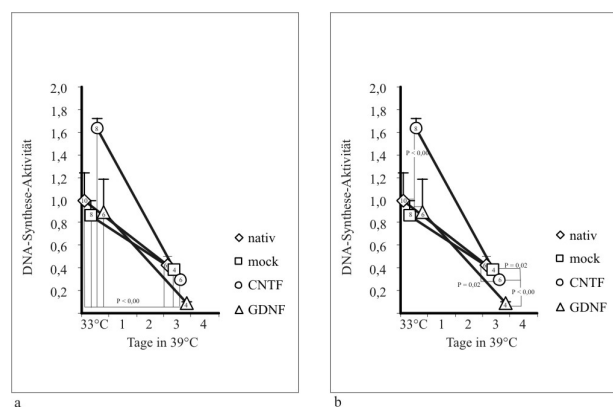


Abb. 4

Abbildung 4. Vergleich der DNA-Synthese-Aktivität verschiedener Zellklone mit dem  $^3\text{H}$ -Thymidin-Test vor bzw. 3 Tage nach Induktion der Differenzierung mit Angabe von Mittelwerten und SEM, wobei den nativen ST14A bei 33 C per definitionem der Wert 1 zugeordnet wird und alle anderen Werte in Relation dazu stehen. Die Ziffern in den Symbolen geben die Anzahl (n) der Meßwerte an. Die zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung nur exemplarisch ermittelten Meßwerte werden nicht miteingezeichnet, da sie sich nicht von denen am 3. Tag unterscheiden. In a sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte eines Zellklons zwischen 33 C und 39 C eingetragen. In b sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte unterschiedlicher Zellklone zu gleichen Zeitpunkten angegeben.

Aus den Versuchen lassen sich folgende Aussagen ableiten:

1. Alle Zellarten zeigen einen dramatischen, hoch signifikanten Abfall der DNA-Synthese-Aktivität innerhalb der ersten 3 Tage nach Temperaturerhöhung.
2. Bei 33°C zeigen ST14A-CNTF gegenüber allen anderen Zellen eine signifikant höhere DNA-Synthese-Aktivität. Die nativen ST14A, ST14A-mock und ST14A-GDNF unterscheiden sich hier nicht.
3. Nach 3-tägiger Kultivierung bei 39°C liegt die DNA-Synthese-Aktivität von ST14A-CNTF geringgradig, aber signifikant unter der der nativen ST14A und ST14A-mock, jedoch deutlich über der der ST14A-GDNF.

## **Apoptose**

Die Apoptoserate wird anhand der Bestimmung fragmentierter DNA mit der TUNEL-Technik ermittelt. Wie bei der Bestimmung der metabolischen Aktivität und der DNA-Synthese wird in Vorversuchen zunächst ermittelt, in welcher Dichte die Zellen zur 24-stündigen Kultur in 96-Well-Flachbodenplatten ausgesät werden müssen, um bestmöglich reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Die getesteten Aussaatdichten sind 10.000 und 20.000 Zellen je Well. Als Optimum erweist sich die Dichte von 20.000 Zellen je Well. Die Zellen aus drei Wells werden gepoolt und drei Parallelansätze durchgeführt. Die Anzahl der parallelen Meßwerte entspricht damit der in den Tests der metabolischen Aktivität und der DNA-Synthese. Da während des Apoptoseprozesses die Adhärenz der Zellen abnimmt, ist davon auszugehen, dass mit der Trypsin/EDTA-Ernte nur ein Teil der apoptotischen Zellen in der Messung erfasst wird. Daher werden auch die Zellen im Kulturüberstand in die Analyse einbezogen. Da sich insbesondere frühzeitig zerfallende apoptotische Zellen der Auswertung entzogen hätten (Prieto et al., 2002), werden die Ergebnisse nicht wie üblich in % apoptotischer Zellen von der Gesamtzellzahl angegeben, sondern unter Einbeziehung der Färbeintensität pro Zelle (MeanX) als apoptotische Aktivität:

$$\text{Apoptotische Aktivität} = \% \text{ apoptotische Zellen} \times \text{MeanX.}$$

Die Mittelwerte werden auf die apoptotische Aktivität der nativen ST14A bei 33°C normiert, so dass der apoptotischen Aktivität nativer ST14A bei 33°C per definitionem der Wert 1 entspricht. Mit dem t-Test nach Student werden die Meßwerte verschiedener Zellen bei den unterschiedlichen Kulturtemperaturen bzw. -zeiten miteinander verglichen (Abbildung 5).

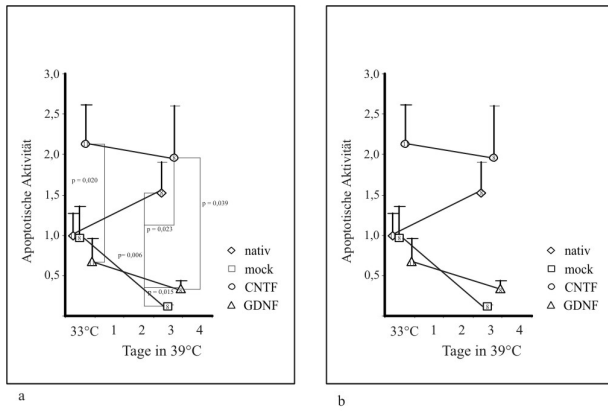


Abb. 5

Abbildung 5. Vergleich der apoptotischen Aktivität verschiedener Zellklone mit dem TUNEL-Test vor bzw. 3 Tage nach Induktion der Differenzierung. Die Ziffern in den Symbolen geben die Anzahl (n) der Meßwerte an. In a sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte unterschiedlicher Zellklone zu gleichen Zeitpunkten angegeben. In b sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte eines Zellklones zwischen 33 C und 39 C eingetragen. Angegeben sind Mittelwerte und SEM, wobei den nativen ST14A bei 33 C per definitionem der Wert 1 zugeordnet wird und alle anderen Werte in Relation dazu stehen.

Aus den Versuchen lassen sich folgende Aussagen ableiten:

1. Die höchste apoptotische Aktivität zeigen stets ST14A-CNTF. Bei 33°C ist dieser Unterschied gegenüber allen anderen Zellen hochsignifikant, bei 39°C mit Ausnahme des Vergleichs zu ST14A-nativ ebenfalls.
2. Bei 33°C unterscheidet sich die apoptotische Aktivität von ST14A, ST14A-mock und ST14A-GDNF nicht voneinander.
3. Bei 39°C ist die apoptotische Aktivität von ST14A-nativ fast gleich hoch wie die von ST14A-CNTF, während die von ST14A-mock und ST14A-GDNF, obwohl signifikant unterschiedlich, weit darunter liegen.

### Metabolischer Streß

Eine metabolische Stresssituation wird durch den Entzug von FBS im Kulturmedium während der 24-stündigen Kulturzeit in den 96-well-Flachbodenplatten erzeugt. Je Versuch wird ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne FBS durchgeführt und wie oben beschrieben die metabolische- und die DNA-Synthese-Aktivität bestimmt. Die zelluläre Reaktion auf den Serumentzug wird anhand der Differenz zwischen der serumhaltigen und serumfreien Kultur als Änderung der metabolischen- bzw. der DNA-Synthese-Aktivität ermittelt:

$$\Delta = (\text{serumfrei} - \text{serumhaltig}) / \text{serumhaltig}$$

Aus den Einzelwerten der Änderungen werden Mittelwerte und Standardfehler berechnet. Mit dem t-Test nach Student werden die Meßwerte der verschiedenen Zellarten bei den unterschiedlichen Kulturtemperaturen bzw. -zeiten miteinander verglichen (Abbildung 6).

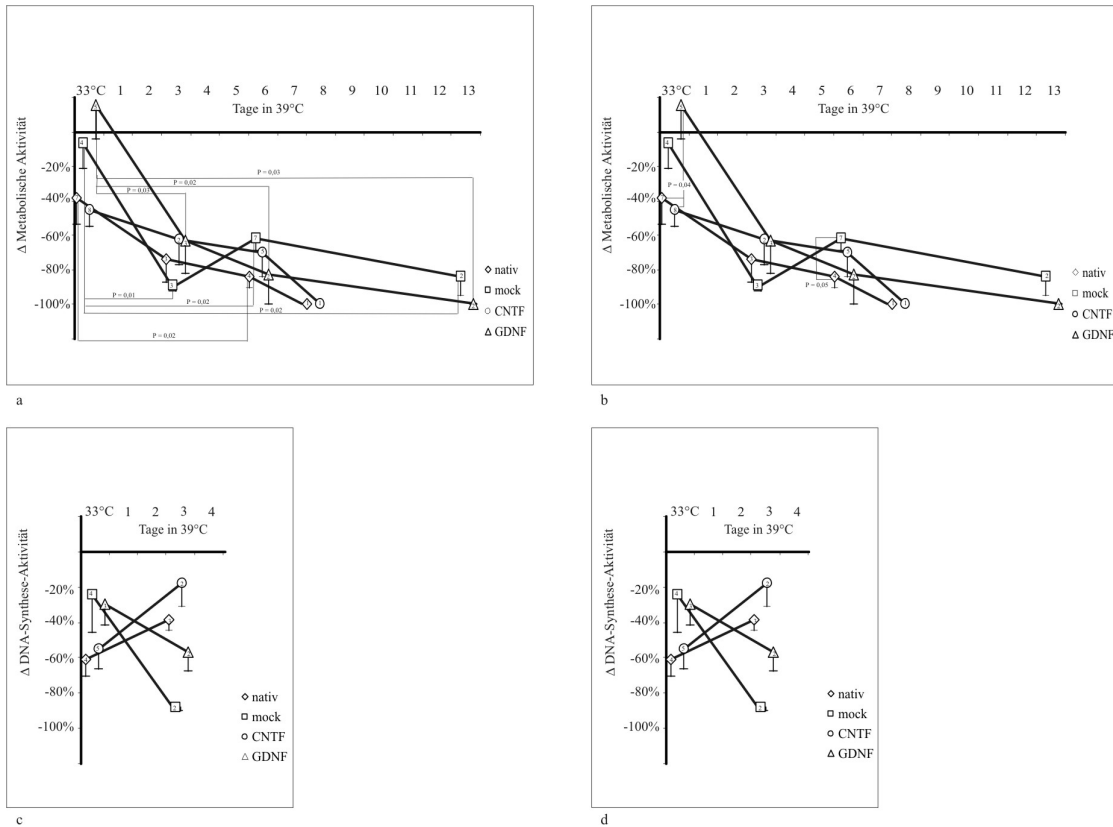


Abb. 6

Abbildung 6. Effekt des FBS-Entzugs auf die metabolische Aktivität verschiedener Zellklone, gemessen mit dem Wst-1-Test (a, b) und die DNA-Synthese der gleichen Zellklone, gemessen mit dem  $^3\text{H}$ -Thymidin-Test (c, d). Die Ziffern in den Symbolen geben die Anzahl (n) der Meßwerte an. Die mit dem  $^3\text{H}$ -Thymidin-Test zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung nur exemplarisch ermittelten Meßwerte werden nicht miteingezeichnet, da sie sich nicht von denen am 3. Tag unterscheiden. In a und c sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte eines Zellklones zwischen 33°C und 39°C eingetragen. In b und d sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte unterschiedlicher Zellklone zu gleichen Zeitpunkten angegeben. Es werden jeweils die prozentualen Aktivitätsänderungen ( $\Delta$ ) von Zellen in serumfreiem Kulturmedium gegenüber serumhaltigem Kulturmedium angegeben. Die Symbole und Fehlerindikatoren repräsentieren Mittelwerte und SEM.

Aus den Versuchen können folgende Aussagen abgeleitet werden:

1. Unter metabolischem Stress zeigen alle Zellen zu jedem Zeitpunkt einen Abfall der metabolischen Aktivität, der bei nativen ST14A und ST14A-CNTF nach 8 Tagen und bei ST14A-GDNF und ST14A-mock nach 13 Tagen vollständig bzw. annähernd vollständig ist.
2. Bei allen Zellen ist der Abfall der metabolischen Aktivität nach Differenzierung bei 39°C wesentlich dramatischer als bei 33°C.
3. ST14A-CNTF zeigen nach 6 Tagen einen geringeren Abfall der metabolischen Aktivität als native ST14A, wo diese weitere Verringerung der metabolischen Aktivität gegenüber 33°C signifikant ist.
4. ST14A-GDNF reagieren bei 33°C am geringsten auf Serumentzug.

5. Unter metabolischem Stress zeigen alle Zellen zu jedem Zeitpunkt einen Abfall der DNA-Synthese, der jedoch niemals 100 % erreicht.
6. Die Unterschiede der DNA-Syntheseänderung sind zwischen den Zellen nicht signifikant. Es zeichnet sich jedoch bei den differenzierenden Zellen eine Tendenz zu geringerer Reaktion der DNA-Synthese bei mit neurotrophen Faktoren transfizierten Zellen gegenüber nicht- transfizierten Zellen ab.

### **Toxischer Streß**

Eine zytotoxische Stresssituation wird durch die Zugabe von Staurosporin, einem PKC-Inhibitor, zum Kulturmedium während der 24- stündigen Kulturzeit in den 96-Well-Flachbodenplatten erzeugt. Es werden in Vorversuchen die Staurosporinkonzentrationen  $10^{-8}\text{M}$  und  $10^{-7}\text{M}$  getestet. Für reproduzierbare Effekte ist die Konzentration von  $10^{-7}\text{M}$  erforderlich. Je Versuch wird ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne Staurosporin durchgeführt und wie oben beschrieben die metabolische Aktivität und die DNA-Synthese-Aktivität bestimmt. Die zelluläre Reaktion wird anhand der Differenz zwischen der staurosporinhaltigen und der staurosporinfreien Kultur als Änderung der metabolischen Aktivität, der DNA-Synthese und der apoptotischen Aktivität ermittelt:

$$\Delta = (\text{staurosporinhaltig} - \text{staurosporinfrei}) / \text{staurosporinfrei}.$$

Aus den Einzelwerten der Änderungen werden Mittelwerte und Standardfehler berechnet. Mit dem t-Test nach Student werden die Meßwerte der verschiedenen Zellarten bei den unterschiedlichen Kulturtemperaturen bzw. -zeiten miteinander verglichen. (Abbildung 7).

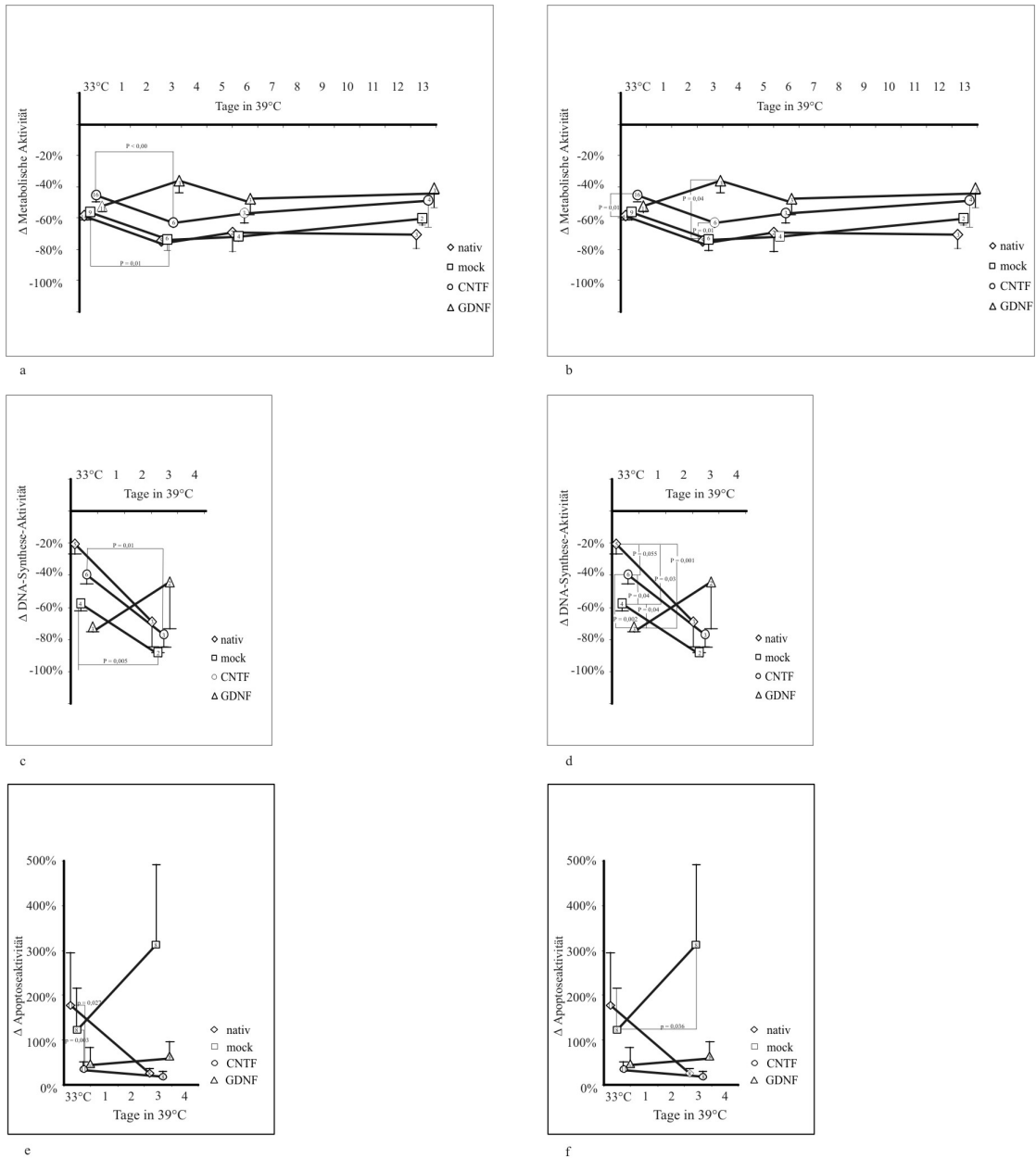


Abb. 7

Abbildungen 7. Effekt von Staurosporin auf die metabolische Aktivität (Wst-1-Test a, b), die DNA-Synthese ( $^3\text{H}$ -Thymidin-Test c, d) und die apoptotische Aktivität (TUNEL-Test e, f) verschiedener Zellklone. Die Ziffern in den Symbolen zeigen die Anzahl (n) der Meßwerte an. Die mit dem  $^3\text{H}$ -Thymidin-Test und mit dem TUNEL-Assay zu späteren Zeitpunkten der Differenzierung nur exemplarisch ermittelten Meßwerte werden nicht miteingezeichnet, da sie sich nicht von denen am 3. Tag unterscheiden. In a, c und e sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte eines Zellklones zwischen 33 C und 39 C eingetragen. In b, d und f sind die signifikanten t-Testergebnisse von Vergleichen der Meßwerte unterschiedlicher Zellklone zu gleichen Zeitpunkten angegeben. Die Symbole und Fehlerindikatoren repräsentieren die Mittelwerte und SEM.

Aus den Versuchen können folgende Aussagen abgeleitet werden:

1. Alle Zellen zeigen zu allen Zeitpunkten unter dem Einfluß von Staurosporin einen Abfall sowohl der metabolischen Aktivität als auch der DNA-Synthese, der aber nie vollständig ist. Die apoptotische Aktivität steigt unter Staurosporin in allen Zellklonen an.

2. Die Reduktion der metabolischen Aktivität von ST14A-*CNTF* und ST14A-*GDNF* ist geringer als die von nativen ST14A und ST14A-mock. Sie nimmt bei nativen ST14A, ST14A-mock und ST14A-*CNTF* zwischen 33°C und 3 Tagen 39°C signifikant zu. Signifikante Unterschiede der Reduktion ergeben sich außerdem zwischen nativen ST14A und ST14A-*CNTF* bei 33°C und zwischen nativen ST14A und ST14A-*GDNF* nach 3 Tagen bei 39°C.
3. Native ST14A und ST14A-mock zeigen einen nahezu identischen Verlauf der metabolischen Aktivität mit maximaler Reduktion am 3. Tag bei 39°C.
4. Bei 33°C findet sich eine zunehmende staurosporininduzierte Reduktion der DNA-Synthese in der Reihenfolge ST14A-*GDNF*, ST14A-mock, ST14A-*CNTF*, native ST14A. Sie nimmt mit Ausnahme von ST14A-*GDNF* zwischen 33°C und 3 Tagen 39°C zu. Im Falle von ST14A-mock und ST14A-*CNTF* ist die Reduktionszunahme signifikant.
5. Die apoptotische Aktivität von nativen ST14A und ST14A-mock wird durch Staurosporin bei 33°C wesentlich stärker erhöht (100% - 200%) als die von ST14A-*CNTF* und ST14A-*GDNF* (50% - 100%). Bei 39°C liegt die Erhöhung der apoptotischen Aktivität von ST14A-mock auf einem deutlich höheren Niveau (> 300%) als die aller anderen Zellen (30% - 100%).

### ***Wnt-5a*-Expression**

Um Änderungen entwicklungsregulierender Proteine während der Differenzierung und aufgrund der Transfektion der ST14A erfassen zu können, wird exemplarisch die Expression des Moleküls *Wnt-5a* untersucht.

### **Nachweis der RNA**

Eine sichere Abgrenzung des RNA-Nachweises von einem DNA-Nachweis gelingt durch die Amplifizierung eines cDNA-Fragments an einem Exon-Intron-Übergang. Von *Wnt-5a* der Ratte ist jedoch bisher lediglich die Sequenz der cDNA (Acc.Nr. AF188333) bekannt. Für ein Pilotexperiment werden daher ein Forward-Primer<sub>(3488)</sub> und vier Reverse-Primer<sub>(3489, 3490, 3491, 3492)</sub> so gewählt, dass durch Kombination des Forward -Primers mit jeweils einem der Reverse -Primer bei einem cDNA-Nachweis eines von vier Fragmenten (168bp, 378bp, 566bp, 735bp) definierter Länge amplifiziert werden sollte. Ein DNA-Nachweis würde sich bei Existenz eines Introns innerhalb dieses Abschnittes durch die Amplifizierung eines größeren als des erwarteten Fragmentes zeigen. Als Kontrolle dient die Amplifizierung von Fragmenten des Housekeeping  $\beta$ -Aktin (Primer 3180 und 3181). Dieser Versuch wird am Beispiel nativer ST14A und ST14A-*CNTF* durchgeführt (Abbildung 8).

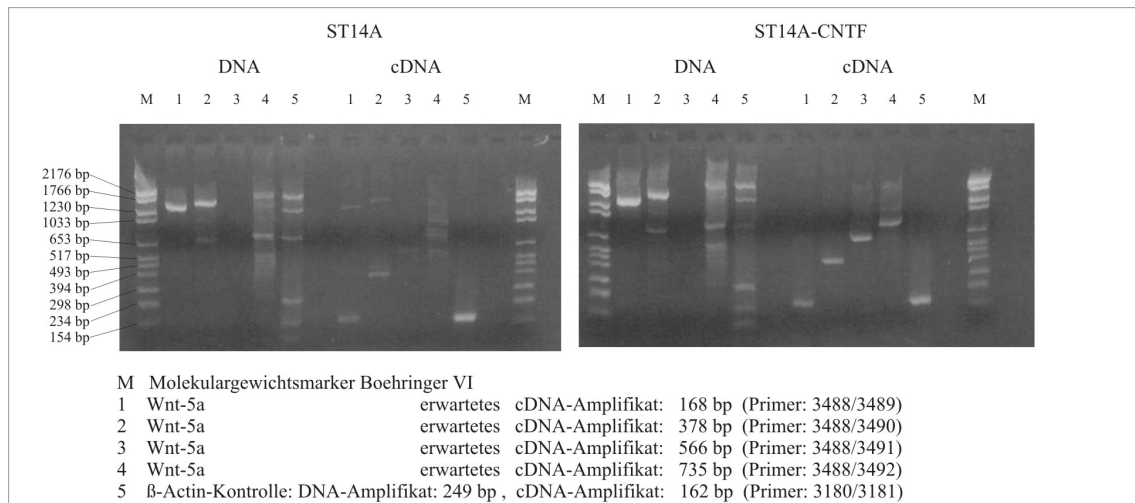


Abb. 8

Abbildung 8. Nachweis der Expression von *Wnt-5a* in nativen ST14A und ST14A-CNTF. Aus der Kombination eines Forward-Primers mit 4 verschiedenen Revers-Primern (Sequenzen und Temperaturprofile siehe Anhang A) werden anhand der bekannten cDNA-Sequenz 4 cDNA Amplifikate unterschiedlicher Länge bei vorhandener *Wnt-5a*-Expression in den Zellen erwartet. Der Nachweis von  $\beta$ -Actin sowohl in der DNA als auch in der cDNA dient als Positivkontrolle für die PCR (Primersequenzen und Temperaturprofile siehe Anhang A).

Das Pilotexperiment ergibt:

1. Das *Wnt-5a*-Bandenmuster beider Zellarten ist identisch.
2. Die Amplifikate aus der cDNA entsprechen den erwarteten Längen.
3. Die Amplifikate 1 und 2 aus der DNA sind etwa 1500 bp länger als für ein Exon erwartet. Mindestens ein Intron muß sich in den Amplifikaten befinden.
4. Die Amplifikate 3 und 4 aus der DNA können nicht eindeutig nachgewiesen werden. Aufgrund der großen Länge mindestens eines Introns ist die PCR möglicherweise nicht mehr optimal angepasst.

Das Amplifikat 1 aus der DNA wird sequenziert und die erhaltene Intronsequenz in die Datenbank EMBL/Genbank (Acc-Nr. AF 348139) eingestellt (Chromatogramme und Sequenzangabe in Anhang B).

### Nachweis des Proteins

Das *Wnt-5a* Protein wird mit dem Western-blot in Probenmaterial verschiedener Gewebe und ST14A-Zellen zunächst in einem Testversuch nachgewiesen. Da der Antikörper gegen *Wnt-5a* der Maus generiert wurde, nach Angaben des Herstellers jedoch den immunhistochemischen Nachweis von neuronalem *Wnt-5a* auch aus Rattengewebe erlaubt, werden als Positivkontrollen Hirngewebeproben sowohl der Maus als auch der Ratte eingesetzt. Für die PAGE wird ein 15%-iges Polyacrylamidgel verwendet. Zum Nachweis werden primär die Antikörper *A1* (für das Housekeeping-Protein  $\beta$ -Actin)

und *A4* (für *Wnt-5a*) und sekundär die korrespondierenden Antikörper *A5* und *A6* eingesetzt (Abbildung 9).

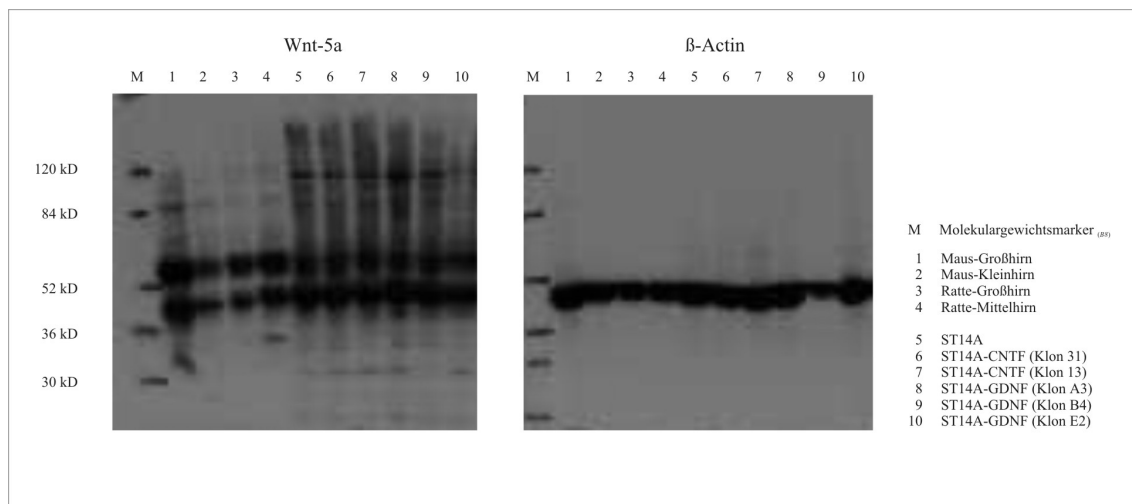


Abb. 9

Abbildung 9. Nachweis von *Wnt-5a*-Protein mittels Western-blot. Es werden Proteinproben aus Hirnpräparaten und von bei 33 C kultivierten Zellen, native ST14A und verschiedene transfizierte ST14A, aufgetragen (30 µg je Tasche). Um eine semiquantitative Aussage erlauben zu können, wird in einem identisch und parallel hergestellten Ansatz das Housekeeping-Protein  $\beta$ -Actin detektiert.

Dieser Versuch zeigt:

1. In den Lanes aller Proben sind im *Wnt-5a*-Blot zwei dominante Banden erkennbar, deren Länge anhand des Marker<sub>(B8)</sub> bei etwa 55 kD und 40 kD liegt.
2. In den Lanes der Zellproben ist mit Ausnahme von Lane 9 (ST14A-*GDNF* Klon B4) eine weitere, aber schwächere Bande bei etwa 30 kD zu erkennen, und zwar am deutlichsten in Lane 8 (ST14A-*GDNF* Klon A3).
3. Die methodische Qualität des Experiments ist durch starke Hintergrundsignale in den Zellproben, deren ungleichmäßige Auftragung und die Verwendung eines nicht signalgebenden Molekulargewichtsmarkers beeinträchtigt.

In allen weiteren Western-blot-Versuchen wird ein vorteilhafterer Molekulargewichtsmarker<sub>(B9)</sub> verwendet, der durch Banden im regelmäßigen Abstand von 10 kD und durch die Reaktion mit ECL eine bessere Auswertung der Western-blots ermöglicht. Für einen gleichmäßigeren Transfer über alle Proteingrößen werden die Proteine im folgenden in einem 4 - 15 %-igen Gradientenpolyacrylamidgel aufgetrennt.

Zur weiteren Spezifitätskontrolle werden Neutralisierungsversuche durchgeführt. Dazu werden die Proteine aus nativen ST14A und ST14A-*GDNF* in einem 4-15%-igem Gradientengel aufgetrennt und drei identische Blot-Membranen hergestellt. Als Molekulargewichtsmarker dient Marker<sub>(B9)</sub>. Die erste

Membran wird in Blocklösung mit *Wnt-5a*-Antikörper<sub>(A4)</sub> inkubiert, die zweite Membran in Blocklösung mit *Wnt-5a*-Antikörper<sub>(A4)</sub> und dem Immunisationspeptid<sub>(B12)</sub> des Antikörpers in 12-fachem molarem Überschuß und die dritte Membran in Blocklösung mit  $\beta$ -Actin-Antikörper<sub>(A1)</sub>. Zur Detektion werden wieder die Sekundärantikörper Anti-Maus-IgG+HRP<sub>(A5)</sub> und Anti-Ziege-

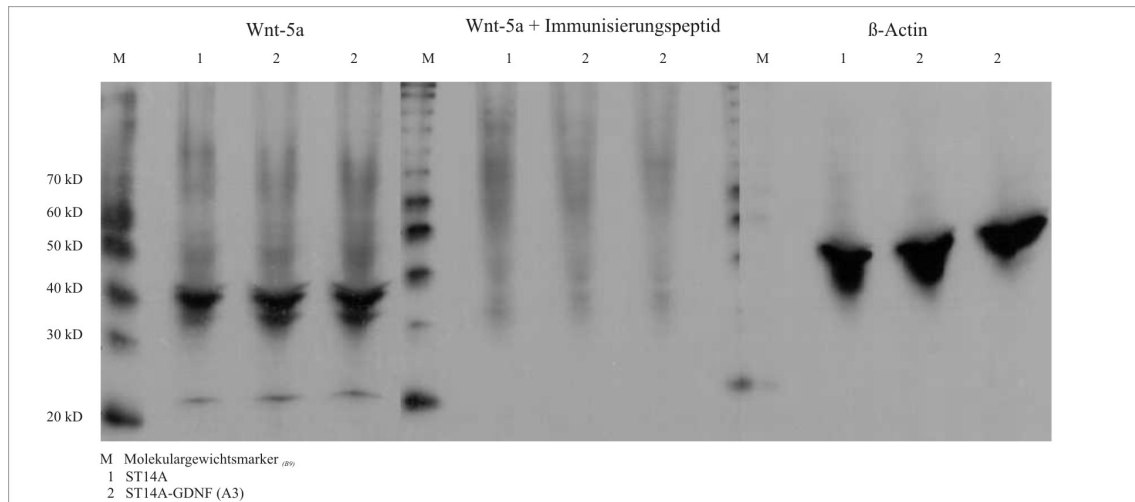


Abb. 10  
 IgG+HRP<sub>(A6)</sub> verwendet (Abbildung 10).

Abbildung 10. Nachweis der Spezifität des *Wnt-5a*-Nachweises durch Koinkubation des Anti-*Wnt-5a*-Antikörpers mit dem Immunisationspeptid. Exemplarisch werden 60 $\mu$ g je Tasche aus Proteinextrakten von nativen ST14A und ST14A-*GDNF* (A3) nach Kultur bei 33 C aufgetragen. Die drei identisch und parallel hergestellten Membranen werden mit den folgenden Antikörperlösungen inkubiert:

- |   |  |
|---|--|
| 1. Primär: Anti- <i>Wnt-5a</i> <sub>(A4)</sub>  | Sekundär: Anti-Ziege-IgG + HRP <sub>(A6)</sub> |
| 2. Primär: Anti- <i>Wnt-5a</i> <sub>(A4)</sub> + Immunisationspeptid <sub>(B12)</sub> | Sekundär: Anti-Ziege-IgG + HRP <sub>(A6)</sub> |
| 3. Primär: Anti- $\beta$ -Actin <sub>(A1)</sub>                                       | Sekundär: Anti-Maus-IgG + HRP <sub>(A5)</sub>  |

Dieses Experiment zeigt:

Die dominanten Signale von Membran 1 lassen sich den in der Datenbank Swiss Prot für das *Wnt-5a* bzw. seine Bruchstücke angegebenen Bandengrößen von 42,2 kD, 38,5 kD und 8,8 kD zuordnen. Das Ergebnis der Membran 2 beweist die spezifische Absorption des *Wnt-5a*-Antikörpers durch das rm-*Wnt-5a*-Immunisationspeptid, da nur noch die Signale des Markers und des unspezifischen Hintergrunds sichtbar sind.

Eine Versuchsserie mit Extrakten aus nativen ST14A und ST14A-*CNTF* ergibt Hinweise auf Expressionsunterschiede im Verlauf der Differenzierung. Am Beispiel von nativen ST14A-Zellen und ST14A-*CNTF* wird mit dem Western-blot (Gel: 4-15%, Antikörper: A1, A4, A5, A6, Marker: B9) die Expression des *Wnt-5a* zu Beginn der Differenzierung in engen Zeitintervallen und bis zum 21. Tag in größeren Zeitabständen in 39°C untersucht. (Abbildung 11).

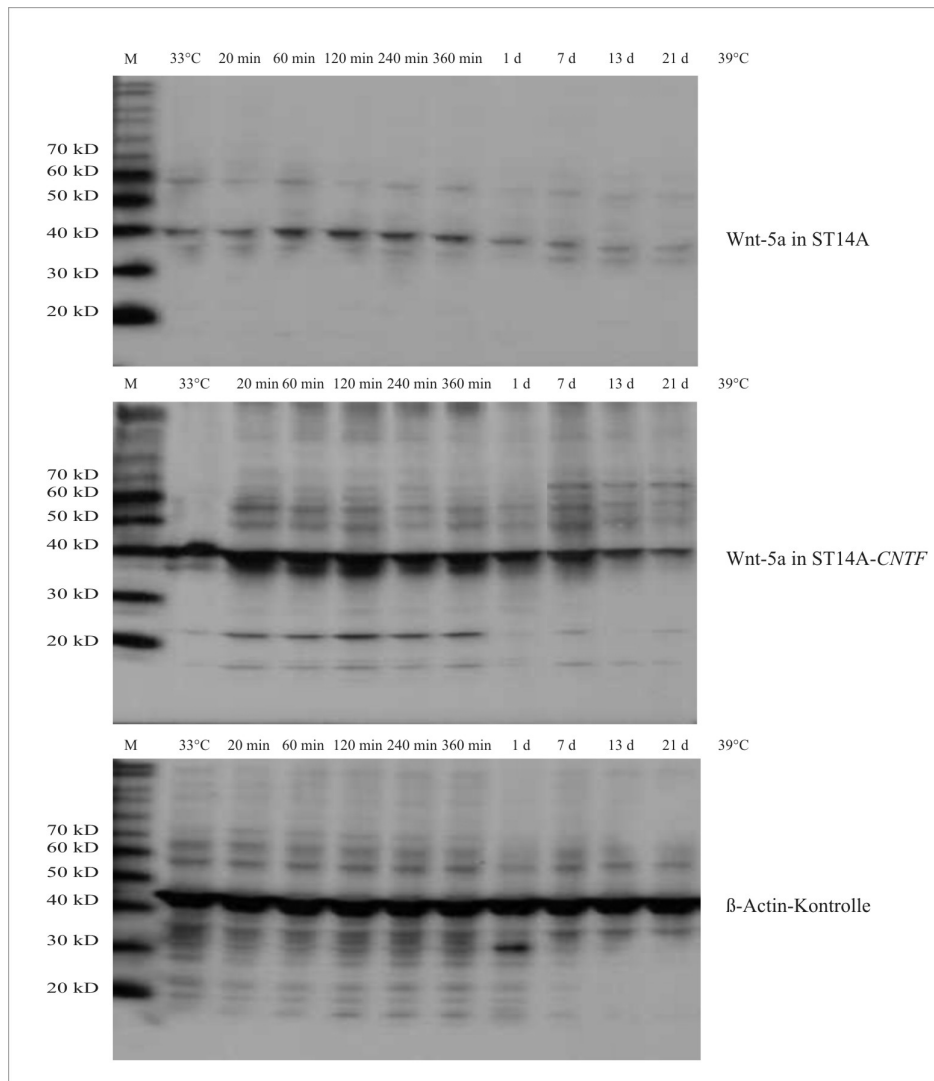


Abb. 11

Abbildung 11. Expression von *Wnt-5a* in nativen ST14A und ST14A-CNTF in proliferierenden Zellen sowie im Verlauf der Differenzierung 39 C nachgewiesen im Western-blot. Um eine semiquantitative Aussage zu erlauben, wird mit den gleichen Proben parallel ein Nachweis des housekeeping-Proteins  $\beta$ -Actin durchgeföhrt und am Beispiel von ST14A gezeigt.

Aus diesem Versuch läßt sich ableiten:

1. Die *Wnt-5a*-Expression ist über den gesamten Untersuchungszeitraum in den ST14A-CNTF deutlicher als in nativen ST14A nachweisbar.
2. Eine maximale *Wnt-5a*-Expression wird in ST14A-CNTF bereits nach 1 bis 2 Stunden bei 39°C, in nativen ST14A erst nach 2 bis 4 Stunden bei 39°C erreicht.
3. Eine leichte Abnahme der *Wnt-5a*-Expression tritt in beiden Zellarten bereits nach 6 Stunden ein, dennoch bleibt der *Wnt-5a*-Nachweis bis zum 21. Tag positiv.

Um den *Wnt-5a*-Nachweis mit einer unabhängigen Methode abzusichern wird eine durchflußzytometrische Expressionsanalyse durchgeführt. Hierzu werden native ST14A, ST14A-*CNTF* und ST14A-*GDNF* aus Kulturen bei 33°C sowie aus Kulturen nach 2 und 5 Tagen bei 39°C geerntet, mittels Sandwich-Technik intrazelluläres *Wnt-5a* mit Anti-*Wnt-5a*<sub>(A4)</sub> und Anti-Ziege-IgG + FITC<sub>(A7)</sub> markiert und im Durchflußzytometer analysiert (Abbildung 12).

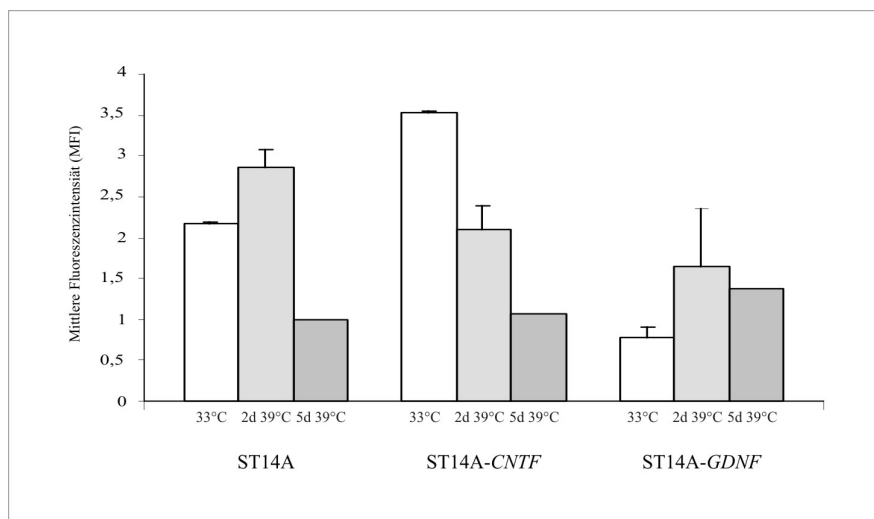


Abb. 12

Abbildung 12. *Wnt-5a*-Expression in nativen ST14A, ST14A-*CNTF*, ST14A-*GDNF* nach Kultur bei 33°C und nach 2- bzw. 5-tägiger Kultur bei 39°C nachgewiesen mittels Durchflußzytometrie. Die mittlere Fluoreszenzintensität wird aus der Messung von 5.000 Zellen ermittelt und stellt ein Maß für die *Wnt-5a*-Expression da. Bei doppelt durchgeführten Messungen werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Als Ergebnis zeigt sich, dass in Übereinstimmung mit den Western-Blot-Resultaten proliferierende ST14A-*CNTF* (33°C-Kultur) die höchste *Wnt-5a*-Proteinexpression aufweisen. Abweichend von den Western-Blot-Daten ist diese jedoch bei 39°C schneller rückläufig. ST14A-*GDNF* exprimieren initial am wenigsten *Wnt-5a*. Die Expression ist aber langsamer rückläufig als in nativen ST14A und ST14A-*CNTF*.

### Nachweis der Sekretion

Um eine Aussage über die Sekretion des *Wnt-5a* zu erhalten, wird von nativen ST14A, ST14A-*CNTF* und ST14A-*GDNF* nach Kultur bei 33°C und 2 Tagen bei 39°C Probenmaterial extrazellulärer, löslicher Proteine im Kulturüberstand mittels Western-blot (Gel: 4-15%, Antikörper: A1, A6, Marker: B9) analysiert (Abbildung 13).

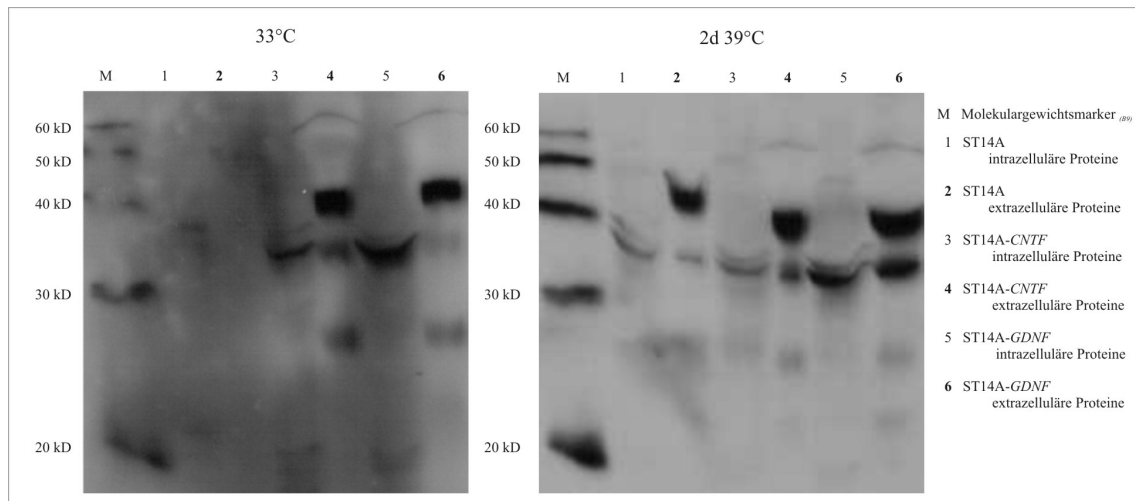


Abb. 13

Abbildung 13. Nachweis von sezerniertem *Wnt-5a* mittels Western-blot. Es werden 25-fach konzentrierte Zellkulturüberstände und Zellextrakte von ST14A, ST14A-CNTF und ST14A-GDNF nach Kultur bei 33 °C und 2 Tagen bei 39 °C alternierend aufgetragen und *Wnt-5a*-Proteine im Sandwichverfahren detektiert.

Die Aussagekraft des Western-blots der bei 33°C kultivierten Zellen ist durch eine unspezifische Hintergrundfärbung qualitativ beeinträchtigt. Das gilt besonders für die Beurteilung der Lanes 1 und 2 (intra- und extrazelluläre Proteine von nativen ST14A). Es finden sich jedoch sowohl bei 33°C als auch bei 39°C in allen drei Überständen die mit den Zellextrakten übereinstimmenden *Wnt-5a*-Doppelbanden um 42 kD. Sie sind jedoch schwächer als zusätzlich aufgetretene Banden mit um etwa 10 kD höherem Molekulargewicht.

## ***Diskussion***

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine In-vitro-Charakterisierung von neuronalen Progenitorzellen mit und ohne Transfektion neurotropher Faktoren. Dazu wurden nichttransfizierte, scheintransfizierte, *CNTF*-transfizierte und *GDNF*-transfizierte Zellen der immortalisierten striatalen Vorläuferzelllinie der Ratte ST14A untersucht.

Es sollten dabei funktionelle Eigenschaften berücksichtigt werden, um Daten bezüglich transfektionsbedingter Unterschiede der Zellen für ihre Eignung zu In-vivo-Versuchen (intrastriale Transplantation in läionierte Gehirne von Ratten) zu erhalten.

Ein ideales Transplantationsmaterial sollte folgende Eigenschaften aufweisen (Zager, Black, 1988; Rossi, Cattaneo, 2002):

1. Fähigkeit zur Restauration des funktionellen Defizits, das den Anlass zur Transplantation gibt.
2. Lange Lebensdauer des Transplantats.
3. Geringe Alteration durch die Transplantationsprozedur bzw. durch pathologische Prozesse am Transplantationslokus (hohe Resistenz gegenüber umgebungsbedingten Stressfaktoren wie Nährstoffmangel, Temperaturveränderung, toxische Einflüsse).
4. Wirkung auf das das Transplantationsgebiet umgebende Gewebe im Sinne von Protektion verbliebener Organfunktionen (Sekretion supportiver Substanzen) aber nicht im Sinne von Alteration (keine Volumenzunahme in vivo, keine Sekretion von toxischen, supprimierenden oder onkogene Mediatoren, kein steel-Effekt).
5. Keine bzw. möglichst geringe Immunogenität.
6. Keine Kanzerogenität (kein invasives Wachstum und keine Metastasierung des Transplantats).

Aus pharmakologischer Sicht bestehen ferner Erfordernisse der Qualitätssicherung. Das Transplantationsmaterial sollte idealerweise eine kontrollierte, standardisierte und valide charakterisierte stabile Struktur aufweisen und unbegrenzt verfügbar sein.

Im Fall der neuronalen Transplantation sind diese Kriterien eng an die Quelle des Transplantationsmaterials gebunden. Experimentelle Untersuchungen dazu erstrecken sich auf Xenografts, adulte und embryonale Stammzellen sowie immortalisierte und anderweitig genetisch modifizierte Zellen (Dunnett, Bjorklund, 1999). Stammzellen sind durch die Fähigkeit zu Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung charakterisiert (Okano, 2002a; Okano, 2002b; Ostenfeld, Svendsen, 2003). Zur Ermöglichung langfristiger therapeutischer Effekte dürfen sie nicht selbst an den Ursachen der jeweiligen Erkrankung zu Grunde gehen, sondern sollen in das Empfängergewebe integriert werden. Der Einsatz adulter Stammzellen, z. B. aus dem Bulbus olfactorius unterliegt derzeit noch quantitativen und durch beschränktes Differenzierungspotential bedingten Limitationen (Prentice, 2004; Levesque, Neumann, 2002). Bei Xenotransplantationen bestehen größere immunologische Probleme. Bisher erscheint der Einsatz embryonaler Stammzellen

für die Zellersatztherapie neurodegenerativer Erkrankungen noch am vielversprechendsten (Dunnett et al., 2001; Park et al., 2002).

Die Aufgaben neuronaler Transplantate beschränken sich dabei nicht auf die Reinnervation und Produktion defizienter Neurotransmitter, sondern erstrecken sich auf die trophische Unterstützung des das Transplantationsgebiet umgebenden Gewebes zur Erhaltung verbliebener Funktionen und auf die Stimulation des neuroregenerativen Potentials. Die Freisetzung neurotropher Faktoren kann diese Aufgaben vermitteln. Da die protektiven und trophischen Effekte nicht nur kurzfristig erreicht werden sollen (Rossi, Cattaneo, 2002; Dunnett, 1999), müssen die neurotrophen Faktoren dauerhaft freigesetzt werden. Das kann direkt z. B. mit retroviralen oder adenoviralen Vektoren oder indirekt über genetisch modifizierte Zellen erfolgen. Die direkte Form ist allerdings mit dem Nachteil möglicher Zytotoxizität der Vektoren und von Immunreaktionen gegen virale Antigene verbunden (Blits et al., 2000; Lesch, 1999). Die Transfektion der in dieser Arbeit untersuchten ST14A diente der Bereitstellung eines Vehikels zur permanenten Freisetzung neurotropher Substanzen unter Vermeidung immunologischer Probleme.

Wie gut ein Transplantat in der Lage ist, ein funktionelles Defizit im Organismus zu beheben und dadurch die Symptome einer Erkrankung zu lindern oder zu beseitigen, hängt von vielen Faktoren ab. Nicht nur die Eigenschaften von Transplantat und Empfängerorganismus, sondern auch deren Zusammenspiel ist von entscheidender Bedeutung. Werden Organe oder Gewebe verpflanzt, läßt sich ex-vivo nicht die Funktion des Transplantats in vivo, seine funktionelle Integrität, beurteilen. Oft ist aber anhand morphologischer Merkmale abschätzbar, ob ein pathologischer Prozess im Spenderorganismus, die Aufbereitung oder der Transport einen Schaden am Transplantat verursacht und dadurch seine Qualität beeinträchtigt haben.

Für eine lange Lebensdauer transplantierte Zellen ist eine hohe Vitalität von entscheidender Bedeutung. Vitalität ist hierbei ein umfassender Begriff, der mehrere einzeln messbare Parameter in sich vereint. Dazu gehören die Stoffwechselaktivität, die Vermehrungsrate und die Sterberate der Zellen. Diese Größen sind nicht konstant, sondern unterliegen via Signaltransduktion dem Einfluß äußerer Faktoren. Die Variationsbreite ist dabei genetisch determiniert.

Die Quantifizierung der Proliferation von Zellen kann auf drei verschiedenen Prinzipien basieren. Die einfachste Methode ist die Zählung der Zellen. Die Anzahl von Zellen stellt immer das Resultat aus Zellvermehrung und Zelluntergang da. Eine selektive Erfassung der Vermehrung, d.h. der Mitoseaktivität, gelingt durch Methoden zur Quantifizierung der DNA-Synthese. Sie basieren auf dem Einbau markierter Nukleoside oder Nukleosidanaloga in neu synthetisierte DNA. Beispiele dafür sind der radioaktive <sup>3</sup>H-Thymidin-Assay und der kolorimetrische Bromdesoxyuracil-Assay. Die Ergebnisse aus beiden Messungen korrelieren gut miteinander (Wittstock et al., 2001). Nur bedingt trifft das für die Ergebnisse der ebenfalls als Proliferationsassays gewerteten Tests zur kolorimetrischen Bestimmung der Aktivität mitochondrialer Enzyme wie z.B. den Wst-1 Test zu. Lediglich beim Vergleich von Zellarten mit gleicher Stoffwechselaktivität kann die Aktivität mitochondrialer Enzyme

als Maß der Proliferation gewertet werden. In diesem Falle bieten die kolorimetrischen Enzymassays wegen ihrer unkomplizierten und schnellen Durchführung Vorteile (Hipper, Isenberg, 2000; Wittstock et al., 2001).

Beim Vergleich der transfizierten und nativen ST14A-Linien kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Stoffwechselaktivität von der Transfektion unbeeinflusst bleibt. Deshalb wurde als Proliferationstest nur der DNA-Synthese-Assay mittels <sup>3</sup>H-Thymidineinbau verwendet, während der Wst-1 Test der Erfassung von Unterschieden in der Stoffwechselaktivität diene.

### **Metabolische Aktivität**

Differenzierende Zellen erfahren eine funktionelle und zytoskelettale Umstrukturierung. Bei der Reifung von Zellen laufen nacheinander unterschiedliche Prozesse ab. Zunächst wird durch spezifische und unspezifische Veränderungen im externen Milieu, in unserem Fall durch die Temperaturerhöhung, der Differenzierungsprozess initiiert. Die erste Phase besteht im Zellumbau. Sie ist durch Änderungen von Enzymaktivitäten, des Transkriptionsmusters und der Zytoarchitektur der Zelle gekennzeichnet und mit einem erhöhten Nährstoffbedarf verbunden (Morgane et al., 1993). Nach Abschluß dieser Differenzierungsphase liegt eine spezialisiertere Zelle vor, in der nur noch Teile der zuvor möglichen zellulären Funktionen aktiv sind. Ausdifferenzierte Zellen, wie Astrozyten und Neuronen, befinden sich in Zellzyklusruhe, der sogenannten G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus (Andreeff et al., 2000). Dabei ist die energieaufwendige Synthese von Makromolekülen reduziert. Sie könnte allerdings für die Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen im Rahmen der Synaptogenese und Ausbildung von gap-junctions noch in begrenztem Umfang aufrechterhalten bleiben. Am Beispiel von Lymphozyten untersucht, ist die metabolische Aktivität ruhender Zellen geringer als die von aktiven, proliferierenden Zellen (Frauwirth, Thompson, 2004). Unsere Ausgangshypothese bestand zunächst darin, dass in allen ST14A unter Differenzierungsbedingungen (39°C) die metabolische Aktivität abfällt.

Mitochondriale Dehydrogenasen sind Bestandteil der Stoffwechselkaskaden zur Energiebereitstellung der Zelle (Genova et al., 2003; Bunik, 2003). Ihre Aktivität konnte mit dem Wst-1-Test einfach bestimmt werden.

Entsprechend den Versuchen von Johnson et. al. 1994 vermuteten wir bei einer Aktivierung der *CNTF*-Signaltransduktionswege eine erhöhte metabolischen Aktivität der ST14A-*CNTF* gegenüber nativen ST14A. Bei ST14A-*GDNF* hielten wir aufgrund der als in vivo trophisch unterstützend beschriebenen *GDNF*-Wirkung (Toledo-Aral et al., 2003) ein ähnliches Ergebnis für wahrscheinlich. Allerdings besteht wegen der angewandten Transfektionsmethode (Weinelt et al., 2003) die Möglichkeit der Konstruktinsertion innerhalb von metabolismusrelevanten Genloci. Infolgedessen könnten vermindert funktionsfähige Translationsprodukte die Stoffwechselaktivität einschränken. Wir gehen aber davon aus, dass zum Abbruch von Stoffwechselwegen führende Varianten durch die Selektion in der Zellkultur unterlegen wären.

Orientierende Versuche wurden mit täglicher Wst-1-Messung über einen Zeitraum von zwei Wochen durchgeführt (Abb. 1 und 2). Da die Zellen in gleicher Konzentration ausgesät wurden, sich die Zellzahl aber dem unterschiedlich starken Wachstum in den Kulturen entsprechend vergrößerte, drückt sich im Kurvenverlauf einer Zellart nicht nur der Metabolismus, sondern auch die Zellvermehrung aus. Beim Vergleich der Kurven verschiedener Zellen ist zu beachten, dass die im Wst-1-Test gemessene OD immer ein Ausdruck für Zellzahl und metabolische Aktivität pro Zelle ist.

Es fällt auf, dass der Meßwert dieses Wst-1-Tests aller Zellen nach 3-4 Kulturtagen bei 33°C höher als bei 39°C ist. Ausserdem erreichen alle Zellen ihr Maximum bei 33°C zu einem früheren Zeitpunkt als bei 39°C. Dieses Ergebnis interpretieren wir nicht unbedingt als verringerte Stoffwechselaktivität unter Differenzierungsbedingungen, da sich darin auch der bei 33°C grössere Einfluß der Proliferation auf die gemessene Enzymaktivität ausdrücken könnte. Dass ST14A-*CNTF* sowohl bei 33°C als auch bei 39°C die höchste Stoffwechselaktivität erreichen, entspricht den Erwartungen. Dass dem entgegengesetzt ST14A-*GDNF* bei permissiver Temperatur einen stark verzögerten Anstieg und bei nicht permissiver Temperatur sogar ein Persistieren auf niedrigem Niveau zeigen, ist überraschend.

Wie stark diese Kurvenverläufe eine veränderte Proliferation oder eine veränderte metabolische Aktivität pro Zelle widerspiegeln, kann diesem Ergebnis allein nicht entnommen werden.

Der tägliche Mediumwechsel bewirkt einerseits eine Erneuerung des Nährstoffangebotes und andererseits eine Beseitigung von Zerfalls- und Sezernierungsprodukten. Daher kann sich ein steady-state mit konstanter Stoffwechselaktivität/Proliferation einstellen, wie es in den Abbildungen 2a und 2c erkennbar ist. Ohne Mediumwechsel entwickelt sich umgekehrt eine nutritive Mangelsituation bei gleichzeitiger Akkumulation von Zerfalls- und Sezernierungsprodukten. Der in den Abbildungen 2b und 2d sichtbare Abfall der Meßwerte nach Erreichen des Peaks entspricht dem erwarteten Verlauf bei verstärktem Absterben von Zellen. Bemerkenswert ist, dass alle Zellkulturen ohne Mediumwechsel zunächst einen schnelleren Anstieg der Stoffwechselaktivität/Proliferation zeigen als bei täglichem Mediumwechsel. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass ST14A Zellen auch trophische Faktoren in das Medium abgeben, die bei täglichem Mediumwechsel ausgewaschen werden. ST14A-*GDNF* scheinen sogar stärker auf die Kumulation solcher Faktoren als auf die Erneuerung des Nährsubstrates zu reagieren. Nach mehr als 10-tägiger Kultur wirkt sich endgültig der Nährstoffmangel limitierend aus.

Um den Einfluß der Proliferation auf die Stoffwechselergebnisse zu minimieren wurde eine geänderte Versuchsanordnung gewählt. Dazu wurden die Zellen erst 24 Stunden vor der Messung in standardisierter Dichte in die 96-Well-Flachbodenplatten<sub>(V1)</sub> ausgesät. Durch den Vergleich von vier Meßzeitpunkten (vor Differenzierung versus 3, 6 und 13 Tage nach Differenzierungsstart) wurde in Mehrfachuntersuchungen eine statistische Auswertung angestrebt.

Die Bestimmung der metabolischen Aktivität unter weitestgehendem Ausschluß des proliferativen Einflusses zeigt bei nativen ST14A den Trend einer rückläufigen metabolischen Aktivität während der Differenzierung. Wir interpretieren dies als „natürliches Verhalten“ der differenzierenden ST14A.

ST14A-*CNTF* zeigen zu allen Zeitpunkten die vergleichsweise höchste metabolische Aktivität. Der Unterschied gegenüber allen anderen Zellen ist nach spätestens 6 Tagen signifikant. Bis zum 6. Tag bleibt der Metabolismus der ST14A-*CNTF* auf einem um etwa 20 bis 30 % höheren Niveau als der der anderen Zellen und sinkt bis zum 13. Tag tendenziell, aber nicht signifikant ab. Dieses Ergebnis bestätigt die erwartete Steigerung der Stoffwechselaktivität unter *CNTF*-Einfluß (Johnson et al., 1994). Die Kinetik lässt eine gegenüber nativen ST14A verlängerte Dauer der Umbauphase vermuten. Darin könnte sich eine stärkere Differenzierungskapazität ausdrücken.

Die metabolische Aktivität von ST14A-*GDNF* hingegen liegt bei 33°C signifikant unterhalb der von nativen ST14A. Dies entspricht dem Ergebnis der ersten Versuchsanordnung. Daher ist ein stoffwechselreduzierender Effekt der *GDNF*-Transfektion zu vermuten, ein Effekt, der der Intention der *GDNF*-Transfektion auf den ersten Blick zu widersprechen scheint. Die verringerte metabolische Aktivität der ST14A-*GDNF* kann jedoch auch durch eine verminderte Proliferationsaktivität erklärt werden, die im <sup>3</sup>H-Thymidin-Test nachweisbar war (siehe Abbildung 4). Andererseits muß die verringerte Stoffwechselaktivität nicht nur Ausdruck einer verringerten Proliferation der Zellen sein, sondern könnte auch eine erhöhte Reaktionsbreite widerspiegeln. Bei der Erstellung eines Genexpressionsprofils von ST14A-*GDNF* im Vergleich zu nativen und *CNTF*-transfizierten ST14A mittels Microarray-Technik wurden 43 Gene identifiziert, die ausschließlich in den *GDNF*-transfizierten Zellen ein verändertes Expressionsmuster zeigen (Pahnke et al., 2004). Bei ST14A-*GDNF* wurde zudem eine verminderte Expression von vier Schlüsselenzymen der Cholesterolsynthese ab mindestens 24 Stunden nach Differenzierungsstart gefunden (Pahnke et al., 2004). Die Suppression dieses energieaufwendigen Signalweges passt zu der im Vergleich mit allen anderen untersuchten Zellen verringerten Stoffwechselaktivität. Möglicherweise weisen die ST14A-*GDNF* einen verringerten Grundumsatz auf, d.h. eine Stoffwechselveränderung, die in Situationen metabolischen Stresses im Sinne einer effizienteren Ressourcennutzung sogar einen Selektionsvorteil darstellen könnte. Eine Lösung der Fragen, ob der weniger aktive ST14A-*GDNF*-Metabolismus sich dadurch und darüberhinaus durch eine verringerte Makromolekülsynthese begründen läßt, könnte durch Beobachtung des Verhaltens unter Belastung mit suboptimalen Kulturbedingungen gelingen.

Die biphasische Kinetik der Stoffwechselaktivität der ST14A-*GDNF* in Abbildung 3 steht mit der in Abbildung 2d in Übereinstimmung. Es ergibt sich jedoch die Frage, ob der Differenzierungsreiz durch die Temperaturerhöhung auf ST14A-*GDNF* erst zeitlich verzögert oder nur passager wirksam wird. Ein weiterer Hinweis wäre ein verzögerter oder verringerter Abfall der Mitoseaktivität bei 39°C.

Die metabolische Aktivität der scheintransfizierten ST14A-mock liegt auffällig unterhalb der von nativen ST14A. Der Unterschied ist an fast allen Meßpunkten, nämlich 33°C, 3 Tage und 6 Tage 39°C, signifikant. Da die direkte Wirkung eines transfizierten Translationsproduktes ausscheidet, können wir dieses Ergebnis nur mit der zufälligen Integration des Genkonstruktes in das Genom der Zellen und daraus folgender Veränderung der genetischen Determination der zellulären Vitalparameter erklären.

## DNA-Synthese

Die Progenitorzelllinie ST14A wurde mit der Transfektion des SV 40 Large-T-Antigen temperaturabhängig immortalisiert. Bei einer verringerten Expression dieses Antigens wird die Inhibition der Zelldifferenzierung aufgehoben. Daher erwarten wir unabhängig von der Zellart bei 39°C eine geringere Mitoseaktivität mit entsprechend geringerer DNA-Synthese als bei 33°C. Beobachtungen während der Kultivierung der Zellen (Veränderung der Zellzahl, Geschwindigkeit des Konfluierens) ließen uns zunächst vermuten, dass die Mitoseaktivität von ST14A-*CNTF* höher ist als die von nativen ST14A, während die Mitoseaktivität von ST14A-*GDNF* geringer erwartet wurde.

Die DNA-Synthese wurde im gleichen Versuchsaufbau wie die metabolische Aktivität in Intervallen von 3, 6 und 13 Tagen gemessen. Die Ergebnisse stellen wie für die Stoffwechselfmessungen erläutert die innerhalb von 24 Stunden auftretenden Proliferationsunterschiede dar.

Innerhalb der ersten 3 Tage nach Temperaturerhöhung fällt die DNA-Synthese-Aktivität aller Zellarten dramatisch und hoch signifikant ab. Dies entspricht der erwarteten Inaktivierung des SV 40 Large-T-Antigens bei 39°C. Die Immortalisierung besteht bei nichttransfizierten wie auch bei transfizierten Zellen weiterhin temperaturabhängig nur bei 33°C. Da anhand exemplarischer Messungen im weiteren Verlauf der Differenzierung keine weitere Veränderung der DNA-Synthese gegenüber dem dritten Tag bei 39°C mehr festgestellbar war, verzichteten wir auf weitere statistisch auswertbare Messungen nach den längeren Zeiträumen von 6 und 13 Tagen.

Bei 33°C zeigen ST14A-*CNTF* gegenüber allen anderen Zellen eine deutlich höhere DNA-Synthese. Damit werden die mikroskopischen Zellkulturbeobachtungen bestätigt.

Überraschend ist das Absinken der DNA-Synthese von ST14A-*CNTF* unter die der nativen ST14A und ST14A-mock bei 39°C. Zusammen mit der bei 33°C erhöhten DNA-Synthese deuten wir dieses Ergebnis als überschießende Reaktion auf den Differenzierungsreiz. Dies passt auch zu der aus den Ergebnissen der metabolischen Aktivität postulierten Hypothese einer erhöhten Differenzierungskapazität der ST14A-*CNTF*.

Alle anderen Zellen, native ST14A, ST14A-mock und ST14A-*GDNF*, unterscheiden sich in der DNA-Synthese bei 33°C nicht. Die Zellkulturbeobachtungen bezüglich ST14A-*GDNF* sind damit nicht bestätigt. Drei Tage nach Differenzierungsstart zeigen jedoch ST14A-*GDNF* eine signifikant niedrigere DNA-Synthese-Aktivität als alle anderen Zellen. Von *GDNF* ist bekannt, dass er die Entstehung und Entwicklung dopaminerger Neuronen fördert (Akerud et al., 1999). Jüngst wurde gezeigt, dass *GDNF* auch in Knochenmarkstromazellen, aus denen durch Transfektion einer Notch-Domäne postmitotische, neuronale Zellen erzeugt wurden, effizient die Differenzierung zu Tyrosinhydroxylase-positiven, Dopamin produzierenden Zellen bewirken kann (Dezawa et al., 2004). Neuritenaussprossung via *GDNF* schließt die proliferationsmodulierenden Signaltransduktionswege der MAP-Kinasen, PI3-Kinasen und Src-Kinasen ein (Sariola, Saarma, 2003). Dagegen wurde in Neuroblastomzellen auch eine von ERK unabhängige durch *GDNF* induzierte Proliferationssteigerung

über die Aktivierung des Akt/p70S6K-Weges nachgewiesen (Hirata, Kiuchi, 2003). Die im Vergleich zu nativen ST14A bei 39°C deutlich geringere DNA-Synthese der ST14A-*GDNF* scheint durch eine stärkere Differenzierung erklärbar zu sein. Die geringere Aktivität des ST14A-*GDNF*-Metabolismus läßt sich dabei auch durch eine verringerte Makromolekülsynthese begründen. Die Kinetik der metabolischen Aktivität von ST14A-*GDNF* wäre dann aber nicht mit einer Verzögerung der Differenzierung erklärbar. Bei der Erstellung des Genexpressionsprofils von ST14A-*GDNF* konnten die verstärkt exprimierten Gene hauptsächlich Signalwegen zugeordnet werden, die Axonaussprossung und Neuritenwachstum fördern (Pahnke et al., 2004). Eine verringerte Expression wurde bei Genen, die diese Effekte antagonisieren, gefunden. Zusammen mit der im Ergebnis der Expressionsanalyse gefundenen vorwiegenden Induktion von Genen zur Regulation von Differenzierung und Migration bei *GDNF*-Überexpression kann die bei 39°C signifikant geringere DNA-Synthese von ST14A-*GDNF* als Indiz für eine stärkere Differenzierung gewertet werden.

### **Apoptose**

Ein weiterer Vitalitätsparameter ist die Sterberate der Zellen. Hierbei muß zwischen Nekrose und Apoptose differenziert werden. Im Gegensatz zu traumatischen, ischämischen und entzündlichen Zellalterationen sind Differenzierungs- und Regenerationsprozesse überwiegend mit apoptotischem Zellsterben verbunden.

Apoptose ist ein phasenhaft ablaufender Prozeß. Stimulation, Signaltransduktion und Effektorphase führen in eine „Postmortemphase“ (Vaux, Strasser, 1996). Die dabei auftretenden charakteristischen Veränderungen der Zellstruktur, DNA-Fragmentierung in 180 bp Bruchstücke, Chromatinkondensation, Kernzerfall und schließlich Schrumpfung und Zerfall der ganzen Zelle in Apoptosekörperchen, ermöglichen eine Abgrenzung zur Nekrose. Die Initiierung einer Apoptose kann via extrinsischem Signalweg, über die Aktivierung der Rezeptoren von beispielsweise CD95(Fas) oder TNF, oder via intrinsischem Signalweg, rezeptorunabhängig über die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c in das Cytosol erfolgen. Beide Wege münden in die Aktivierung spezifischer Effektorproteine der Caspasenfamilie (Nicholson, Thornberry, 2003; Zimmermann et al., 2001; Zimmermann, Green, 2001; Sartorius et al., 2001). Frühe Zeichen einer Apoptose sind an der Zellmembran, den Mitochondrien und im Zellplasma zu finden, während die charakteristischen intranukleären Prozesse der DNA-Fragmentierung erst unmittelbar vor dem Zerfall der Zelle und der Bildung von Apoptosekörperchen (apoptotic bodies) ablaufen.

Je nachdem, welche apoptotische Phase erfasst werden soll, können verschiedene Nachweisverfahren zum Einsatz kommen. Erstes Anzeichen der Induktion von Apoptose ist die Aktivierung von Initiatorcaspasen und anderen Bestandteilen apoptotischer, oft spezies- und zellartspezifischer Signalkaskaden. Deren Nachweis kann in der Regel mit spezifischen Antikörpern geführt werden. Eine sehr frühe apoptotische Veränderung der Zellmembran, die Translokation des Phosphatidylserins an die Außenseite der Zellmembran, kann durch die spezifische Bindung von fluoreszenzmarkiertem

AnnexinV an Phosphatidylserin durchflußzytometrisch und immunhistochemisch nachgewiesen werden (Lecoeur et al., 2001; Clodi et al., 2000). Ebenfalls mit spezifischen Antikörpern detektierbar ist die Expression des 38 kD Proteins APO2.7 an der Mitochondrienmembran, ein weiteres Merkmal frühapoptotischer Zellen (Riemschneider et al., 2001). Die gemeinsame Endstrecke aller apoptischen Zellen in Form der DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen wird am häufigsten mit TUNEL-Assays nachgewiesen. Sie können immunhistochemisch und durchflußzytometrisch ausgewertet werden.

Bei allen Apoptosenachweisverfahren treten spezifische Probleme bei der Ergebnisinterpretation auf. Ein Caspasennachweis ist kein morphologisches Korrelat apoptotischer Zellen, sondern ein Hinweis auf Apoptoseinduktion. Die früh einsetzende Translokation des Phosphatidylserins ist auch bei spätapoptotischen und nekrotischen Zellen nachweisbar, so dass eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose nur eingeschränkt möglich ist. (Lecoeur et al., 2001; Riemschneider et al., 2001). Ebenso ist die mitochondriale APO2.7-Expression nicht ganz apoptosespezifisch (Bussing et al., 1999). Die durchflußzytometrische Auswertung aller Verfahren bietet den großen Vorteil der effizienten Untersuchung vieler Proben. Allerdings entgehen dabei in jedem Falle Zellen, die komplett in Apoptosekörperchen zerfallen sind, der Auswertung. Das Nichterfassen dieser im Apoptoseprozess sehr weit fortgeschrittenen Zellen kann bei ausschließlicher Betrachtung des Anteils angefärbter Zellen die Ergebnisse von Proben mit sehr hoher apoptotischer Aktivität verfälschen.

In dieser Arbeit wird der Apoptosenachweis durch einen klassischen TUNEL-Assay mit einer modifizierten durchflußzytometrischen Auswertestrategie geführt. Durch Einbeziehung der als MnX gemessenen Farbintensität pro Zelle wird die im klassischen TUNEL-Assay markierte Strangbruchanzahl berücksichtigt.

Wir erwarteten für alle Zellarten unter Differenzierungsbedingungen eine gegenüber Proliferationsbedingungen erhöhte Apoptose (Vaux, Strasser, 1996; Osterhout et al., 2002). Unsere Ergebnisse deuten jedoch lediglich bei nativen ST14A in diese Richtung. Bei allen transfizierten Zellen findet dagegen von 33°C nach 39°C eine tendenzielle Abnahme der apoptotischen Aktivität statt. Generell lassen diese Ergebnisse jedoch aufgrund der sehr hohen Streuung und dem Nichterfassen spätapoptotischer Zellen nur grobe Aussagen zu. Deshalb kann der Einfluss der frühen Differenzierung auf die basale apoptotische Aktivität von nichttransfizierten wie transfizierten ST14A-Zellen aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht sicher beurteilt werden.

Eine transfektionsbedingte Veränderung der Apoptose erscheint aufgrund der zufälligen Lokalisation der Konstruktinsertion ebenso wahrscheinlich wie die dadurch bedingte Beeinflussung der anderen Vitalitätsparameter. Eine Aktivierung der Signaltransduktionswege von *CNTF* (Linker et al., 2002; Ernfors, 2000; Middleton et al., 2000; Hermann et al., 2001) und *GDNF* (Clarkson et al., 1995; Burke et al., 1998; Ghribi et al., 2001) läßt eher einer Protektion der Zellen vermuten. Unsere mikroskopischen Zellkulturbeobachtungen ergaben darauf jedoch keine Hinweise.

Entgegen unserer Erwartung zeigen ST14A-*CNTF* in den TUNEL-Untersuchungen im Vergleich zu allen anderen Zellen immer die höchste apoptotische Aktivität. In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für einen apoptosereduzierenden Effekt von *CNTF* (Oshitari, Adachi-Usami, 2003; Watanabe, Fukuda, 2002; Catala, 2002; Linker et al., 2002; Oliveira et al., 2002; Lee et al., 2001). Arbeiten an sympathischen Neuronen (Freidin, 2001) und unreifen, sensorischen Neuronen (Middleton et al., 2000) zeigen übereinstimmend, dass *CNTF* über eine Erhöhung des Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) die Apoptose hemmen kann. NF- $\kappa$ B ist als ApoptosSuppressor bekannt und wirkt unter anderem über die Blockade der Caspase 8-Aktivierung (Wang et al., 1998), einer Initiator-Caspase der extrinsischen Apoptoseinduktion. Versuche an Prooligodendrozyten (Ness, Wood, 2002) belegen, dass *CNTF* jedoch vor einer Apoptoseinduktion via intrinsischem, mitochondrialem Weg nicht immer schützt. An Motoneuronen wurde für *GDNF*, aber nicht für *CNTF* ein Apoptoschutz über die Expressionsinhibition von neuronaler NO-Synthase (*nNOS*) und verstärkte Expression von *c-Jun* und *p75*, Bestandteile des mitochondrialen Apoptoseweges (Salehi et al., 2002) nachgewiesen (Wu et al., 2003). Der intrinsische Weg macht die überwiegende Mehrheit der Apoptosevorgänge (Nicholson, Thornberry, 2003) aus und ist mit Differenzierungsprozessen assoziiert (Osterhout et al., 2002). Daher vermuten wir in der offenbar erhöhten apoptotischen Aktivität der *CNTF*-transfizierten Zellen in Übereinstimmung mit der gegenüber nativen ST14A verringerten DNA-Synthese bei 39°C einen weiteren möglichen Ausdruck für eine stärkere Differenzierungspotenz.

ST14A-*GDNF* unterscheiden sich hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens bei 33°C nicht von nativen und scheintransfizierten ST14A. Bei 39°C liegen sie jedoch deutlich unterhalb der apoptotischen Aktivität nativer Zellen. Ob dies Ausdruck einer *GDNF*-spezifische Protektion (Wu et al., 2003; Ghribi et al., 2001; Savory et al., 2003; Clarkson et al., 1995) sein könnte, muß allerdings aufgrund des sehr ähnlichen Verhaltens scheintransfizierter Zellen offen bleiben.

### **Reaktion auf Stress-Situationen**

Die Vitalität von Zellen ist keine Konstante, sondern unterliegt dem Einfluß der Umgebung. Das interne Milieu auch unter ungünstigen externen Milieubedingungen konstant zu halten und damit die Vitalitätsparameter unter variierten Umweltbedingungen zu stabilisieren (Homöostase) schließt die zelluläre Fähigkeit, auf Stressfaktoren zu reagieren, ein. Durch gezielte Modifikationen des exogenen Milieus kann eine Änderung der Zellvitalität provoziert und anhand der Differenz der Parameter metabolische Aktivität, DNA-Synthese-Aktivität und Apoptose die Streßantwort gemessen werden.

Es gibt mehrere Möglichkeiten einen exogenen Stress auf eine Zellkultur auszuüben. Physikalische Größen wie Druck und Temperatur, biochemische Größen wie Osmolarität und Nährstoffmenge, aber auch der Gehalt an Wachstumsfaktoren und Toxinen können verändert werden. Bei der Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten spielen Stressoren eine bedeutende Rolle (Paschen, Frandsen, 2001; DeGracia et al., 2002; Sherman, Goldberg, 2001). Beispielsweise geht Ischämie/Reperfusion mit oxidativem Stress einher (McCord, 1985; Walden et al., 1990). Die unmittelbare Wirkung aller

Stressfaktoren besteht in einer Alteration zellulärer Funktionen. Dadurch werden komplexe Kaskaden stressinduzierter intrazellulärer Signalmoleküle initiiert, deren Ziel die Wiederherstellung der intrazellulären Homöostase ist. Biochemischer Stress ist mit einer Aktivierung von N-terminaler Jun-Kinase (JNK), Jun-Proteinen, mitogenaktivierter Proteinkinase (MAPK) und Src-Kinase assoziiert. Diese Signaltransduktoren sind im Rahmen der zellulären Stressreaktion mit verschiedenen Zellantworten teilweise gegensätzlicher Richtung, wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung, verknüpft (Herr, Debatin, 2001; Khadaroo et al., 2003). Die zelluläre Stressantwort ist eng an die Funktionen des endoplasmatischen Retikulums (ER) als Ort der Proteinsynthese, intrazellulärer Proteintransportwege und des dynamischen Calciumreservoirs gebunden. Stress führt im ER zu einer Störung der posttranslationalen Proteinprozessierung, wodurch ungefaltete Proteine im ER akkumulieren. Die Stressantwort des ER beinhaltet zwei Formen. Im Rahmen der unfolded-protein-response (UPR) wird die Expression von Chaperonen aktiviert, beispielsweise von grp 78/bip über den C/EBP homologen Transkriptionsfaktor CHOP/gadd 153, und die Gesamtproteinsynthese supprimiert. Die endoplasmatic-reticulum-overload-response (EOR) führt zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Beide ER-Antworten sind an der Regulation von Apoptose beteiligt (Verkhatsky, Toescu, 2003; Herr, Debatin, 2001).

Um die Stressreaktionen der verschiedenen ST14A-Linien beurteilen zu können, wählten wir zur Simulation eines metabolischen Stresses den Entzug von FBS aus dem Kulturmedium. Ein wichtiger proliferativer Signalweg wurde durch den Zusatz des Proteinkinase-C-Inhibitors Staurosporin unterbrochen (Couldwell et al., 1994; Ackermann et al., 1999), was gleichzeitig die intrazelluläre Calciumhomöostase stört. Literaturmitteilungen ließen auf Streßprotektion sowohl durch *CNTF* als auch durch *GDNF* schließen (Sun et al., 2003; Chen et al., 2003; Wang et al., 1997; Kitagawa et al., 1998).

In embryonalen sensorischen Neuronen wurde eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B durch *CNTF* gezeigt (Middleton et al., 2000; Ernfors, 2000). In-vivo wurde durch die Anwesenheit von *CNTF* ein Schutz vor läsionsinduzierter Neurodegeneration erreicht (Naumann et al., 2003; Adamus et al., 2003; Zheng et al., 2002; Hermann et al., 2001).

*GDNF* kann über eine Erhöhung der Expression von Bcl-2 und Bcl-XL die mitochondriale Apoptoseinitiation supprimieren (Ghribi et al., 2001). Der jüngeren Literatur ist zu entnehmen, dass *GDNF* die ER-Stressantwort direkt über die Inhibition der Aktivierung von gadd 153, der im Rahmen der UPR aktiviert wird, und indirekt über die Aktivierung von JNK und ERK mit im Ergebnis stark verringerter Apoptose beeinflusst (Ghribi et al., 2004).

In unseren Versuchen war die Kultivierung von ST14A-*GDNF* schwieriger als die der anderen ST14A-Zellen. Die Zellen lösten sich bereits in der präkonfluenten Kulturphase von der Kulturschale ab und zerfielen. Das könnte auf eine gesteigerte Sensitivität der ST14A-*GDNF* gegenüber Stressfaktoren deuten, wurde jedoch in den Versuchen mit exogenem Stress nicht bestätigt. Bei allen anderen Zellen beobachteten wir in der Zellkultur kein unterschiedliches Wachstumsverhalten.

Sowohl unter dem metabolischem Stress des Serumentzugs als auch unter der Einwirkung des Staurosporins wird generell der erwartete Abfall der metabolischen Aktivität gemessen. Eine 100%ige Reduktion tritt erwartungsgemäß nur unter Serumentzug ein, und zwar bei nativen ST14A und ST14A-*CNTF* nach 8 Tagen und bei ST14A-*GDNF* und ST14A-mock nach 13 Tagen. Mit zunehmendem Differenzierungsgrad steigt offenbar die Empfindlichkeit aller Zellen gegenüber dem jeweils während der letzten 24 Stunden einwirkenden Serumentzug. Dem steht eine zu allen Messzeitpunkten etwa gleichbleibende Staurosporin-Empfindlichkeit gegenüber, die maximal 80% Reduktion der Stoffwechselaktivität erreicht, was auf einen PKC-unabhängigen „Restmetabolismus“ schließen läßt.

Die DNA-Synthese sinkt ebenfalls unter dem Einfluss beider Stressoren deutlich ab, wobei zu beachten ist, dass bei 39°C die DNA-Synthese aller Zellen im Rahmen der Differenzierung schon erheblich verringert ist und offenbar deshalb durch Stressoren nur noch geringfügig zusätzlich gehemmt werden kann. Daher erscheinen DNA-Synthesemessungen nach mehr als 3 Tagen Differenzierung nicht mehr sinnvoll. Zur Apoptoseinduktion ergaben exemplarische Untersuchungen, dass Serumentzug bei allen Zelllinien eine 100%ige Apoptoseinduktion auslöst. Deshalb wurde die Apoptosereaktion nur für den Stressfaktor Staurosporin systematisch untersucht. Bei allen Zellen bewirkt Staurosporin eine Apoptoseverstärkung, die eine unterschiedliche Beeinflussung durch die Differenzierung erfährt. Native ST14A reagieren unter Proliferationsbedingungen bei 33°C sensitiver als bei 39°C, während scheintransfizierte ST14A-mock unter Differenzierungsbedingungen wesentlich sensitiver sind. ST14A-*CNTF* und ST14A-*GDNF* hingegen reagieren wesentlich schwächer auf den Apoptosereiz der PKC-Hemmung. Entsprechend dem „natürlichen Verhalten“ nativer ST14A könnte möglicherweise eine unspezifisch transfektionsbedingte Erhöhung der Staurosporinempfindlichkeit, wie ST14A-mock sie zeigen, durch die protektive Wirkung der neurotrophen Faktoren reduziert werden, so dass eine gewisse Apoptoseresistenz gegenüber Staurosporin bei ST14A-*CNTF* und ST14A-*GDNF* möglich wäre.

Die *CNTF*-transfizierten ST14A zeigten gegenüber nativen und scheintransfizierten ST14A eine geringere Empfindlichkeit ihres Metabolismus gegenüber Staurosporin. Dazu paßt eine geringere Apoptosesteigerung durch Staurosporin. Dies könnte Ausdruck einer *CNTF*-spezifischen Protektion mit verbesserter Apoptoseresistenz sein. Es muß jedoch in Betracht gezogen werden, dass die apoptotische Aktivität durch den PKC-Hemmer in ST14A-*CNTF* nur noch gering steigerbar ist, weil schon basal ein höheres Apoptose-Niveau besteht. Insgesamt sprechen die Reaktionen der *CNTF*-transfizierten Zellen für eine erhöhte Resistenz gegenüber Stressoren. Dieses Ergebnis stimmt mit Genexpressionsanalysen überein (Bottcher et al., 2003). Darin konnte gezeigt werden, dass verglichen mit nichttransfizierten ST14A in differenzierenden ST14A-*CNTF* solche Gene verstärkt exprimiert werden, die in Signalwegen der zellulären Stressantwort, Proliferationsinhibition und Proteinsyntheseinhibition vorkommen. Teilweise sind sie auch Bestandteile der *CNTF*-spezifischen

Signaltransduktion. Daher könnte es sich bei der erhöhten Stressresistenz um eine spezifische *CNTF*-bedingte Veränderung der *ST14A-CNTF* handeln.

Proliferierende *ST14A-GDNF* reagieren von allen Zelllinien am geringsten auf den Serumentzug hinsichtlich Metabolismus und DNA-Synthese. Bei 33°C ergibt nur eine von fünf Messungen ein Absinken des Metabolismus, was die große Varianz des Mittelwertes erklärt. Beim Vergleich der Kinetik der metabolischen Aktivität mit täglichem Mediumwechsel und ohne Mediumwechsel fällt auf, dass *ST14A-GDNF* als einzige Zellart mit Mediumwechsel eine niedrigere Kurvenfläche aufweisen als ohne (siehe Abbildung 2). Das gilt für proliferierende Zellen bis zum 9. Kulturtag und für differenzierende Zellen sogar bis zum 12. Kulturtag. Offensichtlich wirkt sich der insgesamt niedrige Verbrauch des FBS während gleichzeitiger Akkumulation sezernierten GDNF's kaum supprimierend auf den Metabolismus aus. Da das komplette Sistieren der metabolischen Aktivität unter Serumentzug bei *ST14A-GDNF* erst nach fast zwei wöchiger Differenzierungszeit auftritt, gehen wir bei diesen Zellen von einer unter Proliferationsbedingungen durch FBS-Entzug nahezu unbeeinflussten und unter Differenzierungsbedingungen geringfügig supprimierten metabolischen Aktivität aus. Auch die Staurosporin-induzierte Hemmung des Stoffwechsels fällt bei *ST14A-GDNF* immer tendenziell am geringsten aus. Ihre DNA-Synthese-Reaktion auf beide Stressoren ist jedoch nicht geringer als die der anderen Zellen. Passend zu den Versuchen von Ghribi 2001 und 2004 wird auch in unseren Versuchen zumindest unter Proliferationsbedingungen die Apoptose der *GDNF*-transfizierten Zellen nicht so stark induziert wie die Apoptose nativer *ST14A*. Unter Differenzierungsbedingungen scheint die basale Apoptose von *ST14A-GDNF* geringer zu sein. Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich entgegen unseren mikroskopischen Zellbeobachtungen, aber in Übereinstimmung mit der Literatur, die *GDNF*-Transfektion protektiv auf *ST14A*, insbesondere deren Stoffwechsel, auswirkt. Wie bereits erwähnt wurde von *ST14A-GDNF* eine verminderte Expression von vier Schlüsselenzymen der Cholesterolsynthese ab mindestens 24 Stunden dauernder Differenzierung gefunden (Pahnke et al., 2004). Die Suppression dieses energieaufwendigen Signalweges steht in Übereinstimmung zu der im Vergleich mit allen anderen untersuchten Zellen höheren Resistenz von *ST14A-GDNF* gegenüber Malnutrition.

### **Expression des endogenen Regulatormoleküls Wnt-5a**

Unter den Signalfaktoren, die Zellerneuerung und Differenzierung steuern, ist die Gruppe der Wnt-Moleküle von besonderem Interesse, da diese Moleküle sich durch eine große Vielfalt an Einflussmöglichkeiten zellulärer Prozesse auszeichnen. Mit der Entdeckung der Homologie des Oncogenes int-1 (jetzt als Wnt-1 bezeichnet) aus Mammakarzinomzellen der Maus zu dem aus der *Drosophila* bekannten Entwicklungsprotein wingless (Rijsewijk et al., 1987) rückten sie zunehmend in den Fokus der Forschungen zur Zellregeneration. Früh wurden Homologe auch in karzinomatös transformierten humanen Geweben, in kleinzelligem Bronchialkarzinom, Mammakarzinom und Neuroblastom (Melino, 1989; Roelink et al., 1990), entdeckt. Ebenfalls sehr lange bekannt ist das

Vorkommen von *wnt-1* in fetalen Hirnzellen der Maus (McMahon, Bradley, 1990; Gavin et al., 1990). Schon 1991 wurde eine transiente Expression während der Neuralrohrentwicklung gefunden (Roelink, Nusse, 1991). Inzwischen sind insgesamt 19 Wnt-Gene in Säugerzellen bekannt (Nelson, Nusse, 2004) und ein Teil ihrer Signaltransduktionsfunktionen aufgeklärt. Der Bindung von Wnt-Molekülen an ihre Rezeptoren folgen intrazelluläre Signalkaskaden, von denen bisher die folgenden unterschieden werden (Wodarz, Nusse, 1998; Huelsken, Birchmeier, 2001; Miller et al., 1999; Miller, 2002; Nelson, Nusse, 2004; Kuhl, 2004):

1. Der kanonische Weg führt über die intrazelluläre Akkumulation und intranukleäre Translokation von  $\beta$ -Catenin zu dessen Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie. Dadurch wird die Expression verschiedener teilweise onkogen wirkender Zielgene aktiviert.
2. Der Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ -Weg führt über die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und Proteinkinase C (PKC) zu einer intrazellulären Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und folgender Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängiger Kinasen (CaMKII). Entsprechend jüngeren Ergebnissen wird dadurch der kanonische Weg antagonisiert (Ishitani et al., 2003; Topol et al., 2003; Westfall et al., 2003; Weidinger, Moon, 2003).
3. Der Wnt/PCP-Weg („planar cell polarity pathway“), in Vertebraten Wnt/CEM-Weg („convergent extension movement“) genannt, bewirkt eine Beeinflussung zytoskelettaler Proteine, wodurch die Polarisierung von Zellen initiiert wird.
4. Der Wnt/Rho-Weg (small guanosine triphosphatase) reguliert teilweise überlappend mit dem Wnt/PCP-Weg die Zellpolarität und darüberhinaus die Migration von Zellen.
5. Der Wnt/JNK-Weg ist durch Aktivierung der Jun-N-terminal-kinase (JNK) über möglicherweise mehrere Schnittstellen mit dem Wnt/PCP-Weg verbunden, deren Details noch ungeklärt sind. Sicher ist jedoch eine Aktivierung von JNK durch verschiedene Stressfaktoren.

Die genannten Signalwege induzieren die Transkription zahlreicher (bis zu 200) Zielgene. Zudem gibt es Hinweise dafür, dass über  $\beta$ -Catenin eine Verbindung zu Cadherin-vermittelter Beeinflussung des Spindelapparates (asymmetrische Zellteilung) und zu Mikrotubuli-assoziiertes Zell-Zell-Adhäsion besteht.

Die Wnt-Signalwege beinhalten ein sehr umfangreiches zellbiologisches Wirkspektrum (Huelsken, Birchmeier, 2001; Veeman et al., 2003). Dabei führt im allgemeinen der kanonische Weg in Richtung Proliferationsaktivierung eventuell bis zur Onkogenese, während alle anderen Wege eher proliferationslimitierende und differenzierende Veränderungen des Zellmetabolismus initiieren.

In vielen Systemen konnten den „kanonischen Proteine“ Wnt-1, Wnt-2, Wnt-3a und Wnt-10 onkogene Wirkungen zugeschrieben werden, während die „nicht-kanonischen“ Wnt-Moleküle Wnt-4, Wnt-5a und Wnt-11 eher mit Tumorsuppression in Verbindung standen (Miller et al., 1999; Polakis, 2000). Kürzlich wurden auch in der Embryogenese und in in-vitro-Systemen Belege für eine Antagonisierung des kanonischen Signalweges durch *Wnt-5a* erbracht (Weidinger, Moon, 2003; Topol et al., 2003). Für *Wnt-5a* wurde außerdem an Rattenembryonen eine selektive Expression im ventralen

Mittelhirn und seine Wirkung in Richtung Förderung der Entwicklung einer Vorläuferzelle dopaminergener Neuronen gefunden (Castelo-Branco et al., 2003; Schulte et al., 2005). Daher resultierte unser besonderes Interesse an Untersuchungen zur *Wnt-5a*-Expression im Rahmen der neuronalen Differenzierung von Vorläuferzellen.

Das *Wnt-5*-Gen wurde erstmals 1990 zusammen mit *Wnt-4*, *-6*, *7a* und *7b*, aus fetalem Mäusegewebe isoliert (Gavin et al., 1990). Aufgrund des unterschiedlichen Auftretens seiner Transkripte in der Embryogenese von *Ambystoma mexicanum*, dem echten Querschlammolch Axolotl, wird es seit 1993 in das in der Blastula nachweisbare *Wnt-5a* und das erst später in der Gastrula auftretende *Wnt-5b* unterschieden (Busse, Seguin, 1993). Im selben Jahr konnte eine Rolle des *Wnt-5a* in der pränatalen Neurogenese von Säugetieren durch seinen Nachweis im limbischen System von Hühnerembryonen (Dealy et al., 1993) und Mäuseembryonen (Parr et al., 1993) belegt werden. *Wnt-5a* wurde außerdem in weiteren Organen und Geweben, beispielsweise in humanen neonatalen Herzen und Lungen (Clark et al., 1993), embryonalem Mäusemagen (Lickert et al., 2001), differenzierenden Haarfollikelknospen (Reddy et al., ), differenzierenden Fingerknorpeln (Chimal-Monroy et al., 2002), unreifem Rattenovar, aber auch in humanem Ovarialkarzinom (Ricken et al., 2002), gefunden.

Um in der vorliegenden Arbeit Transkriptionsanalysen von *Wnt-5a* vornehmen zu können, mußten bis dahin nicht verfügbare Sequenzinformationen des Ratten-*Wnt-5a* erhalten werden. Das gelang in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Friis, Bern.

Es waren die Sequenzen der cDNA für *Wnt-4* (AF188608), *Wnt-5a* (AF188333) und partiell für *Wnt-11* (AB073722) bekannt.

Anhand der cDNA-Sequenz AF188333 generierten wir einen Forward- und vier Reverseprimer so, dass sich bei Vorhandensein eines Transkriptes aus der Kombination des Forwardprimers mit jeweils einem der Reverseprimer in 4 PCR-Ansätzen vier verschieden lange Amplifikate zuvor berechenbarer Größe (168bp, 378bp, 566bp, 735bp) darstellen lassen sollten. Um eine interne Versuchskontrolle mitzuführen und Unterschiede zwischen kodierender und genomischer DNA finden zu können, führten wir Ansätze aus cDNA und aus DNA durch. Das Ergebnis des PCR-Experiments (Abb.8) entspricht in den cDNA-Ansätzen den Erwartungen, indem Amplifikate mit den errechneten Größen entstanden, nicht jedoch in den DNA-Ansätzen. Die genomischen DNA-Amplifikate 1 und 2 sind etwa 1500 bp länger als berechnet und die Amplifikate 3 und 4 sind zu lang, um im verwendeten Gellauf detektiert zu werden. Da die bekannte Sequenz ebenfalls eine cDNA-Sequenz ist, kann dieses Ergebnis durch das Vorhandensein mindestens eines Introns innerhalb der Amplifikate 1 und 2 plausibel erklärt werden. Deshalb wurde Amplifikat 1 aus der DNA sequenziert, wobei sich das Vorhandensein einer Intronsequenz bestätigte. Chromatogramm und Sequenzangabe befinden sich in Anhang B dieser Arbeit. Bis dahin waren keine Introns in *Wnt-5a* der Ratte beschrieben. Daher wurde die Sequenz unter AF 348139 als Intron 1 des *Wnt-5a* der Ratte in die Datenbank EMBL/Genbank gestellt. Der Parallelansatz mit *ST14A-CNTF* ergab ein identisches Bandenmuster. Die *Wnt-5a*-

Expression wird in ST14A-*CNTF* also offenbar durch die Transfektion nicht alteriert. Voraussetzung für eine biologische Funktion des *Wnt-5a*-Gens ist aber seine Proteinexpression.

Der Proteinnachweis im Western blot mit kommerziellem Anti-*Wnt-5a*-Antikörper bestätigt die Expression des *Wnt-5a*-Gens in ST14A. Die Spezifität des Antikörperrnachweises erbringt ein Blockierungsexperiment (Abb.10). Präabsorption des *Wnt-5a*-Antikörpers durch das rm-*Wnt-5a*-Immunisierungspeptid ergibt nur noch Signale des Markers und des unspezifischen Hintergrundes. Die dominanten Signale mit nicht-absorbiertem Antikörper lassen sich den in der Datenbank Swiss-Prot angegebenen Bandengrößen für das Precursormolekül des *Wnt-5a* von 42,2 kD bzw. seine prozessierten Bruchstücke von 38,5 kD und 8,8 kD, zuordnen.

Da der Western blot lediglich semiquantitative Aussagen zulässt, wurden die Untersuchungen mit der Durchflusszytometrie ergänzt. Die Expressionskinetik des *Wnt-5a*-Proteins mit beiden Methoden zeigt quantitative Veränderungen während der ersten Differenzierungsstunden und -tage. Übereinstimmend ist mit beiden Methoden in nativen ST14A in der frühen Differenzierung ein Anstieg und ein darauf folgender Abfall der Expression des *Wnt-5a*-Proteins erkennbar. Eine ähnliche Kinetik zeigt sich bei ST14A-*CNTF* im Western blot und bei ST14A-*GDNF* in der Durchflusszytometrie. Ferner ist das *Wnt-5a*-Protein in allen Zellen bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes, 21 Tage nach Differenzierungsstart im Western blot und 5 Tage nach Differenzierungsstart in der Durchflusszytometrie nachweisbar. Zusätzlich kann eine *Wnt-5a*-Sekretion in ST14A ohne deutlich quantitativen Unterschied bei nativen, *CNTF*- und *GDNF*-transfizierten Zellen gezeigt werden, und zwar sowohl in Kulturen proliferierender Zellen (33°C) als auch in Kulturen nach zwei Tagen unter Differenzierungsbedingungen (39°C). In den Western-blots sämtlicher Zellkulturüberstände tritt zusätzlich zu der spezifischen, auch intrazellulär gefundenen ca. 40 kD-Bande, eine 10 kD schwerere deutlich sichtbare Bande auf. Sie konnte als unspezifisch klassifiziert werden, da sie auch bei Blotentwicklungen nur mit Sekundäntikörper, also unter Auslassen der Inkubation mit Anti-*Wnt-5a*-Primäntikörper, auftrat. Ein ähnliches methodisches Phänomen dürfte den im Western-blot von *Wnt-1*, *Wnt-3a* und *Wnt-5a* aus B1A Fibroblasten der Ratte sichtbaren Zusatzbanden zu Grunde liegen (Castelo-Branco et al., 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl nichttransfizierte ST14A als auch *CNTF*- und *GDNF*-transfizierte ST14A *Wnt-5a*-Moleküle produzieren und sezernieren. Die Aufklärung ihrer biologischen Rolle, insbesondere der von ihnen induzierten bzw. mit ihnen interagierenden Signalwege muss nachfolgenden Experimenten vorbehalten bleiben. Das gleiche gilt für weitere Regulatormoleküle aus der *Wnt*-Familie und anderen Morphogen-Familien.

Die überwiegende Mehrzahl der Literaturquellen zu *Wnt-5a* gibt Hinweise auf eine tumorsuppressive Situation bei Vorhandensein von *Wnt-5a*. Dazu zählen insbesondere Versuche in Mammakarzinomgewebe der Maus (Lejeune et al., 1995) und des Menschen, humanen Mammaepithelzellen (Bui et al., 1997), humanem Endometriumkarzinom (Bui et al., 1997; Tulac et al., 2003), Maus-Urothelkarzinom (Olson et al., 1997) und humanem B-Zell-Lymphom (Liang et al.,

2003). Jedoch gibt es auch Hinweise für eine durch *Wnt-5a* getriggerte Onkogenese. Dies betrifft vor allem das humane Melanom (Bittner et al., 2000) und das humane squamöse Karzinom (Taki et al., 2003), so dass das bloße Vorhandensein von *Wnt-5a*-Transkripten und Proteinen in ST14A-Zellen deren onkogenes Potential nicht ausschließt. Schon länger wurde speziell für *Wnt-5a* ein dualer Wirkmechanismus postuliert. So stimuliert es einerseits via Aktivierung von Proteinkinase C (*PKC*) und Calmodulinkinase II (*CaMKII*) die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (Slusarski et al., 1997; Slusarski et al., 1997; Sheldahl et al., 1999; Kuhl et al., 2000; Ahumada et al., 2002; Sheldahl et al., 2003; Kuhl, 2004) und andererseits ist es in der Lage, den kanonischen Signalweg der Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin zu antagonisieren (Torres et al., 1996; Olson, Gibo, 1998; Ishitani et al., 2003). Im Zebrafisch (Westfall et al., 2003) und in der Maus (Topol et al., 2003) wurde unabhängig festgestellt, dass *Wnt-5a* zu einer Degradation und nicht wie im kanonischen Signalweg zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin führt. Während Westfall et al. (2003) die  $\beta$ -Catenin-Degradation über *PKC*, *CaMKII* und Calcium-Freisetzung vermittelt finden, gehen Topol et al. (2003) von einem *CaMKII*- und NF-AT-unabhängigen Weg aus. Dabei soll die Induktion der Expression von *Siah2*, einem direkt durch p53 aktivierten Signalmolekül (Liu et al., 2001), eine Rolle spielen. Topol et al. (2003) postulieren, dass die durch *Wnt-5a* induzierte *Siah2*-abhängige Degradation von  $\beta$ -Catenin eine Parallele zu der des bekannten Tumorsuppressors p53 sei (Topol et al., 2003). Von beiden Arbeitsgruppen wird *Wnt-5a* eindeutig als Tumorsuppressor eingeordnet. Untersuchungen an humanen Mammakarzinomen, Kolonkarzinomen und Neuroblastomen zeigen eine deutlich niedrige *Wnt-5a*-Expression im Tumorgewebe als in normalem Gewebe. Darüber hinaus wurde eine Assoziation zwischen ungünstigem klinischen Verlauf und *Wnt-5a*-Unterexpression gezeigt (Leris et al., 2005; Dejmek et al., 2005) (Blanc et al., 2005a; Blanc et al., 2005b).

Zusätzlich gibt es deutliche Hinweise darauf, dass die Expression des *Wnt-5a* die Entstehung dopaminergischer Progenitoren unterstützen (Schulte et al., 2005). Gegenstand nachfolgender Arbeiten auf diesem Gebiet ist die Klärung, über welchen Weg und mit welcher zytobiologischen Konsequenz *Wnt-5a* in ST14A und nach Transplantation in geschädigtem Nervengewebe wirkt (Lange et al., 2006). Dabei ist zu beachten, dass man aus Wirkungen in embryonalem Gewebe nicht unmittelbar auf Effekte im Transplantationsgebiet adulten Gewebes schließen kann.

## Anhang A: Materialien

### Puffer und Lösungen

Nr.	Komponente	Endkonzentration	Stockkonzentration	Zugabemengen	Hersteller	Katalognummer	Bemerkung
<b>L1</b>	<b>Kulturmedium</b>						
	Dulbecco's MEM-Glutamax I (DMEM)			500 mL	GibcoBRL	21885-025	
	Penicillin/ Streptomycin	50IU/mL 60µg/mL		5,5 mL	Biochrom	A 2213	
	FBS	10%		55 mL	Biochrom	S 0115	
<b>L2</b>	<b>Modifiziertes adaptiertes serumfreies Medium nach Cattaneo et al.</b>						
	F12			100 mL	GibcoBRL	21765-029	Lagerung in Aliquots zu je 50 mL in -20 C
	DME (w/o Phenolrot, Glutamin)			100 mL	Sigma	D 5921	
	Penicillin/ Streptomycin	50IU/mL 60µg/mL		2,2 mL	Biochrom	A 2213	
	Progesteron	20 nM	20 µM	100 µL	Sigma	P 6149	
	Putrescin	60 µM		1 mg	Sigma	P 6024	
	HEPES	3,9 g/L		390 mg	Roth	9105.4	
	Insulin	5 mg/L	(100 x)	1 mL	Sigma, ITS- Liquid media supplement	I-3146	
	Transferrin	100 mg/L					
	Selenite salt	30 nM					
	Glutamin	2 mM	200 mM	250µL je 50mL	Sigma	G 7513	Frisch zugeben
<b>L3</b>	<b>PBS w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup></b>						
					Biochrom	L1825	
<b>L4</b>	<b>Trypsin/EDTA</b>						
					GibcoBRL	25300-054	
<b>L5</b>	<b>Trypanblau</b>						
	Trypanblau	0,5 %		0,5 g	Sigma	T 6146	
	NaCl	0,9 %	58,44 g/mol	0,9 g	J.T.Baker	0278	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>100 mL</b>			
<b>L6</b>	<b>Gefriermedium</b>						
	FBS	90 %		450 mL	Biochrom	S 0115	
	DMSO	10 %		50 mL	Sigma	D 2650	
<b>L7</b>	<b>DEPC-Wasser</b>						

	DEPC	0,1%		0,1 mL	Sigma	D 5758	Vor Gebrauch autoklavieren.
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>100 mL</b>			
<b>L8</b>	<b>Mastermix (Reverse Transkription)</b>						
	5 x 1 <sup>st</sup> strand buffer	1 x	5 x	4 µL	GibcoBRL	Y00146	
	DTT	10 mM	0,1 M	2 µL	GibcoBRL	Y00147	
	Rnasin	1,25 U/µL	25 U/µL	1 µL	MBI	E00312	
	dNTP	0,5 mM	10 mM	1 µL	Roche	1277049	
	Superskript II	10 U/µL	200 U/µL	1 µL	GibcoBRL	18064-014	
<b>L9</b>	<b>Mastermix (Thermocycler-PCR)</b>						
	10 x PCR-Puffer,	1 x	10 x	2,5 µL	Amersham	31799	
	dNTP	0,2 mM	10 mM	0,5 µL	Roche	1277049	
	Taq-DNA-Polymerase	0,04 U/µL	5 U/µL	0,2 µL	Amersham	270799	
	<b>Aqua ad inj. ad</b>			<b>18 µL</b>			
<b>L10</b>	<b>TBE</b>						
	Tris-HCL	89 mM	890 mM	100 mL	Merck	809L537819	
	Borsäure	89 mM	890 mM	100 mL	Merck	1.00165.1000	
	Na <sub>2</sub> EDTA	2,5 mM	25 mM	100 mL	Merck	1.12029.1000	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>1 L</b>			
<b>L11</b>	<b>6 x Gelladepuffer (= 6 x GLP)</b>						
	Na <sub>2</sub> EDTA	50 mM	2,5 M	1 mL	Merck	1.12029.1000	
	Glycerin	30 %	87 %	17,24 mL	Merck	1.04094.1000	
	Bromphenolblau	0,25 %	692 g/mol	125 µL	Serva	15375	
	Xylencyanol	0,25 %	100 %	125 µL	Serva	38505	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>50 mL</b>			
<b>L12</b>	<b>Lysispuffer nach P70<sup>S6k</sup> Assay (=RIPA-Puffer) (Jaster et al., 1997)</b>						
	TRIS-HCl (pH 7,4)	20 mM	157,6 g/mol	315,2 mg	Merck	809L537819	
	NaCl	137 mM	58,44 g/mol	800,6 mg	J.T.Baker	0278	
	SDS	0,1 %	288,4 g/mol	100 mg	Serva	20783	
	Natriumdesoxycholat	0,5 %	414,57 g/mol	500 mg	Sigma	D 6750	
	Triton X-100	1 %		1 ml	Sigma	T 9284	
	Glycerol	10 %	92,1 g/mol	10 ml	Merck	1.04094.1000	
	EDTA	2 mM	372,2 g/mol	74,44 mg	Merck	1.12029.1000	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>100 ml</b>			
	PMSF	1 mM	174,2 g/mol (10µg/µl)	17,4 µl/ml	ICN Biochemicals	195381	diese Komponenten frisch zugeben (T <sub>1/2</sub> = 12 h)
	Aprotinin	0,15 U/ml	3 U/mg (1µg/µl)	50 µl/ml	ICN Biochemicals	191158	
	Natriumorthovanadat	1 mM	183,9 g/mol (10µg/µl)	18,4 µl/ml	Sigma	S 6508	

	β-Glycerophosphat	25 mM	216,0 g/mol (100µg/µl)	54 µl/ml	Sigma	G 6251	
<b>L13</b>	<b>1 x Laemmlipuffer</b>						
	SDS	2%	288,4 g/mol	1g	Serva	20783	
	Glycerin	10%	87 %	5,7 g	Merck	1.04094.1000	
	EDTA pH 6,8	5 mM	372,24 g/mol	92,5 mg	Merck	1.12029.1000	
	TRIS pH6,8	62,5 mM	121,14 g/mol	0,4 g	Roth	4855.2	
	Bromphenolblau	0,5 %	692 g/mol	1 ml	Serva	15375	
	β-Mercaptoethanol	5 %	78,13 g/mol		Roth	4227.1	Frisch zugeben.
	<b>Aqua dest. auf</b>			<b>50ml</b>			
<b>L14</b>	<b>Elektrodenpuffer</b>						
	TRIS	25 mM	121,14 g/mol	3,03 g	Roth	4855.2	
	Glycin	188 mM	75,07 g/mol	14,1 g	Roth	3908.2	
	SDS	3,5 mM	288,4 g/mol	1,0 g	Serva	20783	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>1000 mL</b>			
<b>L15</b>	<b>SDS- Transferpuffer</b>						
	TRIS	48 mM	121,14 g/mol	5,82 g	Roth	4855.2	
	Glycin	39 mM	75,07 g/mol	2,93 g	Roth	3908.2	
	SDS	1,3 mM	10 %	3,75 ml	Serva	20783	
	Methanol	20 %	32,04 g/mol	200 ml	Merck	1.13351.2500	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>1000 mL</b>			
<b>L16</b>	<b>Coomassie-Färbelösung</b>						
	Coomassie brillant blau	0,2 %		0,4 g	Serva	17524	
	Methanol	90 %	32,04 g/mol	90 mL	Merck	1.13351.2500	
	Eisessig	10 %	60,05 g/mol	20 mL	J.T.Baker	6052	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>200 mL</b>			
<b>L17</b>	<b>Entfärbelösung</b>						
	Methanol	5 %	32,04 g/mol	20 mL	Merck	1.13351.2500	
	Eisessig	10 %	60,05 g/mol	40 mL	J.T.Baker	6052	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>400 mL</b>			
<b>L18</b>	<b>PBS (pH=7,4)</b>						
	NaCl	137 mM	58,44 g/mol	8,00 g	J.T.Baker	0278	
	KCl	2,7 mM	74,56 g/mol	0,20 g	Merck	1.04936.1000	
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM	177,99 g/mol	1,42 g	Merck	1.06580.1000	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM	136,09 g/mol	0,27 g	Merck	1.04873.0250	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>1000 ml</b>			
<b>L19</b>	<b>Blocklösung</b>						
	BSA fraction V	1 %	MW 67000	10 g	Serva	11930	

	Tween20	0,1 %	MW 1200	1 mL	Serva	37470	
	<b>PBS pH7.4 ad</b>			<b>1000 mL</b>			
<b>L20</b>	<b>Fixierlösung</b>						
	Paraformaldehyd	4 %		4 g	Merck	4004.0900	
	<b>Aqua dest. ad</b>			<b>100 mL</b>			
<b>L21</b>	<b>Permeabilisierungslösung</b>						
	Saponin	0,5 %		0,5 g	Sigma	S 4521	
	BSA fraction V	1 %	MW 67000	1 g	Serva	11930	
	<b>HBSS ad</b>			<b>100 mL</b>	Sigma	H9269	
<b>L22</b>	<b>Konservierungslösung</b>						
	Paraformaldehyd	1 %		1 g	Merck	4004.0900	
	BSA Fraktion V	1 %	MW 67000	1 g	Serva	11930	
	<b>PBS pH7.4 ad</b>			<b>100 mL</b>			

### Oligonukleotide

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Amplifikat cDNA	Amplifikat DNA	Temperaturprofil
3180	B-Actin_rat_cDNA81_S	cat gga tga cga tat cgc tg	162 bp	249 bp	D: 94 C, A: 55 C, E: 72 C
3181	B-Actin_rat_cDNA242_AS	acg tag gag tcc ttc tga cc			
3488	WNT5A_S	gaagccattggaatat	168 bp		D: 94 C, A: 50,8 C, E: 72 C
3489	WNT5A_AS1	gacatctgaacagggttat			
3488	WNT5A_S	gaagccattggaatat	378 bp		D: 94 C, A: 50,8 C, E: 72 C
3490	WNT5A_AS2	atcacctgccaagac			
3488	WNT5A_S	gaagccattggaatat	566 bp		D: 94 C, A: 50,8 C, E: 72 C
3491	WNT5A_AS3	agcggtagccatagtcg			
3488	WNT5A_S	gaagccattggaatat	735 bp		D: 94 C, A: 50,8 C, E: 72 C
3492	WNT5A_AS4	ctacaggagccagacact			
3503	WNT5A_SrevM13	caggaacagctatgaccgaagccattggaatat	378 bp		D: 94 C, A: 59,3 C, E: 72 C
3490	WNT5A_AS2	atcacctgccaagac			

### Antikörper

Nr.	Bezeichnung	Antigen	Wirt	Konzentration (FACS)	Konzentration (Western blot)	Hersteller	Katalognummer
A1	Anti-β-actin	β-actin	Maus	--	0,36 µg/mL = (1 3000)	Sigma	A5441
A2	Anti-CNTF	rrCNTF	Ziege	2,0 µg/mL = (1 50)	0,2 µg/mL = (1 500)	R&D	AF-557-NA
A3	Anti-GDNF	rhGDNF,rrGDNF	Ziege	5,0 µg/mL = (1 20)	0,2 µg/mL = (1 500)	R&D	AF-212-NA
A4	Anti-Wnt-5a	rmWnt-5a	Ziege	0,25 µg/mL = (1 400)	0,2 µg/mL = (1 500)	R&D	AF-645
A5	Anti-Maus-IgG + HRP	Maus-IgG	Ziege	--	2 nM = (1 5000)	Sigma	A9917
A6	Anti-Ziege-IgG +HRP	Ziege-IgG	Esel	--	0,13 µg/mL = (1 3000)	Dianova	705-035-003

A7	Anti-Ziege-IgG +FITC	Ziege-IgG	Esel	CNTF: 6,25µg/mL = (1 100) Wnt-5a, GDNF: 12,5 µg/mL = (1 50)	--	Dianova	705-095-147
----	----------------------	-----------	------	--	----	---------	-------------

### Biochemikalien einschließlich Kits

Nr.	Bezeichnung	Hersteller	Ort	Katalognummer
B1	Puromycin	Sigma	Steinheim	P8833
B2	Trizol	Sigma	Steinheim	322806
B3	Chloroform	J.T.Baker	Deventer, Niederlande	7386
B4	Isopropanol	Sigma	Steinheim	I9516
B5	Hexanukleotide	Roche	Mannheim	1034731
B6	DNA Molecular Weight Marker VI	Roche	Mannheim	1 062 590
B7	DNA Molecular Weight Marker VII	Roche	Mannheim	1 209 264
B8	Prestained SDS-PAGE standards broad range	Biorad	München	161-0318
B9	BOA protein marker	Mobitec	Göttingen	BOA001
B10	Rec. rat CNTF	Promega	Madison	G1481
B11	Rec. human glial derived neurotrophic factor	Promega	Madison	G2781
B12	Rec. mouse Wnt-5a immunisation peptide	R&D-Systems	Wiesbaden	Custom03
B13	Normales Ziegen Serum	Sigma	Steinheim	S2007
B14	Staurosporin	Sigma	Steinheim	S4400
B15	<sup>3</sup> H-Methylthymidin	Amersham	Freiburg	TRK758
B16	Fluorescein-12-ddUTP	Roche	Mannheim	1 427 849
K1	High Pure PCR-Preparation Kit	Roche	Mannheim	1 796 828
K2	Quiaquick Spin Purifikation Kit	Quiagen		28104
K3	Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza dGTP	Amersham	Freiburg	RPN2538
K4	BCA Protein Assay Kit	Pierce	Rockford	23225
K5	ECL detection reagents	Amersham	Freiburg	RPN2105
K6	Cell proliferation reagent wst-1	Roche	Mannheim	1644807
K7	Mebstain apoptosis kit direct	Beckmann Coulter	Krefeld	Part# IM3171

### Verbrauchsmaterial

Nr.	Bezeichnung	Hersteller	Ort	Katalognummer
V1	96-well-Flachbodenplatten	Falcon	Franklin, USA	3072
V2	60 mm Petrischalen	Biochrom	Berlin	P-93 600
V3	100 mm Petrischalen	Biochrom	Berlin	P-93 100
V4	Kulturflaschen T-185	Greiner	Solingen	660175
V5	Kryoröhrchen und Kryodeckel	Biozym	Oldendorf	710025, 710040
V6	Dünnwandige PCR-Röhrchen 0,2 mL	molecular bioproducts	San Diego	3412
V7	Flüssigwachs für Thermocycler-PCR „chill-out-14™“	Biozym	Oldendorf	999908
V8	Reaktionsröhrchen 1,5 mL	Eppendorf	Hamburg	0030.120.086

V9	Rnase-feie Reaktionsröhrchen 1,5 mL	Eppendorf	Hamburg	0030.121.589
V10	Reaktionsröhrchen 0,5 mL	Eppendorf	Hamburg	0030.121.139
V11	Röhrchen 4 mL, konisch	Greiner	Solingen	116101
V12	FACS-Röhrchen	Greiner	Solingen	668102
V13	Röhrchen 15 mL	Greiner	Solingen	188271
V14	Vivaspin 6 Konztrator	Sartorius	Göttingen	VS0611
V15	TRIS-HCL- kontinuierliches Gel 15%	Biorad	München	345-0021
V16	TRIS-HCL-Gradientengel 4-15%	Biorad	München	345-029
V17	Nitrocellulosemembran Hybond ECL	Amersham	Freiburg	RPN3032D
V18	Röntgenfilm AGFA-Curix	Agfa	Mortsel, Belgien	23002004
V19	Glasfaserfilter FilterMAT	Skatron	Lier, Norwegen	11731

### Geräte

Nr.	Bezeichnung	Hersteller	Ort	Katalognummer
G1	Bürker- Zählkammer	Merck	Darmstadt	631F1140
G2	Thermocycler Mastercycler gradient	Eppendorf	Hamburg	5331-00169
G3	Thermocycler PTC 100	MJ Research	Watertown, USA	6511
G4	UV-Licht	Pharmacia	Freiburg	18-1016-74
G5	Photokamera MP4 Land Camera	Polaroid	Offenbach	H4137C
G6	A.L.F. DNA-Sequencer	Pharmacia	Freiburg	18100498
G7	Photometer Ultrospec II	Pharmacia	Freiburg	
G8	Photometer SLT.Spectra II	Tecan	Crailsheim	B 039.002
G9	Criterion cell	Biorad	München	165-6001
G10	Semi dry blot chamber	Biorad	München	170-3940
G11	Entwicklerautomat Curix compact plus	Agfa	Mortsel, Belgien	5110/100
G12	Durchflußzytometer EPICS XL	Coulter	Hialeah, Fl., USA	Z49300
G13	Scintillation counter Wallace 1214 Rackbeta	LKB	Bromma, Schweden	

### Software

Nr.	Bezeichnung	Hersteller
S1	Chromas 1.62	Technelysium Pty Ltd. Queensland, Australia
S2	Easy win fitting	Tecan Crailsheim
S3	Easy win screening	Tecan Crailsheim
S4	Microsoft Office	Microsoft Corporation

## Anhang B Ergebnisse

### Daten zu Abb. 1a

33 C - täglicher Mediumwechsel

Meßtag	Klon 31	SD	Klon 31 +Puro	SD
1	0,342	0,015	0,197	0,001
2	0,361	0,016	0,255	0,033
3	0,709	0,03	0,480	0,023
4	1,183	0,069	0,899	0,118
5	1,476	0,01	1,215	0,024
6	2,542	0,081	1,807	0,307
7	3,443	0,188	3,089	0,139
8	3,481	0,193	3,330	0,049
9	3,14	0,114	3,183	0,062
10	2,93	0,024	2,883	0,083
11	2,781	0,136	2,969	0,366
12	2,996	0,031	3,048	0,032

### Daten zu Abb. 1b

33 C - kein Mediumwechsel

Meßtag	Klon 31	SD	Klon 31 +Puro	SD
1	0,352	0,005	0,353	0,011
2	0,586	0,022	0,543	0,010
3	0,938	0,006	0,907	0,025
4	1,338	0,068	1,336	0,014
5	0,175	0,012	0,909	0,161
6	0,314	0,007	0,418	0,009
7	0,363	0,052	0,454	0,006
8	0,542	0,087	0,633	0,145
9	0,087	0,06	0,241	0,109
10	0,033	0,007	0,151	0,003
11	0,015	0,003	0,150	0,002
12	0	0,007	0,133	0,012

### Daten zu Abb. 1c

39 C - täglicher Mediumwechsel

Meßtag	Klon 31	SD	Klon 31 +Puro	SD
1	0,747	0,011	0,448	0,01
2	0,598	0,088	0,388	0,052
3	0,674	0,07	0,455	0,008
4	0,549	0,092	0,334	0,102
5	0,656	0,113	0,41	0,022
6	0,886	0,034	0,476	0,044
7	0,886	0,003	0,418	0,072
8	0,712	0,304	0,224	0,041
9	1,44	0,2	0,446	0,17
10	1,492	0,168	0,352	0,067
11	1,092	0,214	0,483	0,109
12	0,717	0,472	0,423	0,075

### Daten zu Abb. 1d

39 C - kein Mediumwechsel

Meßtag	Klon 31	SD	Klon 31 +Puro	SD
1	0,748	0,033	0,636	0,018
2	0,791	0,01	0,779	0,014
3	0,665	0,014	0,821	0,014
4	0,525	0,033	0,72	0,028
5	0,946	0,077	0,767	0,109
6	1,108	0,012	0,683	0,017
7	0,973	0,045	0,733	0,034
8	0,756	0,225	0,695	0,388
9	0,173	0,081	0,498	0,404
10	0,022	0,004	0,577	0,153
11	0,004	0,005	0,331	0,093
12	0,024	0,01	0,139	0,103

## Daten zu Abb. 2a

### 33 C - Täglicher Mediumwechsel

Meßtag	ST14A-nativ	SD	ST14A-mock	SD	ST14A-CNTF(31)	SD
1	0,243	0,016	0,117	0,008	0,604	0,009
2	0,172	0,022	0,167	0,064	0,839	0,037
3	0,356	0,074	0,265	0,048	1,478	0,192
4	0,545	0,014	0,334	0,032	1,742	0,245
5	1,958	0,217	0,609	0,253	2,453	0,141
6	2,817	0,074	1,22	0,284	3,19	0,116
7	3,112	0,078	1,479	0,288	3,279	0,194
8	3,222	0,157	3,028	0,044	3,303	0,119
9	3,306	0,031	3,043	0,009	3,457	0,18
10	3,31	0,145	3,252	0,138	3,296	0,108
11	3,37	0,183	3,384	0,026	3,276	0,037
12	3,271	0,107	3,304	0,106	3,38	0,059

Meßtag	ST14A,B4	SD	ST14A,E2	SD	ST14A,A3	SD
1	0,14	0,039	0,691	0,028	1,148	0,033
2	0,071	0,023	0,508	0,047	0,874	0,09
3	0,101	0,003	0,663	0,084	1,154	0,018
4	0,119	0,025	0,904	0,065	0,639	0,057
5	0,164	0,053	0,909	0,192	1,381	0,201
6	0,248	0,027	1,182	0,114	1,722	0,113
7	0,424	0,006	1,535	0,087	2,525	0,17
8	0,403	0,01	1,998	0,238	2,983	0,527
9	0,49	0,161	2,229	0,374	2,781	0,233
10	1,034	0,22	2,722	0,093	2,561	0,625
11	1,314	0,08	3,07	0,058	1,406	0,607
12	1,621	0,268	3,02	0,129	2,397	0,751

## Daten zu Abb. 2b

### 33 C - Kein Mediumwechsel

Meßtag	ST14A-nativ	SD	ST14A-mock	SD	ST14A-CNTF(31)	SD
1	0,214	0,034	0,131	0,015	0,552	0,014
2	0,556	0,019	0,356	0,027	1,262	0,027
3	1,406	0,103	0,892	0,047	2,68	0,066
4	2,043	0,113	1,209	0,123	2,968	0,059
5	0,225	0,044	0,106	0,029	2,623	0,03
6	0,444	0,036	0,185	0,047	0,764	0,003
7	0,67	0,063	0,089	0,027	0,681	0,02
8	0,613	0,055	0,064	0,005	0,387	0,078
9	0,62	0,136	0,033	0,016	0,111	0,05
10	0,029	0,01	0,061	0,002	0,007	0,001
11	0	0,004	0,041	0,011	0	0,005
12	0	0,015	0	0,048	0	0,005

Meßtag	ST14A,B4	SD	ST14A,E2	SD	ST14A,A3	SD
1	0,146	0,026	0,732	0,023	1,145	0,022
2	0,229	0,019	1,077	0,03	1,287	0,096
3	0,359	0,021	1,598	0,112	1,399	0,075
4	0,422	0,033	1,675	0,074	0,841	0,027
5	0,694	0,092	2,346	0,008	0,326	0,012
6	1,189	0,023	1,425	0,206	0,704	0,019
7	1,923	0,065	0,206	0,005	0,301	0,03
8	0,451	0,043	0,159	0,044	0,035	0,023
9	0,478	0,036	0,179	0,019	0,004	0,009
10	0,487	0,021	0,145	0,038	0,005	0,005
11	0,446	0,017	0,123	0,06	0	0,002
12	0,22	0,099	0,036	0,06	0	0,011

### Daten zu Abb. 2c

#### 39 C - Täglicher Mediumwechsel

Meßtag	ST14A-nativ	SD	ST14A-mock	SD	ST14A-CNTF(31)	SD
1	0,408	0,053	0,33	0,021	0,985	0,012
2	0,409	0,116	0,43	0,065	1,253	0,125
3	0,779	0,081	0,902	0,099	2,056	0,1
4	0,882	0,077	1,091	0,024	2,127	0,064
5	0,884	0,36	1,064	0,061	1,65	0,191
6	1,463	0,212	1,158	0,056	1,925	0,272
7	2,253	0,326	1,387	0,092	2,555	0,041
8	1,949	0,385	1,704	0,242	2,256	0,146
9	0,857	0,094	0,863	0,156	1,278	0,009
10	2,014	0,129	1,547	0,033	2,248	0,086
11	2,155	0,26	2,011	0,523	2,33	0,121
12	2,291	0,396	1,604	0,124	2,309	0,421

Meßtag	ST14A,B4	SD	ST14A,E2	SD	ST14A,A3	SD
1	0,181	0,031	0,926	0,019	1,245	0,125
2	0,218	0,041	0,54	0,059	1,107	0,183
3	0,226	0,039	0,611	0,021	1,222	0,142
4	0,237	0,017	0,541	0,051	0,788	0,143
5	0,107	0,033	0,458	0,086	0,703	0,291
6	0,099	0,025	0,413	0,058	0,677	0,029
7	0,133	0,013	0,481	0,048	0,547	0,092
8	0,104	0,013	0,396	0,024	0,237	0,037
9	0,042	0,039	0,198	0,038	0,59	0,339
10	0,101	0,024	0,234	0,028	0,372	0,115
11	0,049	0,018	0,23	0,04	0,198	0,03
12	0,048	0,021	0,229	0,025	0,075	0,045

## Daten zu Abb. 2d

### 39 C - Kein Mediumwechsel

Meßtag	ST14A-nativ	SD	ST14A-mock	SD	ST14A-CNTF(31)	SD
1	0,372	0,013	0,341	0,013	1,025	0,069
2	0,814	0,031	0,877	0,206	1,751	0,066
3	1,673	0,103	1,867	0,034	2,343	0,024
4	2,34	0,056	0,381	0,115	2,509	0,069
5	1,848	0,152	0,132	0,037	2,344	0,284
6	1,792	0,017	0,096	0,005	0,807	0,04
7	1,36	0,1	0,102	0,008	0,362	0,024
8	0,035	0,06	0,073	0,019	0,06	0,017
9	0	0,005	0,031	0,012	0,024	0,025
10	0	0,003	0,046	0,007	0,02	0,003
11	0	0,002	0,034	0,005	0,009	0,031
12	0	0,012	0,037	0,036	0,045	0,06

Meßtag	ST14A,B4	SD	ST14A,E2	SD	ST14A,A3	SD
1	0,223	0,002	0,992	0,005	1,34	0,056
2	0,356	0,019	1,05	0,011	0,868	0,045
3	0,503	0,036	1,183	0,07	0,521	0,058
4	0,574	0,024	1,135	0,119	0,033	0,054
5	0,575	0,007	1,076	0,204	0,433	0,449
6	0,707	0,116	1,045	0,021	0,182	0,105
7	1,23	0,207	0,938	0,004	0,003	0,009
8	1,273	0,06	0,465	0,229	0,006	0,02
9	1,046	0,321	0,528	0,017	0,03	0,021
10	1,209	0,513	0,569	0,051	0	0,003
11	0,972	0,321	0,386	0,033	0	0,004
12	0,223	0,004	0,161	0,123	0	0,016

## Daten zu Abb. 3a und 3b

### 33 C wst-1

Meßwert	nativ	mock	CNTF	GDNF
1	1,567	0,559	1,445	1,236
2	1,996	0,585	1,612	0,489
3	1,136	0,623	1,856	0,903
4	1,25	0,571	1,921	1,08
5	0,985	0,397	1,231	0,779
6	0,92	0,589	1,154	0,683
7	0,989	0,277	1,163	1,087
8	0,944	0,354	1,198	0,361
9	1,273	0,492	2,041	0,379
10	0,5	0,27	2,029	0,489
11	0,54	0,323	2,075	0,695
12	0,518		2,766	0,261
13	1,616		2,318	1,224
14	1,04		2,275	0,265
15	1,425		1,603	0,219
16	1,399		2,167	

17	1,399				1,188		
18	0,847				1,763		
19	1,299				1,739		
20	1,493				2,061		
21	1,615				0,85		
22	1,215				0,887		
23	0,917				0,475		
24	1,165				0,47		
25	1,364				0,732		
26					0,847		
27					0,533		
28					0,512		
Mittelwerte	1,176		0,458		1,461		0,677
SEM	0,073		0,041		0,122		0,093
Varianz	0,062		0,090		0,084		0,137
t-test		n vs mock	0,0000	n vs 31	0,0520	n vs B4	<b>0,0002</b>
t-test				mock vs 31	<b>0,0000</b>	mock vs B4	<b>0,0447</b>
t-test				31 vs B4	<b>0,0000</b>		

### 3 Tage 39 C wst-1

Meßwert	nativ		mock		CNTF		GDNF
1	0,93		0,949		2,128		0,446
2	0,764		0,781		1,727		0,758
3	0,911		0,318		2,759		0,796
4	0,395		1,09		1,968		0,545
5	0,958		1,22		0,402		0,754
6	1,113		0,9		1,127		0,551
7	1,339		0,581		1,198		0,616
8	1,309		0,855				
9			0,569				
Mittelwerte	0,965		0,807		1,616		0,638
SEM	0,108		0,093		0,292		0,050
Varianz	0,112		0,116		0,181		0,079
t-test		n vs mock	0,2865	n vs 31	0,0720	n vs B4	<b>0,0208</b>
t-test				mock vs 31	<b>0,0328</b>	mock vs B4	0,1375
t-test				31 vs B4	<b>0,0152</b>		

### 5 Tage 39 C wst-1

Meßwert	GDNF
1	0,484
2	0,425
Mittelwerte	0,455
SEM	0,029
Varianz	0,065

### 6 Tage 39 C wst-1

Meßwert	nativ		mock		CNTF		GDNF
1	0,892		0,635		1,301		1,733
2					1,988		1,194
3	1,305		0,409		1,349		0,702
4	0,731		0,489		1,7		1,248

5	0,592		0,584		2,42		0,672
6	0,314		0,615		2,079		
7	1,305		0,289		1,022		
8	1,143		0,497		1,223		
9			0,362				
10			0,496				
11			0,346				
Mittelwerte	0,897		0,472		1,635		1,110
SEM	0,133		0,036		0,173		0,197
Varianz	0,149		0,076		0,106		0,177
t-test		n vs mock	<b>0,0241</b>	n vs 31	<b>0,0060</b>	n vs B4	0,4077
t-test				mock vs 31	<b>0,0002</b>	mock vs B4	<b>0,0302</b>
t-test				31 vs B4	0,0746		

8 Tage 39 C wst-1

	GDNF
1	1,292
Mittelwerte	
SEM	
Varianz	

13 Tage 39 C wst-1

Meßwert	nativ		mock		CNTF		GDNF
1	0,909		0,327		1,489		1,78
2	0,865		0,334		1,499		0,973
3	0,162		0,298		0,848		0,871
4			0,326		0,958		0,896
5							0,82
Mittelwerte	0,645		0,321		1,199		1,068
SEM	0,242		0,008		0,172		0,180
Varianz	0,375		0,025		0,144		0,168
t-test		n vs mock	0,3124	n vs 31	0,1383	n vs B4	0,2306
t-test				mock vs 31	<b>0,0145</b>	mock vs B4	<b>0,0141</b>
t-test				31 vs B4	0,6163		

t-test	nativ	mock	CNTF	GDNF
33 vs 3d	0,1264	0,0057	0,6387	0,7185
33 vs 6d	0,1142	0,8037	0,4245	0,0942
33 vs 13d	0,1497	<b>0,0077</b>	0,2557	0,0990
3d vs 6d	0,7127	<b>0,0072</b>	0,9550	0,0730
3d vs 13d	0,3185	<b>0,0008</b>	0,2510	0,0736
6d vs 13d	0,4270	<b>0,0029</b>	0,1095	0,8792

## Daten zu Abb. 4a und 4b

### 33 C <sup>3</sup>H-Thymidin

Meßwert	nativ		mock		CNTF		GDNF
1	7.540		37.254		325.499		61.732
	27.636		37.122		321.804		69.668
	8.413		38.353		429.943		61.249
2	17.551		44.999		244.550		74.681
	21.481		45.779		255.671		83.715
	22.389		42.602		246.134		63.406
3	65.952		37.885		54.008		16.688
	62.235		41.438		69.625		15.824
	52.526		41.350		60.289		16.749
4	62.657		56.810		65.207		13.669
	49.580		54.342		82.124		14.961
	59.563		56.869		58.319		13.967
5	86.921		22.239		51.067		16.315
	85.712		20.653		48.797		16.996
	98.124		20.424		49.572		16.047
6	69.746		19.755		60.925		14.838
	61.370		20.417		58.574		12.991
	74.223		19.402		62.350		14.858
7	9.670		7.431		50.440		
	9.244		20.800		45.253		
	7.360		21.394		43.975		
8	10.884		20.053		69.405		
	12.856		20.229		64.109		
	15.377		19.289		69.317		
9	9.483				59.334		
	10.467				59.948		
	10.578				61.840		
10	25.248				68.297		
	27.069				67.182		
	30.587				69.748		
Mittelwerte	37.081		31.954		60.404		33.242
SEM	9.072		4.997		3.250		10.832
Varianz	0,245		0,156		0,054		0,326
t-test		n vs mock	0,3958	n vs 31	0,0002	n vs B4	0,6406
t-test				mock vs 31	0,0000	mock vs B4	0,8532
t-test				31 vs B4	0,0005		

Wert<sup>4</sup> ausgeschlossen

### 3 Tage 39 C <sup>3</sup>H-Thymidin

Meßwert	nativ		mock		CNTF		GDNF
1	16.094		15151		11527		5154
	15.417		15449		11886		4121
	12.955		15516		11951		3935
2	9.475		13118		7390		3133
	10336		12718		8813		2985
	11.376		12449		5160		2899
3	10.349		14103		6193		2829
	10478		16192		5550		4378

	10.752		15688		6499		3142
4	28.209		12152		23297		3025
	26.046		12118		17834		3031
	24.311		13240		22260		1395
5	8.659				8252		
	8999				6746		
	12.554				8390		
6	22.839				11890		
	23085				9354		
	21.310				9935		
Mittelwerte	15.736		13.991		10.718		3.336
SEM	2.718		765		2.186		476
Varianz	0,173		0,055		0,204		0,143
t-test		n vs mock	0,2975	n vs 31	<b>0,0180</b>	n vs B4	<b>3,56E-07</b>
t-test				mock vs 31	<b>0,0233</b>	mock vs B4	<b>4,00E-14</b>
t-test				31 vs B4	<b>0,0000</b>		

#### 6 Tage 39 C<sup>3</sup>H-Thymidin

Meßwert	nativ		mock		CNTF		GDNF
1			15037				5526
			13562				5564
			12498				4939
2			7360				3362
			7248				3444
			7689				2999
3			13610				4786
			13180				5015
			13632				4922
4			9152				3360
			8962				3113
			9247				3199
Mittelwerte			10.931				4.186
SEM			1.450				507
Varianz			0,133				0,121
t-test		n vs mock		n vs 31		n vs B4	
t-test				mock vs 31		mock vs B4	<b>2,86E-06</b>
t-test				31 vs B4			

#### 13 Tage 39 C<sup>3</sup>H-Thymidin

Meßwert	nativ		mock		CNTF		GDNF
1			7256				5439
			7417				4720
			7994				4196
2			5808				5692
			6312				4887
			6906				5656
3			7953				5872
			8976				4906
			7844				4968
4			7496				5743
			7606				5569

			6646			5784
Mittelwerte			7.351			5.286
SEM			424			266
Varianz			0,058			0,050
t-test		n vs mock		n vs 31		n vs B4
t-test				mock vs 31		mock vs B4
t-test				31 vs B4		

t-test	nativ	mock	CNTF	GDNF
33 vs 3d	<b>0,0004</b>	<b>2,31E-06</b>	<b>3,36E-23</b>	<b>0,0002</b>
33 vs 6d		<b>1,73E-07</b>		<b>0,0002</b>
33 vs 13d		<b>1,34E-08</b>		<b>0,0003</b>
3d vs 6d		<b>0,0050</b>		<b>0,0458</b>
3d vs 13d		<b>2,14E-10</b>		<b>0,0000</b>
6d vs 13d		<b>0,0013</b>		<b>0,0041</b>

### Daten zu Abb. 5a und 5b

33 C

nativ	Apo-John			
	basal			
	%	MnX	(% x MnX)	normiert
23.08.00	7,02	4,76	33,42	0,34
30.08.00	5,71	4,11	23,47	0,24
30.08.00	10,6	8,16	86,50	0,87
23.11.00	26,7	5,26	140,44	1,41
30.11.00	52,1	6,29	327,71	3,29
05.01.01	10,4	13,5	140,40	1,41
05.01.01	10,4	12,9	134,16	1,35
05.01.01	9,92	6,89	68,35	0,69
25.01.01	5,42	12,20	66,12	0,66
25.01.01	4,05	14,6	59,13	0,59
25.01.01	2,4	7,2	17,28	0,17
Mittelwert	13,16	8,72	99,72	1,00
SEM	4,35	1,16	26,53	0,27
Varianz	0,33	0,13	0,27	
t-test				
t-test				
t-test				

mock	Apo-Febr			
	basal			
	%	MnX	(% x MnX)	normiert
18.02.02	92,3	37,1	3424,33	1,52
18.02.02	81,6	81	6609,60	2,94
18.02.02	80,3	49,1	3942,73	1,75
18.02.02	81	37,8	3061,80	1,36
26.02.02	14,9	6,31	94,02	0,04
26.02.02	11,5	5,06	58,19	0,03
26.02.02	11,2	6,59	73,81	0,03
26.02.02	13,8	5,28	72,86	0,03
Mittelwert	48,33	28,53	2167,17	0,96
SEM	13,48	9,82	874,06	0,39
Varianz	0,28	0,34	0,40	
t-test			n vs mock	0,9381
t-test				
t-test				

CNTF	Apo-John			
	basal			
	%	MnX	(% x MnX)	normiert
23.08.00	7,53	4,37	32,91	0,33
30.08.00	10,1	6,69	67,57	0,68
30.08.00	8,09	6,19	50,08	0,50
23.11.00	33,9	5,32	180,35	1,81
30.11.00	75,7	7,21	545,80	5,47
05.01.01	16,2	15,7	254,34	2,55
05.01.01	22,7	14,1	320,07	3,21
05.01.01	16,1	6,8	109,48	1,10
25.01.01	22	9,29	204,38	2,05
25.01.01	35,2	11,9	418,88	4,20
25.01.01	23,8	6,45	153,51	1,54
Mittelwert	24,67	8,55	212,49	2,13
SEM	5,83	1,13	48,79	0,49
Varianz	0,24	0,13	0,23	
t-test		n vs 31		0,0599
t-test		mock vs 31		0,0789
t-test		B4 vs 31		<b>0,0202</b>

GDNF	Apo-Febr			
	basal			
	%	MnX	(% x MnX)	normiert
18.02.02	71,1	104,4	7422,84	3,30
18.02.02	36,5	64,2	2343,30	1,04
18.02.02	42,1	41	1726,10	0,77
26.02.02	4,59	4,48	20,56	0,01
26.02.02	5,28	3,17	16,74	0,01
26.02.02	14,2	7,56	107,35	0,05
26.02.02	12,8	8,41	107,65	0,05
13.05.02	18,4	36,6	673,44	0,30
13.05.02	71,9	21	1509,90	0,67
13.05.02	67,2	19,7	1323,84	0,59
13.05.02	65,8	21,6	1421,28	0,63
Mittelwert	37,26	30,19	1515,73	0,67
SEM	8,34	9,28	638,37	0,28
Varianz	0,22	0,31	0,42	
t-test		n vs B4		0,4109
t-test		mock vs B4		0,5571
t-test				

## 3d 39 C

nativ	Apo-John			
	basal			
	%	MnX	(% x MnX)	normiert
23.11.01	36,1	11	397,10	3,98
30.11.00	6,21	12,3	76,38	0,77
05.01.01	15,9	10,9	173,31	1,74
05.01.01	13,1	9,23	120,91	1,21
05.01.01	9,26	10,2	94,45	0,95
25.01.01	9,67	12,2	117,97	1,18
25.01.01	12,2	13,5	164,70	1,65
25.01.01	5,27	14,6	76,94	0,77
Mittelwert	13,46	11,74	152,72	1,53
SEM	3,46	0,62	37,19	0,37
Varianz	0,26	0,05	0,24	
t-test				
t-test				
t-test				

mock	Apo-Febr			
	basal			
	%	MnX	(% x MnX)	normiert
21.02.02	12	18,8	225,60	0,10
21.02.02	20,6	6,16	126,90	0,06
21.02.02	29	23,5	681,50	0,30
21.02.02	26	12,5	325,00	0,14
28.02.02	4,01	23,5	94,24	0,04
28.02.02	5,15	58	298,70	0,13
28.02.02	3,03	44,3	134,23	0,06
28.02.02	4,34	21,6	93,74	0,04
Mittelwert	13,02	26,05	247,49	0,11
SEM	3,78	6,00	69,69	0,03
Varianz	0,29	0,23	0,28	
t-test		n vs mock		<b>0,0066</b>
t-test				
t-test				

CNTF	Apo-John			
	basal			
	%	MnX	(% x MnX)	normiert
23.11.01	55,1	11,1	611,61	6,13
01.12.01	38,2	5,81	221,94	2,23
05.01.01	7,62	7,93	60,43	0,61
05.01.01	9,42	24,3	228,91	2,30
05.01.01	8,8	6,25	55,00	0,55
25.01.01	13,9	9,86	137,05	1,37
25.01.01	10,9	15,1	164,59	1,65
25.01.01	11	7,58	83,38	0,84
Mittelwert	19,37	10,99	195,36	1,96
SEM	6,20	2,18	64,07	0,64
Varianz	0,32	0,20	0,33	
t-test		n vs 31		0,5762
t-test		mock vs 31		<b>0,0237</b>
t-test		B4 vs 31		<b>0,0396</b>

GDNF	Apo-Febr			
	basal			
	%	MnX	(% x MnX)	normiert
21.02.02	44	20,8	915,20	0,41
21.02.02	52,7	40,9	2155,43	0,96
21.02.02	49,9	18,6	928,14	0,41
21.02.02	34,8	18,8	654,24	0,29
28.02.02	8,32	43,5	361,92	0,16
28.02.02	8,34	44,4	370,30	0,16
28.02.02	11,9	36,7	436,73	0,19
28.02.02	6,62	30,3	200,59	0,09
Mittelwert	27,07	31,75	752,82	0,33
SEM	7,17	3,94	221,12	0,10
Varianz	0,26	0,12	0,29	
t-test		n vs B4		<b>0,0147</b>
t-test		mock vs B4		0,0594

t-test	nativ	mock	CNTF	GDNF
33 C vs 39 C	0,2662	0,0643	0,8347	0,2803

## Daten zu Abb. 6a und 6b

### 33 C wst-1 Serumentzug

Meßwert	nativ			mock		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	0,500	0,143	-0,714	0,585	0,460	-0,214
2	0,540	0,151	-0,720	0,492	0,381	-0,226
3	0,518	0,137	-0,736	0,277	0,379	0,368
4	1,040	1,408	0,354	0,354	0,287	-0,189
5	1,399	1,026	-0,267			
6	1,399	1,026	-0,267			
7	1,215	0,793	-0,347			
8						
MW	0,944	0,669	-0,385	0,427	0,377	-0,065
SEM	0,157	0,198	0,148	0,069	0,035	0,145
Varianz	0,167	0,296	-0,384	0,161	0,094	-2,222
t-Test					n vs mock	0,1598
t-Test						
t-Test						

Meßwert	CNTF			GDNF		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	2,041	0,723	-0,646	0,779	0,951	0,221
2	2,029	0,791	-0,610	0,683	0,899	0,316
3	2,075	0,662	-0,681	0,379	0,179	-0,528
4	2,167	1,587	-0,268	0,261	0,383	0,467
5	0,850	0,378	-0,555	0,224	0,288	0,286
6	0,887	0,262	-0,705			
7	0,475	0,458	-0,036			
8	0,470	0,422	-0,102			
MW	1,374	0,660	-0,450	0,465	0,540	0,152
SEM	0,272	0,147	0,096	0,113	0,161	0,195
Varianz	0,198	0,223	-0,214	0,242	0,298	1,282
t-Test		n vs 31	0,7197		n vs B4	<b>0,0441</b>
t-Test		mock vs 31	0,0703		mock vs B4	0,3696
t-Test		31 vs B4	<b>0,0214</b>			

### 3 Tage 39 C wst-1 Serumentzug

Meßwert	nativ			mock		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	0,764	0,000	-1,000	1,090	0,197	-0,819
2	2,908	0,996	-0,657	0,900	0,059	-0,934
3	1,339	0,597	-0,554	0,581	0,051	-0,912
MW	1,670	0,531	-0,737	0,857	0,102	-0,889
SEM	0,641	0,289	0,135	0,149	0,047	0,035
Varianz	0,384	0,545	-0,183	0,173	0,463	-0,040
t-Test					n vs mock	0,3787
t-Test						
t-Test						

Meßwert	CNTF			GDNF		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	0,840	0,195	-0,768	0,446	0,000	-1,000
2	1,127	0,584	-0,482	0,545	0,336	-0,383
3				0,754	0,367	-0,513
MW	0,984	0,390	-0,625	0,582	0,234	-0,632
SEM	0,144	0,195	0,143	0,091	0,118	0,188
Varianz	0,146	0,499	-0,229	0,156	0,501	-0,297
t-Test		n vs 31	0,6137		n vs B4	0,6754
t-Test		mock vs 31	0,3030		mock vs B4	0,3040
t-Test		31 vs B4	0,9769			

6 Tage 39 C wst-1 Serumentzug

Meßwert	nativ			mock		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	1,305	0,122	-0,907	0,615	0,201	-0,673
2	1,143	0,060	-0,948	0,289	0,213	-0,263
3	0,592	0,207	-0,650	0,409	0,129	-0,685
4	0,314	0,047	-0,850	0,489	0,116	-0,763
5				0,584	0,319	-0,454
6				0,497	0,140	-0,718
7				0,362	0,093	-0,743
MW	0,839	0,109	-0,839	0,464	0,173	-0,614
SEM	0,232	0,037	0,066	0,044	0,029	0,070
Varianz	0,277	0,335	-0,079	0,096	0,170	-0,114
t-Test					n vs mock	<b>0,0468</b>
t-Test						
t-Test						

Meßwert	CNTF			GDNF		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	1,022	0,575	-0,437	1,194	0,413	-0,654
2	1,223	0,841	-0,312	0,702	0,000	-1,000
3	1,700	0,000	-1,000			
4	2,420	0,021	-0,991			
5	2,079	0,509	-0,755			
6						
7						
MW	1,689	0,389	-0,699	0,948	0,413	-0,827
SEM	0,260	0,164	0,141	0,246		0,173
Varianz	0,154	0,422	-0,202	0,259		-0,209
t-Test		n vs 31	0,4071		n vs B4	0,9582
t-Test		mock vs 31	0,6082		mock vs B4	0,4169
t-Test		31 vs B4	0,6142			

8 Tage 39 C wst-1 Serumentzug

Meßwert	nativ			CNTF		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
Meßwert	0,679	0	-1	0,753	0	-1
SD	0,080	0,003		0,053	0,003	

13 Tage 39 C wst-1 Serumentzug

Meßwert	mock			GDNF		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	0,327	0,017	-0,948	0,973	0	-1
2	0,334	0,092	-0,725	0,871	0	-1
MW	0,331	0,055	-0,836	0,922	0	-1
SEM	0,004	0,038	0,112	0,051		0
Varianz	0,011	0,688	-0,134	0,055		0
t-Test		mock vs B4	0,3812			

t-test	nativ	mock	CNTF	GDNF
33 vs 3d	0,1249	<b>0,0086</b>	0,4156	<b>0,0276</b>
33 vs 6d	<b>0,0232</b>	<b>0,0227</b>	0,1844	<b>0,0245</b>
33 vs 13d		<b>0,0159</b>		<b>0,0027</b>
3d vs 6d	0,5479	0,3632	0,7345	0,5044
3d vs 13d		0,7220		0,1891
6d vs 13d		0,2410		0,5000

Daten zu Abb. 6c und 6d

33 C <sup>3</sup>H-Thymidin Serumentzug

Meßwert	nativ			mock		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	65.952	31.285	-0,434	37.254	4.699	-0,602
	62.235	35.981		37.122	19.009	
	52.526	34.948		38.353	21.208	
2	9.670	378	-0,815	44.999	25.739	-0,328
	9.244	2.454		45.779	35.788	
	7.360	2.033		42.602	28.087	
3	10.884	517	-0,722	22.239	29.368	0,384
	12.856	3.690		20.653	28.703	
	15.377	6.679		20.424	29.530	
4	86.921	41.540	-0,467	19.755	11.627	-0,423
	85.712	47.912		20.417	11.394	
	98.124	54.837		19.402	11.382	
5						
MW	43.072	21.855	-0,610	30.750	21.378	-0,242
SEM	17.840	10.510	0,094	5.534	4.848	0,216
Varianz	0,414	0,481	-0,154	0,180	0,227	-0,893
t-Test					n vs mock	0,1924
t-Test						
t-Test						

Meßwert	CNTF			GDNF		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	54.008	49.133	-0,230	16.688	15.058	-0,082
	69.625	51.194		15.824	14.579	
	60.289	41.288		16.749	15.565	

2	59.334	33.265	-0,402	13.669	9.477	-0,326
	59.948	36.635		14.961	9.758	
	61.840	38.400		13.967	9.461	
3	68.297	28.861	-0,559	26.029	28.884	-0,488
	67.182	32.900		61.732	25.970	
	69.748	28.643		69.668	25.697	
4	51.067	4.765	-0,885			
	48.797	4.821				
	49.572	7.629				
5	60.925	13.380	-0,675			
	58.574	18.047				
	62.350	27.590				
MW	60.104	27.770	-0,550	27.699	17.161	-0,299
SEM	3.094	6.762	0,112	12.669	4.447	0,118
Varianz	0,051	0,244	-0,204	0,457	0,259	-0,395
t-Test		n vs 31	0,6982		n vs B4	0,1050
t-Test		mock vs 31	0,2662		mock vs B4	0,8276
t-Test		31 vs B4	0,1817			

### 3 Tage 39 C <sup>3</sup>H-Thymidin Serumentzug

Meßwert	nativ			mock		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	9.475	5.950	-0,444	15.151	1.120	-0,896
	10.336	5.974		15.449	1.163	
	11.376	5.410		15.516	2.520	
2	16.094	11.148	-0,328	13.118	1.417	-0,867
	15.417	9.316		12.718	2.243	
	12.955	9.416		12.449	1.447	
3	10.349	14.285	0,161			
	10.478	13.026				
	10.752	9.342				
MW	11.915	9.319	-0,386	14.067	1.652	-0,881
SEM	1.376	1.821	0,058	1.026	415	0,015
Varianz	0,115	0,195	-0,150	0,073	0,251	-0,017
t-Test					n vs mock	0,0665
t-Test						
t-Test						

Meßwert	CNTF			GDNF		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	7.390	4.513	-0,337	5.154	2.001	-0,455
	8.813	4.572		4.121	2.338	
	5.160	5.088		3.935	2.859	
2	11.527	10.965	-0,020	3.133	965	-0,675
	11.886	12.519		2.985	930	
	11.951	11.162		2.899	1.034	
3	6.193	9.390	0,617			
	5.550	9.789				
	6.499	10.314				
MW	9.455	8.701	-0,178	3.705	1.688	-0,565
SEM	1.989	1.799	0,129	618	585	0,110

Varianz	0,210	0,207	-0,724	0,167	0,346	-0,195
t-Test		n vs 31	0,9237		n vs B4	0,1944
t-Test		mock vs 31	0,1383		mock vs B4	0,2081
t-Test		31 vs B4	0,1977			

6 Tage 39 C <sup>3</sup>H-Thymidin Serumentzug

Meßwert	mock			GDNF		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	15.037	2.683	-0,776	5.526	2.016	-0,624
	13.562	3.358		5.564	2.007	
	12.498	3.152		4.939	2.009	
2	7.360	1.729	-0,767	3.362	2.571	-0,220
	7.248	1.699		3.444	2.701	
	7.689	1.775		2.999	2.375	
MW	10.566	2.399	-0,771	4.306	2.280	-0,422
SEM	2.495	538	0,005	825	221	0,202
Varianz	0,236	0,224	-0,006	0,192	0,097	-0,478
t-Test		mock vs B4	0,3331			

13 Tage 39 C <sup>3</sup>H-Thymidin Serumentzug

Meßwert	mock			GDNF		
	basal	0%FBS	ratio	basal	0%FBS	ratio
1	7.256	1.217	-0,868	5.439	2.088	-0,552
	7.417	593		4.720	2.234	
	7.994	1.183		4.196	2.102	
2	5.808	2.694	-0,577	5.692	3.177	-0,371
	6.312	2.638		4.887	3.605	
	6.906	2.722		5.656	3.428	
MW	6.949	1.841	-0,722	5.098	2.772	-0,462
SEM	558	672	0,146	422	499	0,091
Varianz	0,080	0,365	-0,202	0,083	0,180	-0,196
t-Test		mock vs B4	0,2908			

t-test	nativ	mock	CNTF	GDNF
33 vs 3d	0,3739	0,0594	0,1875	0,2046
33 vs 6d		0,0917		0,6595
33 vs 13d		0,1407		0,3544
3d vs 6d		0,0613		0,6124
3d vs 13d		0,4711		0,5463
6d vs 13d		0,7928		0,8796

## Daten zu Abb. 7a und 7b

### 33 C wst-1 Staurosporin

Meßwert	nativ				mock			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	1,567	1,423	0,498	-0,682	0,559	0,347	0,184	-0,671
2	1,250	0,918	0,445	-0,644	0,559	0,347	0,184	-0,671
3	0,985	0,969	0,545	-0,447	0,623	0,514	0,393	-0,369
4	0,920	0,882	0,523	-0,432	0,571	0,639	0,334	-0,415
5	1,273	1,039	0,605	-0,525	0,397	0,378	0,145	-0,635
6	1,616	0,399	0,346	-0,786	0,589	0,554	0,234	-0,603
7	1,425	1,212	0,706	-0,505	0,573	0,471	0,390	-0,319
8	1,299	1,100	0,695	-0,465	0,270	0,245	0,073	-0,730
9	1,493	1,003	0,593	-0,603	0,323	0,328	0,112	-0,653
10	1,615	1,209	0,543	-0,664				
11	1,615	1,209	0,543	-0,664				
12	0,917	0,643	0,428	-0,533				
13	1,165	0,987	0,438	-0,624				
14	1,364	1,239	0,349	-0,744				
MW	1,295	1,008	0,519	-0,583	0,496	0,425	0,228	-0,563
SEM	0,071	0,068	0,029	0,031	0,043	0,042	0,040	0,051
Varianz	0,055	0,067	0,055	-0,053	0,087	0,100	0,174	-0,090
t-Test							n vs mock	0,6043
t-Test								
t-Test								

Meßwert	CNTF				GDNF			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	1,445	1,209	0,833	-0,424	1,236	0,918	0,522	-0,578
2	1,921	1,490	1,084	-0,436	0,489	0,520	0,276	-0,436
3	1,231	1,181	0,928	-0,246	1,080	0,772	0,419	-0,612
4	1,154	1,076	0,827	-0,283	0,903	0,701	0,454	-0,497
5	2,766	1,345	0,976	-0,647	0,361	0,215	0,131	-0,637
6	2,318	1,741	1,220	-0,474	0,361	0,215	0,131	-0,637
7	1,603	0,923	0,554	-0,654	0,489	0,499	0,388	-0,207
8	1,603	0,923	0,554	-0,654	0,695	0,185	0,227	-0,673
9	1,188	1,197	0,792	-0,333	1,224	0,916	0,525	-0,571
10	1,763	1,443	0,911	-0,483	0,265	0,212	0,123	-0,536
11	1,739	1,315	0,691	-0,603	0,219	0,232	0,138	-0,370
12	2,061	1,688	0,773	-0,625				
13	0,732	0,596	0,496	-0,322				
14	0,847	0,612	0,462	-0,455				
	0,533	0,430	0,344	-0,355				
	0,512	0,432	0,338	-0,340				
MW	1,514	1,138	0,765	-0,459	0,666	0,490	0,303	-0,523
SEM	0,163	0,109	0,069	0,034	0,116	0,089	0,049	0,042
Varianz	0,108	0,096	0,091	-0,074	0,174	0,182	0,162	-0,080
t-Test			n vs 31	<b>0,0066</b>			n vs B4	0,1841
t-Test			mock vs 31	0,1102			mock vs B4	0,5534
t-Test			31 vs B4	0,2509				

3 Tage 39 C wst-1 Staurosporin

Meßwert	nativ				mock			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	0,930	0,303	0,231	-0,752	0,949	0,570	0,239	-0,748
2	0,911	0,355	0,204	-0,776	0,781	0,456	0,216	-0,723
3	0,958	0,601	0,315	-0,671	0,318	0,160	0,088	-0,723
4	1,113	0,763	0,452	-0,594	1,220	0,700	0,346	-0,716
5	1,309	1,195	0,059	-0,955	0,855	0,432	0,252	-0,705
6					0,569	0,275	0,099	-0,826
MW	1,044	0,643	0,252	-0,750	0,782	0,432	0,207	-0,740
SEM	0,075	0,161	0,065	0,061	0,127	0,080	0,040	0,018
Varianz	0,072	0,250	0,257	-0,081	0,163	0,184	0,194	-0,024
t-Test							n vs mock	0,8912
t-Test								
t-Test								

Meßwert	CNTF				GDNF			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	2,128	1,011	0,772	-0,637	0,796	0,499	0,447	-0,438
2	1,727	0,743	0,573	-0,668	0,551	0,338	0,394	-0,285
3	2,759	1,300	0,959	-0,652		0,332	0,258	
4	1,968	0,837	0,902	-0,542				
5	0,402	0,196	0,163	-0,595				
	1,198	0,568	0,353	-0,705				
MW	1,697	0,776	0,620	-0,633	0,674	0,390	0,366	-0,362
SEM	0,332	0,154	0,129	0,024	0,123	0,055	0,056	0,077
Varianz	0,196	0,199	0,208	-0,037	0,182	0,140	0,154	-0,212
t-Test			n vs 31	0,1310			n vs B4	<b>0,0427</b>
t-Test			mock vs 31	<b>0,0053</b>			mock vs B4	0,1119
t-Test			31 vs B4	0,1496				

6 Tage 39 C wst-1 Staurosporin

Meßwert	nativ				mock			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	0,892	0,245	0,163	-0,817	1,305	0,708	0,304	-0,767
2	0,731	0,421	0,311	-0,575	0,635	0,297	0,156	-0,754
					0,496	0,433	0,151	-0,696
					0,346	0,213	0,121	-0,650
MW	0,812	0,333	0,237	-0,696	0,696	0,413	0,183	-0,717
SEM	0,080	0,088	0,074	0,121	0,212	0,108	0,041	0,027
Varianz	0,099	0,264	0,312	-0,174	0,304	0,263	0,224	-0,038
t-Test							n vs mock	0,7513
t-Test								
t-Test								

Meßwert	CNTF				GDNF			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	1,301	1,040	0,454	-0,651	1,733	0,987	0,608	-0,649
2	1,988	0,958	0,783	-0,606	1,248	1,076	0,690	-0,447

	1,349	0,832	0,741	-0,451	0,672	0,554	0,450	-0,330
MW	1,546	0,943	0,659	-0,569	1,218	0,872	0,583	-0,476
SEM	0,221	0,060	0,103	0,061	0,307	0,161	0,070	0,093
Varianz	0,143	0,064	0,157	-0,107	0,252	0,185	0,121	-0,196
t-Test			n vs 31	0,8512			n vs B4	0,4227
t-Test			mock vs 31	0,3910			mock vs B4	0,1124
t-Test			31 vs B4	0,4536				

13 Tage 39 C wst-1 Staurosporin

Meßwert	nativ				mock			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	0,162	0,054	0,020	-0,877	0,298	0,201	0,105	-0,648
2	0,909	0,468	0,326	-0,641	0,326	0,188	0,144	-0,558
3	0,865	0,415	0,346	-0,600				
4								
MW	0,645	0,312	0,231	-0,706	0,312	0,195	0,125	-0,603
SEM	0,242	0,130	0,105	0,086	0,014	0,007	0,020	0,045
Varianz	0,375	0,416	0,457	-0,122	0,045	0,033	0,157	-0,074
t-Test							n vs mock	0,3709
t-Test								
t-Test								

Meßwert	CNTF				GDNF			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	0,848	0,647	0,869	0,025	1,780	1,197	0,626	-0,648
2	0,958	0,479	0,277	-0,711	0,896	0,734	0,632	-0,295
3	1,489	0,522	0,539	-0,638	0,820	0,679	0,585	-0,287
4	1,499	0,563	0,549	-0,634				
MW	1,199	0,553	0,559	-0,489	1,165	0,870	0,614	-0,410
SEM	0,172	0,036	0,121	0,172	0,308	0,164	0,015	0,119
Varianz	0,144	0,065	0,217	-0,352	0,264	0,189	0,024	-0,291
t-Test			n vs 31	0,3201			n vs B4	0,1213
t-Test			mock vs 31	0,5644			mock vs B4	0,2439
t-Test			31 vs B4	0,7200				

t-test	nativ	mock	CNTF	GDNF
33 vs 3d	0,0602	<b>0,0081</b>	<b>0,0005</b>	0,2305
33 vs 6d	0,5520	0,3434	0,1986	0,6749
33 vs 13d	0,3222	0,5822	0,8701	0,4478
3d vs 6d	0,7405	0,4975	0,4078	0,4165
3d vs 13d	0,7003	0,1601	0,4671	0,7567
6d vs 13d	0,9522	0,1760	0,6864	0,6878

## Daten zu Abb. 7c und 7d

### 33 C <sup>3</sup>H-Thymidin Staurosporin

Meßwert	nativ				mock			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	7.540	11.217	14.527	0,511	37.885	25.820	19.566	-0,522
	27.636	14.526	21.899		41.438	23.385	19.512	
	8.413	10.875	29.419		41.350	24.936	18.615	
2	62.657	50.448	45.532	-0,256	56.810	39.581	20.137	-0,516
	49.580	45.558	41.283		54.342	41.126	28.285	
	59.563	49.136	40.984		56.869	43.792	32.889	
3	69.746	64.424	46.342	-0,341	7.431	15.636	4.721	-0,694
	61.370	57.121	44.614		20.800	14.834	4.513	
	74.223	51.858	44.417		21.394	14.790	5.974	
4	9.483	10.066	8.977	-0,054	20.053	13.896	7.499	-0,581
	10.467	9.317	8.779		20.229	16.553	8.686	
	10.578	11.919	11.117		19.289	15.331	8.772	
5	25.248	15.723	10.481	-0,163				
	27.069	32.462	29.016					
	30.587	28.577	29.923					
6								
MW	35.611	30.882	28.487	-0,203	33.158	24.140	14.931	-0,578
SEM	11.057	9.051	6.633	0,062	8.545	5.648	4.789	0,041
Varianz	0,311	0,293	0,233	-0,303	0,258	0,234	0,321	-0,071
t-Test							n vs mock	<b>0,0034</b>
t-Test								
t-Test								

Meßwert	CNTF				GDNF			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	325.499	235.294	97.809	-0,684	74.681	26.578	11.918	-0,768
	321.804	191.050	103.306		83.715	25.101	17.214	
	429.943	295.281	138.900		63.406	25.547	22.425	
2	65.207	48.458	47.098	-0,306	16.315	9.826	4.341	-0,732
	82.124	50.064	49.211		16.996	8.532	4.683	
	58.319	46.642	46.477		16.047	9.312	4.200	
3	50.440	37.352	27.634	-0,402	14.838	8.269	5.007	-0,662
	45.253	35.251	27.686		12.991	8.449	5.222	
	43.975	33.985	28.226		14.858	8.872	4.219	
4	69.405	53.899	40.969	-0,329				
	64.109	54.187	43.097					
	69.317	47.447	51.984					
5	47.899	38.302	32.936	-0,337				
	51.333	39.302	32.813					
	49.941	37.579	33.139					
6	48.449	41.705	33.962	-0,327				
	47.927	41.366	31.181					
	49.191	43.497	32.821					
MW	106.674	76.148	49.958	-0,398	34.872	14.498	8.803	-0,720

SEM	48.373	31.833	12.693	0,059	17.180	4.881	3.939	0,031
Varianz	0,453	0,418	0,254	-0,148	0,493	0,337	0,447	-0,043
t-Test			n vs 31	<b>0,0552</b>			n vs B4	<b>0,0013</b>
t-Test			mock vs 31	<b>0,0364</b>			mock vs B4	<b>0,0403</b>
t-Test			31 vs B4	<b>0,0020</b>				

### 3 Tage 39 C <sup>3</sup>H-Thymidin Staurosporin

Meßwert	nativ				mock			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	28.209	20.165	14.232	-0,400	14.103	3.164	1.792	-0,879
	26.046	20.947	15.329		16.192	3.222	1.353	
	24.311	20.709	17.592		15.688	3.267	2.408	
2	8.659	6.095	2.147	-0,773	12.152	2.665	1.338	-0,880
	8.999	5.185	2.228		12.118	2.981	1.614	
	12.554	7.746	2.482		13.240	2.949	1.547	
3	22.839	6.513	2.357	-0,906				
	23.085	5.959	1.958					
	21.310	5.451	2.019					
MW	19.557	10.974	6.705	-0,693	13.916	3.041	1.675	-0,880
SEM	4.307	4.193	3.935	0,151	1.231	159	281	0,000
Varianz	0,220	0,382	0,587	-0,219	0,088	0,052	0,168	0,000
t-Test							n vs mock	0,3428
t-Test								
t-Test								

Meßwert	CNTF				GDNF			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	23.297	9.684	7.376	-0,624	2.829	2.820	1.785	-0,149
	17.834	13.337	9.480		4.378	1.444	2.590	
	22.260	14.976	6.993		3.142	1.847	4.432	
2	8.252	3.241	696	-0,847	3.025	1.086	793	-0,734
	6.746	2.990	702		3.031	1.054	671	
	8.390	4.049	2.183		1.395	1.555	521	
3	11.890	4.281	1.600	-0,847				
	9.354	3.953	1.431					
	9.935	3.230	1.731					
MW	13.106	6.638	3.577	-0,773	2.967	1.634	1.799	-0,441
SEM	3.662	2.736	1.951	0,074	672	462	1.071	0,292
Varianz	0,279	0,412	0,546	-0,096	0,227	0,282	0,596	-0,662
t-Test			n vs 31	0,6696			n vs B4	0,5437
t-Test			mock vs 31	0,2871			mock vs B4	0,3744
t-Test			31 vs B4	0,4529				

### 6 Tage 39 C <sup>3</sup>H-Thymidin Staurosporin

Meßwert	mock				GDNF			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	13.610	3.125	1.990	-0,840	4.786	2.170	950	-0,798
	13.180	2.915	2.157		5.015	1.949	1.020	
	13.632	3.033	2.302		4.922	2.066	1.002	
2	9.152	2.071	1.512	-0,834	3.360	1.601	761	-0,763
	8.962	1.932	1.525		3.113	1.411	782	

	9.247	2.106	1.516		3.199	1.151	750	
MW	11.297	2.530	1.834	-0,837	4.066	1.725	878	-0,781
SEM	1.691	388	255	0,003	657	284	89	0,018
Varianz	0,150	0,153	0,139	-0,004	0,161	0,165	0,102	-0,023
t-Test							mock vs B4	0,1814
t-Test								
t-Test								

13 Tage 39 C<sup>3</sup>H-Thymidin Staurosporin

Meßwert	mock				GDNF			
	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7	ohne Stau	Stau-8	Stau-7	ratio-7
1	7.953	2.380	1.856	-0,802	5.872	1.776	1.215	-0,782
	8.976	3.156	1.601		4.906	2.077	1.155	
	7.844	2.546	1.457		4.968	2.040	1.067	
2	7.496	2.322	286	-0,845	5.743	2.112	1.390	-0,777
	7.606	2.224	1.671		5.569	2.290	1.274	
	6.646	2.154	1.418		5.784	1.825	1.152	
MW	7.754	2.464	1.382	-0,823	5.474	2.020	1.209	-0,779
SEM	535	258	396	0,022	302	135	80	0,002
Varianz	0,069	0,105	0,286	-0,026	0,055	0,067	0,066	-0,003
t-Test							mock vs B4	0,2872

t-test	nativ	mock	CNTF	GDNF
33 vs 3d	0,0672	<b>0,0053</b>	<b>0,0129</b>	0,5137
33 vs 6d		<b>0,0079</b>		0,1949
33 vs 13d		<b>0,0063</b>		0,1988
3d vs 6d		<b>0,0482</b>		0,4523
3d vs 13d		0,2325		0,4539
6d vs 13d		0,6373		0,9541

Daten zu Abb. 7e und 7f

33 C

	nativ		Apo-John					Δ(% x MnX)
	basal				Stau-7			
	%	MnX	(% x MnX)	%	MnX	(% x MnX)		
23.08.00	7,02	4,76	33,42	13,60	9,96	135,46	3,05	
30.08.00	5,71	4,11	23,47	15,00	12,60	189,00	7,05	
30.08.00	10,60	8,16	86,50	16,20	9,80	158,76	0,84	
23.11.00	26,70	5,26	140,44	32,00	7,48	239,36	0,70	
30.11.00	52,10	6,29	327,71	70,50	19,40	1367,70	3,17	
05.01.01	10,40	13,50	140,40	14,90	10,90	162,41	0,16	
05.01.01	10,40	12,90	134,16	25,10	13,40	336,34	1,51	
05.01.01	9,92	6,89	68,35	9,15	8,51	77,87	0,14	
25.01.01	5,42	12,20	66,12	9,61	11,00	105,71	0,60	
25.01.01	4,05	14,60	59,13	11,50	12,00	138,00	1,33	
25.01.01	2,40	7,20	17,28	8,72	15,10	131,67	6,62	
Mittelwerte	13,16	8,72	99,72	20,57	11,83	276,57	<b>2,29</b>	1,77
SEM	4,35	1,16	26,53	5,43	1,00	111,15	<b>0,74</b>	1,18

Varianz	0,33	0,13	0,27	0,26	0,08	0,40	<b>0,33</b>	0,67
t-test								
t-test								
t-test								

	Apo-Febr		Stau-7			$\Delta$ (% x MnX)		
	basal							
	%	MnX	(% x MnX)	%	MnX			(% x MnX)
18.02.02	92,30	37,10	3424,33	71,90	114,50	8232,55	1,40	
18.02.02	81,60	81,00	6609,60	50,70	150,80	7645,56	0,16	
18.02.02	80,30	49,10	3942,73	64,00	200,60	12838,40	2,26	
18.02.02	81,00	37,80	3061,80	53,00	164,30	8707,90	1,84	
26.02.02	14,90	6,31	94,02	22,90	8,28	189,61	1,02	
26.02.02	11,50	5,06	58,19	24,60	8,02	197,29	2,39	
26.02.02	11,20	6,59	73,81	32,90	9,41	309,59	3,19	
26.02.02	13,80	5,28	72,86	30,90	8,96	276,86	2,80	
Mittelwerte	48,33	28,53	2167,17	43,86	83,11	4799,72	1,88	1,21
SEM	13,48	9,82	874,06	6,57	29,32	1806,88	0,35	0,95
Varianz	0,28	0,34	0,40	0,15	0,35	0,38	0,19	0,78
t-test						n vs mock		0,6297
t-test								
t-test								

CNTF	Apo-John		Stau-7			$\Delta$ (% x MnX)		
	basal							
	%	MnX	(% x MnX)	%	MnX			(% x MnX)
23.08.00	7,53	4,37	32,91	13,90	5,23	72,70	1,21	
30.08.00	10,10	6,69	67,57	8,25	9,80	80,85	0,20	
30.08.00	8,09	6,19	50,08	6,00	4,88	29,28	-0,42	
23.11.00	33,90	5,32	180,35	47,00	11,90	559,30	2,10	
30.11.00	75,70	7,21	545,80	45,90	11,80	541,62	-0,01	
05.01.01	16,20	15,70	254,34	15,40	18,40	283,36	0,11	
05.01.01	22,70	14,10	320,07	27,20	19,20	522,24	0,63	
05.01.01	16,10	6,80	109,48	11,70	6,85	80,15	-0,27	
25.01.01	22,00	9,29	204,38	36,40	12,50	455,00	1,23	
25.01.01	35,20	11,90	418,88	21,40	11,10	237,54	-0,43	
25.01.01	23,80	6,45	153,51			0,00	-1,00	
Mittelwerte	24,67	8,55	212,49	23,32	11,17	286,20	<b>0,31</b>	0,35
SEM	5,83	1,13	48,79	4,80	1,55	68,53	<b>0,27</b>	0,16
Varianz	0,24	0,13	0,23	0,21	0,14	0,24	<b>0,90</b>	0,47
t-test						n vs 31		<b>0,0270</b>
t-test						mock vs 31		<b>0,0031</b>
t-test						B4 vs 31		0,1992

<b>GDNF</b>		Apo-Febr						
	basal			Stau-7			$\Delta$ (% x MnX)	
	%	MnX	(% x MnX)	%	MnX	(% x MnX)		
18.02.02	71,10	104,40	7422,84	40,40	195,40	7894,16	0,06	
18.02.02	36,50	64,20	2343,30	20,00	169,30	3386,00	0,44	
18.02.02	42,10	41,00	1726,10	22,90	202,70	4641,83	1,69	
26.02.02	4,59	4,48	20,56	9,53	9,20	87,68	3,26	
26.02.02	5,28	3,17	16,74	17,30	8,43	145,84	7,71	
26.02.02	14,20	7,56	107,35	9,15	5,87	53,71	-0,50	
26.02.02	12,80	8,41	107,65	13,40	12,00	160,80	0,49	
13.05.02	18,40	36,60	673,44	68,80	30,80	2119,04	2,15	
13.05.02	71,90	21,00	1509,90	63,70	31,50	2006,55	0,33	
13.05.02	67,20	19,70	1323,84	59,60	30,30	1805,88	0,36	
13.05.02	65,80	21,60	1421,28			0,00	-1,00	
Mittelwerte	37,26	30,19	1515,73	32,48	69,55	2230,15	<b>1,60</b>	0,47
SEM	8,34	9,28	638,37	7,46	26,41	798,81	<b>0,77</b>	0,37
Varianz	0,22	0,31	0,42	0,23	0,38	0,36	<b>0,48</b>	0,78
t-test						n vs B4		0,3868
t-test						mock vs B4		0,5338
t-test								

3d 39 C

<b>nativ</b>		Apo-John						
	basal			Stau-7			$\Delta$ (% x MnX)	
	%	MnX	(% x MnX)	%	MnX	(% x MnX)		
23.11.01	36,10	11,00	397,10	24,60	10,40	255,84	-0,36	
30.11.00	6,21	12,30	76,38	17,80	11,50	204,70	1,68	
05.01.01	15,90	10,90	173,31	12,50	9,89	123,63	-0,29	
05.01.01	13,10	9,23	120,91	12,20	18,80	229,36	0,90	
05.01.01	9,26	10,20	94,45	10,40	5,59	58,14	-0,38	
25.01.01	9,67	12,20	117,97	12,20	15,80	192,76	0,63	
25.01.01	12,20	13,50	164,70	18,80	23,30	438,04	1,66	
25.01.01	5,27	14,60	76,94	3,61	6,36	22,96	-0,70	
Mittelwerte	13,46	11,74	152,72	14,01	12,71	190,68	0,39	0,25
SEM	3,46	0,62	37,19	2,23	2,17	45,77	0,32	0,12
	0,26	0,05	0,24	0,16	0,17	0,24	0,81	0,48
t-test								
t-test								
t-test								

<b>mock</b>		Apo-Febr						
	basal			Stau-7			$\Delta$ (% x MnX)	
	%	MnX	(% x MnX)	%	MnX	(% x MnX)		
21.02.02	12,00	18,80	225,60	38,80	26,00	1008,80	3,47	
21.02.02	20,60	6,16	126,90	35,10	52,80	1853,28	13,60	
21.02.02	29,00	23,50	681,50	47,30	55,80	2639,34	2,87	
21.02.02	26,00	12,50	325,00	47,50	18,80	893,00	1,75	
28.02.02	4,01	23,50	94,24	6,55	8,20	53,71	-0,43	
28.02.02	5,15	58,00	298,70	11,00	75,90	834,90	1,80	
28.02.02	3,03	44,30	134,23	8,63	62,80	541,96	3,04	

28.02.02	4,34	21,60	93,74	8,85	36,60	323,91	2,46	
Mittelwerte	13,02	26,05	247,49	25,47	42,11	1018,61	3,57	3,12
SEM	3,78	6,00	69,69	6,49	8,30	299,22	1,50	1,79
	0,29	0,23	0,28	0,25	0,20	0,29	0,42	0,58
t-test						n vs mock		0,0733
t-test								
t-test								

CNTF	Apo-John			Stau-7			$\Delta$ (% x MnX)	
	basal							
	%	MnX	(% x MnX)	%	MnX	(% x MnX)		
23.11.01	55,10	11,10	611,61	48,00	13,80	662,40	0,08	
01.12.01	38,20	5,81	221,94	56,80	9,29	527,67	1,38	
05.01.01	7,62	7,93	60,43	11,90	7,79	92,70	0,53	
05.01.01	9,42	24,30	228,91	11,20	10,30	115,36	-0,50	
05.01.01	8,80	6,25	55,00	11,30	6,63	74,92	0,36	
25.01.01	13,90	9,86	137,05	10,40	10,90	113,36	-0,17	
25.01.01	10,90	15,10	164,59	16,10	10,80	173,88	0,06	
25.01.01	11,00	7,58	83,38	10,20	8,26	84,25	0,01	
Mittelwerte	19,37	10,99	195,36	21,99	9,72	230,57	0,22	0,18
SEM	6,20	2,18	64,07	6,72	0,79	81,24	0,19	0,12
	0,32	0,20	0,33	0,31	0,08	0,35	0,85	0,68
t-test						n vs 31		0,6667
t-test						mock vs 31		0,0605
t-test						B4 vs 31		0,1359

GDNF	Apo-Febr			Stau-7			$\Delta$ (% x MnX)	
	basal							
	%	MnX	(% x MnX)	%	MnX	(% x MnX)		
21.02.02	44,00	20,80	915,20	23,40	34,20	800,28	-0,13	
21.02.02	52,70	40,90	2155,43	39,50	35,60	1406,20	-0,35	
21.02.02	49,90	18,60	928,14	45,80	44,30	2028,94	1,19	
21.02.02	34,80	18,80	654,24	38,20	23,40	893,88	0,37	
28.02.02	8,32	43,50	361,92	26,10	83,00	2166,30	4,99	
28.02.02	8,34	44,40	370,30	7,40	59,10	437,34	0,18	
28.02.02	11,90	36,70	436,73	20,00	82,00	1640,00	2,76	
28.02.02	6,62	30,30	200,59	10,40	49,20	511,68	1,55	
Mittelwerte	27,07	31,75	752,82	26,35	51,35	1235,58	1,32	0,64
SEM	7,17	3,94	221,12	4,92	7,77	237,39	0,64	0,31
	0,26	0,12	0,29	0,19	0,15	0,19	0,48	0,49
t-test						n vs B4		0,2256
t-test						mock vs B4		0,1979
t-test								

t-test	nativ	mock	CNTF	GDNF
33 C vs 39 C	<b>0,0364</b>	0,3050	0,8032	0,9632

## Sequenz des Intron 1 von Ratten-Wnt-5a

```

10      20      30      40      50      60      70      80
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GGAGTGGCTT TGGGACCCG TGGAGGTGCC ATGTCTTCCA AGTTCTTCCT AATGGCTTTG GCCACATTTT TCTCCTTCGC 80

      90      100     110     120     130     140     150     160
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CCAGGTTGTA ATAGAAGCTA ATTCTTGGTG GTAAGTTGGT TCCGTGTGCC TACTCTTCCT TTGCACTGTG GTATAGCGTT 160

      170     180     190     200     210     220     230     240
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GGAAGCTGGA AAGCGAGCAT GGGTACACTC ATTTAATATA GGTGGGTATA TGTTCTATGG GCTTTTAAAA TTTGAATCT 240

      250     260     270     280     290     300     310     320
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CTTGTAACCC GCTCGTTTGG TAAATCATAC ACTCAGTTC ACAGGGAAC CCGAATATAT AAATCTCAGC CTCTTCTTT 320

      330     340     350     360     370     380     390     400
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
CTATGAGGCC CTTGTTGAGA CTGGGCTTG CAGGAACAAC GTGFACTGAG AGGGAATAC TCTTCTTAA TAATCTAAG 400

      410     420     430     440     450     460     470     480
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TCTGTCAATA CAGTTTACTC TTGCCACCAC CCCCCCAG GTAAAATAAA GATGAATTC CTTTTATT TTCTGTCGCT 480

      490     500     510     520     530     540     550     560
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TGAGATTATT AACCCACAGT ATCTGAAGCA ACAGAGTCTT AGAAGACATC TAACCCCAA ATAGAGAGTA TTTGCACCTG 560

      570     580     590     600     610     620     630     640
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AAATTTGATC AAAAGGAGGT GAACTTGAAA TAGCAAAAG TTCCTAAATG GGGGCTTCTC TCTGGACTTC AGTGCATCTA 640

      650     660     670     680     690     700     710     720
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GGGGATTGTG TGTGGTGGCA GCATTCTAGA TCGTTTCTCC CTGGTAACGG AGTAGCATT TCTTTTCTCT GACTGTCAAA 720

      730     740     750     760     770     780     790     800
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TGTGACTTCT GGTCACTGAA TTTCTAGCT TGGATCCTTC ACATTCACCTG AAGAATCCCC TTTAATGCAT CTGAAAACAT 800

      810     820     830     840     850     860     870     880
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
GGGACTTTT CTTCAGTCTG TATAGATATC AGCATCTGTA CTTTCATGCC TTCGAGGTA TTGCTATCTT CCACCTAATT 880

      890     900     910     920     930     940     950     960
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TTCCCTACTT TTGATATTCC TGAGTTTCC GAGGAGGATC CATCTACTGT GTAGGCCTGG AGTCATTTTCT TCTAAAGCTA 960

      970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TGTCTGGTCT ctgaaaATCT CCACTTTCCC CTCTTTCCCA GTGAATCTCA GAAATACTGG ATCAGGTATG TGGTGATTGC 1040

      1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AGAAGAAGGC AATGAAAACA CTGACTGAGG GAGCCAGATG GCTGGGTGGG GACAGCACAA TACCTCTGTT TTCTGCAGTT 1120

      1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
TAAACAGAGG AGTTCTATGA AGCCCTCCTC ATACTTTGTC ATGCGGACAA ACAGGAGAGA AAAGGCATCT GTTTGCTTCA 1200

      1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
AGCCTTGATG GGCTGACATG CTTTCGGGGA GGAGGGAGCT ACCTCTGGAG TTCACGTAAA TCTTGAATGA ACATCTCCCC 1280

      1290    1300    1310    1320    1330    1340    1350
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| .
CTCCCTTTG CAGTCCCTA GGTATGAATA ACCCTGTTCA GATGTCAGAA GTATACATCA TAGGAGCACA G 1351

```

## *Anhang C Literatur*

1. Ackermann EJ, Taylor JK, Narayana R, Bennett CF The role of antiapoptotic Bcl-2 family members in endothelial apoptosis elucidated with antisense oligonucleotides. *J.Biol.Chem.* 1999. 274: 11245-11252.
2. Adamus G, Sugden B, Shiraga S, Timmers AM , Hauswirth WW Anti-apoptotic effects of CNTF gene transfer on photoreceptor degeneration in experimental antibody-induced retinopathy. *J.Autoimmun.*2003. 21: 121-129.
3. Ahumada A, Slusarski DC, Liu X, Moon RT, Malbon CC, Wang HY Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. *Science* 2002. 298: 2006-2010.
4. Airaksinen MS, Saarma M The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat.Rev.Neurosci.* 2002. 3: 383-394.
5. Akerud P, Alberch J, Eketjall S, Wagner J , Arenas E Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult substantia nigra dopaminergic neurons. *J.Neurochem.* 1999. 73: 70-78.
6. Andreeff, M., Goodrich, D., and Pardee A. Cell Proliferation, Differentiation and Apoptosis. 2000. 20 Hughson Street South,P.O. Box 620, L.C.D. 1,Hamilton, Ontario L8N 3K7, B.C. Decker Inc. Cancer Medicine, 5th edition. Bast R., Kufe D., Pollock R., Weichselbaum R., Holland J., Frei E., and Gansler T. (Monographie)
7. Barresi V, Belluardo N, Sipione S, Mudo G , Cattaneo E, Condorelli DF Transplantation of prodrug-converting neural progenitor cells for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther.*2003. 10: 396-402.
8. Beal MF Experimental models of Parkinson's disease. *Nat.Rev.Neurosci.*2001. 2: 325-334.
9. Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simburger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J.*2005. 19: 647-649.
10. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, Jiang Y, Seftor E, Hendrix M, Radmacher M, Simon R, Yakhini Z, Ben-Dor A, Sampas N , Dougherty E, Wang E, Marincola F, Gooden C, Lueders J, Glatfelter A, Pollock P, Carpten J, Gillanders E, Leja D, Dietrich K, Beaudry C, Berens M, Alberts D, Sondak V Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000. 406: 536-540.

11. Blanc E, Goldschneider D, Douc-Rasy S, Benard J, Raguenez G Wnt-5a gene expression in malignant human neuroblasts. *Cancer Lett.*2005. 228: 117-123. a
12. Blanc E, Roux GL, Benard J, Raguenez G Low expression of Wnt-5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. *Oncogene.* 2005. 24: 1277-1283. b
13. Blits B, Dijkhuizen PA, Hermens WT, Van Esseveldt LK, Boer GJ, Verhaagen J The use of adenoviral vectors and ex vivo transduced neurotransplants: towards promotion of neuroregeneration. *Cell Transplant.* 2000. 9: 169-178.
14. Boer GJ Ethical guidelines for the use of human embryonic or fetal tissue for experimental and clinical neurotransplantation and research. Network of European CNS Transplantation and Restoration (NECTAR). *J.Neurol.* 1994. 242: 1-13.
15. Bohn MC A commentary on glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). From a glial secreted molecule to gene therapy. *Biochem.Pharmacol.* 1999. 57:135-142.
16. Bosch M, Pineda JR, Sunol C, Petriz J, Cattaneo E, Alberch J, Canals JM Induction of GABAergic phenotype in a neural stem cell line for transplantation in an excitotoxic model of Huntington's disease. *Exp.Neurol.* 2004. 190: 42-58.
17. Bottcher T, Mix E, Koczan D, Bauer P, Pahnke J, Peters S, Weinelt S, Knoblich R, Strauss U, Cattaneo E, Thiesen HJ, Rolfs A Gene expression profiling of ciliary neurotrophic factor-overexpressing rat striatal progenitor cells (ST14A) indicates improved stress response during the early stage of differentiation. *J.Neurosci.Res.* 2003. 73: 42-53.
18. Brundin P, Pogarell O, Hagell P, Piccini P, Widner H, Schrag A, Kupsch A, Crabb L, Odin P, Gustavii B, Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD , Oertel WH, Quinn NP, Rehncrona S, Lindvall O Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarets in Parkinson's disease. *Brain* 2000. 123: 1380-1390.
19. Bui TD, Tortora G, Ciardiello F, Harris AL Expression of Wnt5a is downregulated by extracellular matrix and mutated c-Ha-ras in the human mammary epithelial cell line MCF-10A. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1997. 239: 911-917.
20. Bui TD, Zhang L, Rees MC, Bicknell R, Harris AL Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *Br.J.Cancer* 1997. 75: 1131-1136.

21. Bunik VI 2-Oxo acid dehydrogenase complexes in redox regulation. *Eur.J.Biochem.* 2003. 270: 1036-1042.
22. Burke RE, Antonelli M, Sulzer D Glial cell line-derived neurotrophic growth factor inhibits apoptotic death of postnatal substantia nigra dopamine neurons in primary culture. *J.Neurochem.* 1998. 71: 517-525.
23. Busse U, Seguin C Isolation of cDNAs for two closely related members of the axolotl Wnt family, Awnt-5A and Awnt-5B, and analysis of their expression during development. *Mech.Dev.* 1993. 40: 63-72.
24. Bussing A, Vervecken W, Wagner M, Wagner B, Pfuller U, Schietzel M Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins. *Cytometry* 1999. 37: 133-139.
25. Cadigan KM, Nusse R Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997. 11: 3286-3305.
26. Castelo-Branco G, Wagner J, Rodriguez FJ, Kele J, Sousa K, Rawal N, Pasolli HA, Fuchs E, Kitajewski J, Arenas E Differential regulation of midbrain dopaminergic neuron development by Wnt-1, Wnt-3a, and Wnt-5a. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*2003. 100: 12747-12752.
27. Catala M [Control of the development of Onuf's spinal nucleus]. *Prog.Urol.*2002. 12: 340-343.
28. Cattaneo E, Conti L Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J.Neurosci.Res.* 1998. 53: 223-234.
29. Cattaneo E, De Fraja C, Conti L, Reinach B, Bolis L, Govoni S, Liboi E Activation of the JAK/STAT pathway leads to proliferation of ST14A central nervous system progenitor cells. *J.Biol.Chem.* 1996. 271: 23374-23379.
30. Chen X, Liu W, Guoyuan Y, Liu Z, Smith S, Calne DB, Chen S Protective effects of intracerebral adenoviral-mediated GDNF gene transfer in a rat model of Parkinson's disease. *Parkinsonism.Relat.Disord.*2003. 10: 1-7.
31. Chimal-Monroy J, Montero JA, Ganan Y, Macias D, Garcia-Porrero JA, Hurle JM Comparative analysis of the expression and regulation of Wnt5a, Fz4, and Frzb1 during digit formation and in micromass cultures. *Dev.Dyn.*2002. 224: 314-320.

32. Chomczynski P, Sacchi N Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 1987. 162: 156-159.
33. Clark CC, Cohen I, Eichstetter I, Cannizzaro LA, McPherson JD, Wasmuth JJ, Iozzo RV Molecular cloning of the human proto-oncogene Wnt-5A and mapping of the gene (WNT5A) to chromosome 3p14-p21. *Genomics* 1993. 18 : 249-260.
34. Clarkson ED, Zawada WM, Freed CR GDNF reduces apoptosis in dopaminergic neurons in vitro. *Neuroreport.* 1995. 7: 145-149.
35. Clodi K, Kliche KO, Zhao S, Weidner D, Schenk T, Consoli U, Jiang S, Snell V, Andreeff M Cell-surface exposure of phosphatidylserine correlates with the stage of fludarabine-induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia and expression of apoptosis-regulating genes. *Cytometry* 2000. 40: 19-25.
36. Couldwell WT, Hinton DR, Law RE Protein kinase C and growth regulation in malignant gliomas. *Neurosurgery* 1994. 35: 1184-1186.
37. Dealy CN, Roth A, Ferrari D, Brown AM, Kosher RA Wnt-5a and Wnt-7a are expressed in the developing chick limb bud in a manner suggesting roles in pattern formation along the proximodistal and dorsoventral axes. *Mech.Dev.* 1993.43: 175-186.
38. Deep-Brain Stimulation for Parkinson's disease study group Deep-brain stimulation of the subthalamic nucleus or the pars interna of the globus pallidus in Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med.*2001. 345: 956-963.
39. DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS , White BC Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J.Cereb.Blood Flow Metab.*2002. 22: 127-141.
40. Dejmek J, Dejmek A, Saffholm A, Sjolander A, Andersson T Wnt-5a protein expression in primary dukes B colon cancers identifies a subgroup of patients with good prognosis. *Cancer Res.*2005. 65: 9142-9146.
41. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, Tajima N, Yamada H, Sawada H, Ishikawa H, Mimura T, Kitada M, Suzuki Y, Ide C Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J.Clin.Invest.*2004. 113: 1701-1710.
42. Diczfalusy E Contraception and society. *Eur.J.Contracept.Reprod.Health Care* 2002. 7: 199-209.

43. Dinkel RH, Hartmann K, Lebok U [Long-term changes in availability of domestic nursing care based on family structure changes--a model calculation]. *Gesundheitswesen* 1997. 59 Suppl 1: 49-54.
44. Doerflinger RM The ethics of funding embryonic stem cell research: a Catholic viewpoint. *Kennedy.Inst.Ethics.J.* 1999. 9: 137-150.
45. Dunnett SB Repair of the damaged brain. The Alfred Meyer Memorial Lecture 1998. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 1999. 25: 351-362.
46. Dunnett SB, Bjorklund A Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 1999. 399: A32-A39
47. Dunnett SB, Bjorklund A, Lindvall O Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat.Rev.Neurosci.*2001. 2: 365-369.
48. Ehrlich ME, Conti L, Toselli M, Taglietti L, Fiorillo E, Taglietti V, Ivkovic S, Guinea B, Tranberg A, Sipione S, Rigamonti D, Cattaneo E ST14A cells have properties of a medium-size spiny neuron. *Exp.Neurol.*2001. 167: 215-226.
49. Ernfors P Nuclear factor-kappaB to the rescue of cytokine-induced neuronal survival [comment]. *J.Cell Biol.*2000. 148: 223-225.
50. Francis L, Cruz R, Antunez I, Rosillo JC [Behavior characterization of a model of Huntington's disease in rats, induced by quinolinic acid]. *Rev.Neurol.*2000. 30: 1016-1021.
51. Frauwirth KA, Thompson CB Regulation of T lymphocyte metabolism. *J.Immunol.*2004. 172: 4661-4665.
52. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N.Engl.J.Med.*2001. 344: 710-719.
53. Freidin MM Antibody to the extracellular domain of the low affinity NGF receptor stimulates p75(NGFR)-mediated apoptosis in cultured sympathetic neurons. *J.Neurosci.Res.*2001. 64: 331-340.
54. Funkiewiez A, Ardouin C, Caputo E, Krack P, Fraix V, Klinger H, Chabardes S, Foote K, Benabid AL, Pollak P Long term effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation on cognitive function, mood, and behaviour in Parkinson's disease. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 2004. 75: 834-839.

55. Gavin BJ, McMahon JA, McMahon AP Expression of multiple novel Wnt-1/int-1-related genes during fetal and adult mouse development. *Genes Dev.* 1990. 4:2319-2332.
56. Genova ML, Bianchi C, Lenaz G Structural organization of the mitochondrial respiratory chain. *Ital.J.Biochem.*2003. 52: 58-61.
57. Ghribi O, Herman MM, Forbes MS, DeWitt DA, Savory J GDNF protects against aluminum-induced apoptosis in rabbits by upregulating Bcl-2 and Bcl-XL and inhibiting mitochondrial Bax translocation. *Neurobiol.Dis.*2001. 8: 764-773.
58. Ghribi O, Herman MM, Pramoonjago P, Spaulding NK, Savory J GDNF regulates the A beta-induced endoplasmic reticulum stress response in rabbit hippocampus by inhibiting the activation of gadd 153 and the JNK and ERK kinases. *Neurobiol.Dis.*2004. 16: 417-427.
59. Gold R, Schmied M, Giegerich G, Breitschopf H, Hartung HP, Toyka KV, Lassmann H Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques [see comments]. *Lab.Invest.* 1994. 71: 219-225.
60. Gordon MD, Nusse R Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J.Biol.Chem.*2006. 281: 22429-22433.
61. Hagell P, Schrag A, Piccini P, Jahanshahi M, Brown R, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Odin P, Wenning GK, Morrish P, Gustavii B , Bjorklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain* 1999. 122: 1121-1132.
62. Hall AC, Lucas FR, Salinas PC Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling [see comments]. *Cell* 2000. 100: 525-535.
63. Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M , Gauger L, Kordower JH, Olanow CW Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch.Neurol.* 1999. 56: 179-187.
64. Hermann DM, Kilic E, Kugler S, Isenmann S, Bahr M Adenovirus-mediated GDNF and CNTF pretreatment protects against striatal injury following transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurobiol.Dis.*2001. 8: 655-666.

65. Herr I, Debatin KM Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001. 98: 2603-2614.
66. Hipper A, Isenberg G Cyclic mechanical strain decreases the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.*2000. 440: 19-27.
67. Hirata Y, Kiuchi K Mitogenic effect of glial cell line-derived neurotrophic factor is dependent on the activation of p70S6 kinase, but independent of the activation of ERK and up-regulation of Ret in SH-SY5Y cells. *Brain Res.*2003. 983: 1-12.
68. Huelsken J, Birchmeier W New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr.Opin.Genet.Dev.*2001. 11: 547-553.
69. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, Shibuya H, Moon RT, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol.Cell Biol.*2003. 23: 131-139.
70. Jaster R, Bittorf T, Brock J Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in the mediation of erythropoietin-induced activation of p70S6k. *Cell Signal.* 1997. 9: 175-179.
71. Johnson RM, McNeeley PA, DeMoor K, Stewart GR, Glaeser BS, Pitchford S Recombinant human ciliary neurotrophic factor stimulates the metabolic activity of SH-SY5Y cells as measured by a cytosensor microphysiometer. *Brain Res.* 1994. 646: 327-331.
72. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J.Immunol.Methods* 1993. 159: 197-207.
73. Karim R, Tse G, Putti T, Scolyer R, Lee S The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology.*2004. 36: 120-128.
74. Kasai M, Satoh K, Akiyama T Wnt signaling regulates the sequential onset of neurogenesis and gliogenesis via induction of BMPs. *Genes Cells.*2005. 10: 777-783.
75. Khadaroo RG, Kapus A, Powers KA, Cybulsky MI, Marshall JC, Rotstein OD Oxidative stress reprograms lipopolysaccharide signaling via Src kinase-dependent pathway in RAW 264.7 macrophage cell line. *J.Biol.Chem.*2003. 278: 47834-47841.
76. Kitagawa H, Hayashi T, Mitsumoto Y, Koga N, Itoyama Y, Abe K Reduction of ischemic brain injury by topical application of glial cell line-derived neurotrophic factor after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 1998. 29: 1417-1422.

77. Kordower JH, Isacson O, Emerich DF Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? *Exp.Neurol.* 1999. 159: 4-20.
78. Kuhl M The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front.Biosci.*2004. 9: 967-74.
79. Kuhl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J.Biol.Chem.*2000. 275: 12701-12711.
80. Lange C, Mix E, Rateitschak K, Rolfs A Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation. *Neurodegener.Dis.*2006. 3: 76-86.
81. Lecoeur H, Prevost MC, Gougeon ML Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. *Cytometry* 2001. 44: 65-72.
82. Lee VM, Smiley GG, Nishi R Cell death and neuronal replacement during formation of the avian ciliary ganglion. *Dev.Biol.*2001. 233: 437-448.
83. Lejeune S, Huguet EL, Hamby A, Poulson R, Harris AL Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin.Cancer Res.* 1995. 1: 215-222.
84. Leris AC, Roberts TR, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K WNT5A expression in human breast cancer. *Anticancer Res.*2005. 25: 731-734.
85. Lesch KP Gene transfer to the brain: emerging therapeutic strategy in psychiatry? *Biol.Psychiatry* 1999. 45: 247-253.
86. Levesque M and Neumann T. Autologous transplantation of adult human neural stem cells and differentiated dopaminergic neurons for Parkinson's disease: 1-year postoperative clinical and functional metabolic result. American Association of Neurological Surgeons Annual Meeting. 8-4-2002.
87. Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R, Jones SN Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* 2003. 4: 349-360.
88. Lickert H, Kispert A, Kutsch S, Kemler R Expression patterns of Wnt genes in mouse gut development. *Mech.Dev.*2001. 105: 181-184.

89. Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Desire L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*.2005. 437: 1370-1375.
90. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [see comments]. *Science* 1993. 260: 1130-1132.
91. Lindvall O, Bjorklund A Cell replacement therapy: helping the brain to repair itself. *NeuroRx*.2004. 1:379-381. a
92. Lindvall O, Bjorklund A Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx*.2004. 1: 382-393. b
93. Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat.Med*.2002. 8: 620-624.
94. Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, White RL, Matsunami N Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol.Cell* 2001. 7: 927-936.
95. Lundberg C, Martinez-Serrano A, Cattaneo E, McKay RD, Bjorklund A Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp.Neurol*. 1997. 145: 342-360.
96. Macklin R Ethics, politics, and human embryo stem cell research. *Womens.Health Issues*. 2000. 10: 111-115.
97. Mak W, Ho SL The impact of molecular biology on clinical neurology. *Hong.Kong.Med.J*.2001. 7: 40-49.
98. Marjama-Lyons JM, Koller WC Parkinson's disease. Update in diagnosis and symptom management. *Geriatrics*.2001. 56: 24-30, 33.
99. Martino G, Pluchino S The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat.Rev.Neurosci*.2006. 7: 395-406.
100. Mazurova Y New therapeutic approaches for the treatment of Huntington's disease. *Acta Medica.(Hradec.Kralove.)* 2001. 44: 119-123.

101. McCord JM Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N.Engl.J.Med.* 1985. 312: 159-163.
102. McMahon AP, Bradley A The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 1990. 62: 1073-1085.
103. Melino G [Intracellular uptake and accumulation of metaiodobenzylguanidine in neuroblastoma cells and small cell carcinoma of the lung]. *Minerva.Pediatr.* 1989. 41: 123-128.
104. Mendez I, Dagher A, Hong M, Hebb A, Gaudet P, Law A, Weerasinghe S, King D, Desrosiers J, Darvesh S, Acorn T, Robertson H Enhancement of survival of stored dopaminergic cells and promotion of graft survival by exposure of human fetal nigral tissue to glial cell line--derived neurotrophic factor in patients with Parkinson's disease. Report of two cases and technical considerations. *J.Neurosurg.*2000. 92: 863-869.
105. Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, Hay RT, Davies AM Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons [see comments]. *J.Cell Biol.*2000. 148: 325-332.
106. Mikels AJ, Nusse R Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS.Biol.*2006. 4: e115
107. Miller JR The Wnts. *Genome Biol.*2002.;3.(1.):REVIEWS
108. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. *Oncogene* 1999. 18: 7860-7872.
109. Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR Prenatal malnutrition and development of the brain . *Neurosci.Biobehav.Rev.* 1993. 17: 91-128.
110. Moskowitz CB, Marder K Palliative care for people with late-stage Huntington's disease. *Neurol.Clin.*2001. 19: 849-865.
111. Naarding P, Kremer HP, Zitman FG Huntington's disease: a review of the literature on prevalence and treatment of neuropsychiatric phenomena. *Eur.Psychiatry* 2001. 16: 439-445.
112. Naumann T, Schnell O, Zhi Q, Kirsch M, Schubert KO, Sendtner M, Hofmann HD Endogenous ciliary neurotrophic factor protects GABAergic, but not cholinergic,

- septohippocampal neurons following fimbria-fornix transection. *Brain Pathol.*2003. 13: 309-321.
113. Nelson WJ, Nusse R Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004. 303: 1483-1487.
114. Ness JK, Wood TL Insulin-like growth factor I, but not neurotrophin-3, sustains Akt activation and provides long-term protection of immature oligodendrocytes from glutamate-mediated apoptosis. *Mol.Cell Neurosci.*2002. 20: 476-488.
115. Nicholson DW, Thornberry NA Apoptosis. Life and death decisions . *Science* 2003. 299: 214-215.
116. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P , Shackleford G, McMahon A, Moon R, Varmus H A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* 1991. 64: 231.
117. Okano H Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application. *Keio.J.Med.*2002. 51: 115-128. a
118. Okano H Stem cell biology of the central nervous system. *J.Neurosci.Res.*2002. 69: 698-707. b
119. Oliveira AL, Risling M, Negro A, Langone F, Cullheim S Apoptosis of spinal interneurons induced by sciatic nerve axotomy in the neonatal rat is counteracted by nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor. *J.Comp.Neurol.*2002. 447: 381-393.
120. Olson DJ, Gibo DM Antisense wnt-5a mimics wnt-1-mediated C57MG mammary epithelial cell transformation. *Exp.Cell Res.* 1998. 241:134-141.
121. Olson DJ, Gibo DM, Saggars G, Debinski W, Kumar R Reversion of uroepithelial cell tumorigenesis by the ectopic expression of human wnt-5a. *Cell Growth Differ.* 1997. 8: 417-423.
122. Oshitari T, Adachi-Usami E The effect of caspase inhibitors and neurotrophic factors on damaged retinal ganglion cells. *Neuroreport.*2003. 14: 289-292.
123. Ostefeld T, Svendsen CN Recent advances in stem cell neurobiology. *Adv.Tech.Stand.Neurosurg.*2003. 28: 3.-89.

124. Osterhout DJ, Marin-Husstege M, Abano P, Casaccia-Bonnel P Molecular mechanisms of enhanced susceptibility to apoptosis in differentiating oligodendrocytes. *J.Neurosci.Res.*2002. 69: 24-29.
125. Pahnke J, Mix E, Knoblich R, Muller J, Zschiesche M, Schubert B, Koczan D, Bauer P, Bottcher T, Thiesen HJ, Lazarov L, Wree A, Rolfs A Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor induces genes regulating migration and differentiation of neuronal progenitor cells. *Exp.Cell Res.*2004. 297: 484-494.
126. Park KI, Ourednik J, Ourednik V, Taylor RM, Aboody KS, Augustine KI, Lachyankar MB, Redmond DE, Snyder EY Global gene and cell replacement strategies via stem cells. *Gene Ther.*2002. 9: 613-624.
127. Parr BA, Shea MJ, Vassileva G, McMahon AP Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development* 1993. 119: 247-261.
128. Paschen W, Frandsen A Endoplasmic reticulum dysfunction--a common denominator for cell injury in acute and degenerative diseases of the brain? *J.Neurochem.*2001. 79: 719-725.
129. Peaire AE, Takeshima T, Johnston JM, Isoe K, Nakashima K, Commissiong JW Production of dopaminergic neurons for cell therapy in the treatment of Parkinson's disease. *J.Neurosci.Methods* 2003. 124: 61-74.
130. Piccini P, Lindvall O, Bjorklund A, Brundin P, Hagell P, Ceravolo R, Oertel W, Quinn N, Samuel M, Rehncrona S, Widner H, Brooks DJ Delayed recovery of movement-related cortical function in Parkinson's disease after striatal dopaminergic grafts. *Ann.Neurol.*2000. 48: 689-695.
131. Pluchino S, Bacigaluppi M, Bucello S, Butti E, Deleidi M, Zanotti L, Martino G, Furlan R Gene and stem cell therapy for autoimmune demyelination. *Ernst.Schering.Res.Found.Workshop.*2005. 53: 133.-46.
132. Pluchino S, Martino G The therapeutic use of stem cells for myelin repair in autoimmune demyelinating disorders. *J.Neurol.Sci.*2005. 233: 117-119.
133. Polakis P Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.*2000. 14: 1837-1851.
134. Pozniak CD, Pleasure SJ A tale of two signals: Wnt and Hedgehog in dentate neurogenesis. *Sci.STKE.*2006. 319: 5.

135. Prentice DA Adult stem cells. *Issues.Law.Med.*2004. 19: 265-294.
136. Prieto A, Diaz D, Barcenilla H, Garcia-Suarez J, Reyes E, Monserrat J, San Antonio E, Melero D, de la Hera A, Orfao A, Alvarez-Mon M Apoptotic rate: a new indicator for the quantification of the incidence of apoptosis in cell cultures. *Cytometry* 2002. 48: 185-193.
137. Rawal N, Castelo-Branco G, Sousa KM, Kele J, Kobayashi K, Okano H, Arenas E Dynamic temporal and cell type-specific expression of Wnt signaling components in the developing midbrain. *Exp.Cell Res.*2006. 312: 1626-1636.
138. Reddy S, Andl T, Bagasra A, Lu MM, Epstein DJ, Morrisey EE, Millar SE Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mech.Dev.*2001. 107: 69-82.
139. Ricken A, Lochhead P, Kontogianna M, Farookhi R Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology* 2002. 143: 2741-2749.
140. Riemschneider Stephan, Galgon Tino, Podhaisky Hans-Peter, and Wohlrab Wolfgang A. Floezytometrische Methoden zur Bewertung von Apoptose. *BIOforum* 1-2/2001, 46-48.
141. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 1987. 50: 649-657.
142. Rodriguez M, Barroso-Chinea P, Abdala P, Obeso J, Gonzalez-Hernandez T Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hydroxydopamine in the rat: similarities with cell loss in parkinson's disease. *Exp.Neurol.*2001. 169: 163-181.
143. Roelink H, Nusse R Expression of two members of the Wnt family during mouse development--restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes Dev.* 1991. 5: 381-388.
144. Roelink H, Wagenaar E, Lopes dS, Nusse R Wnt-3, a gene activated by proviral insertion in mouse mammary tumors, is homologous to int-1/Wnt-1 and is normally expressed in mouse embryos and adult brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1990. 87: 4519-4523.

145. Rossi F, Cattaneo E Opinion: neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat.Rev.Neurosci.*2002. 3: 401-409.
146. Sacks J Ethical issues at the start of life. *Clin.Med.*2001. 1: 401-406.
147. Salehi AH, Xanthoudakis S, Barker PA NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J.Biol.Chem.*2002. 277: 48043-48050.
148. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1977. 74: 5463-5467.
149. Sariola H, Saarma M Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J.Cell Sci.*2003. 116: 3855-3862.
150. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.*2001. 2: 20-29.
151. Savory J, Herman MM, Ghribi O Intracellular mechanisms underlying aluminum-induced apoptosis in rabbit brain. *J.Inorg.Biochem.*2003. 97: 151-154.
152. Schulte G, Bryja V, Rawal N, Castelo-Branco G, Sousa KM, Arenas E Purified Wnt-5a increases differentiation of midbrain dopaminergic cells and dishevelled phosphorylation. *J.Neurochem.*2005. 92: 1550-1553.
153. Schuurin E, van Deemter L, Roelink H, Nusse R Transient expression of the proto-oncogene int-1 during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Mol.Cell Biol.* 1989. 9: 1357-1361.
154. Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr.Biol.* 1999. 9: 695-698.
155. Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kuhl M, Moon RT Dishevelled activates Ca<sup>2+</sup> flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J.Cell Biol.*2003. 161: 769-777.
156. Sherman MY, Goldberg AL Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 2001. 29: 15-32.
157. Siderowf A Parkinson's disease: clinical features, epidemiology and genetics. *Neurol.Clin.*2001. 19: 565-78.

158. Sieradzan KA, Mann DM The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.*2001. 27: 1-21.
159. Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm.Acta Helv.*2000. 74: 265-272.
160. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 1997. 390: 410-413.
161. Slusarski DC, Yang-Snyder J, Busa WB, Moon RT Modulation of embryonic intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling by Wnt-5A. *Dev.Biol.* 1997. 182: 114-120.
162. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD , Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 1985. 150: 76-85.
163. Storch A, Lester HA, Boehm BO, Schwarz J Functional characterization of dopaminergic neurons derived from rodent mesencephalic progenitor cells. *J.Chem.Neuroanat.*2003. 26: 133-142.
164. Sun B, Hui GZ, Guo LH, Reiser J Dopaminergic Trophism after Intrastratial Injection of Lentivirus-transferred GDNF in Parkinson Rat Model. *Sheng.Wu.Hua.Xue.Yu.Sheng.Wu.Wu.Li.Xue.Bao.(Shanghai.)* 2003. 35: 937-940.
165. Takahashi M The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine.Growth Factor.Rev.*2001. 12: 361-373.
166. Taki M, Kamata N, Yokoyama K, Fujimoto R, Tsutsumi S, Nagayama M Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells. *Cancer Sci.*2003. 94: 593-597.
167. Toledo-Aral JJ, Mendez-Ferrer S, Pardal R, Echevarria M, Lopez-Barneo J Trophic restoration of the nigrostriatal dopaminergic pathway in long-term carotid body-grafted parkinsonian rats. *J.Neurosci.*2003. 23: 141-148.
168. Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J.Cell Biol.*2003. 162: 899-908.

169. Torchiana E, Lulli L, Cattaneo E, Invernizzi F, Orefice R, Bertagnolio B, Di Donato S, Finocchiaro G Retroviral-mediated transfer of the galactocerebrosidase gene in neural progenitor cells. *Neuroreport*. 1998. 9: 3823-3827.
170. Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL, Moon RT Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J.Cell Biol.* 1996. 133: 1123-1137.
171. Tulac S, Nayak NR, Kao LC, Van Waes M, Huang J, Lobo S, Germeyer A, Lessey BA, Taylor RN, Suchanek E, Giudice LC Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*2003. 88: 3860-3866.
172. Vaux DL, Strasser A The molecular biology of apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996. 93: 2239-2244.
173. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev.Cell* 2003. 5: 367-377.
174. Verkhatsky A, Toescu EC Endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis and neuronal death. *J.Cell Mol.Med.*2003. 7: 351-361.
175. Vogelstein B, Gillespie D Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1979. 76:615-619.
176. Volkmann J, Allert N, Voges J, Sturm V, Schnitzler A, Freund HJ Long-term results of bilateral pallidal stimulation in Parkinson's disease. *Ann.Neurol.*2004. 55: 871-875.
177. Walden DL, McCutchan HJ, Enquist EG, Schwappach JR, Shanley PF, Reiss OK, Terada LS, Leff JA, Repine JE Neutrophils accumulate and contribute to skeletal muscle dysfunction after ischemia-reperfusion. *Am.J.Physiol.* 1990. 259: H1809-H1812
178. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin ASJ NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 1998. 281: 1680-1683.
179. Wang Y, Lin SZ, Chiou AL, Williams LR , Hoffer BJ Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex. *J.Neurosci.* 1997. 17: 4341-4348.

180. Watanabe M, Fukuda Y Survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells in adult cats. *Prog.Retin.Eye Res.*2002. 21: 529-553.
181. Weidinger G, Moon RT When Wnts antagonize Wnts. *J.Cell Biol.*2003. 162: 753-755.
182. Weinelt S, Peters S, Bauer P, Mix E, Haas SJ, Dittmann A, Wree A, Cattaneo E, Knoblich R, Strauss U, Rolfs A Ciliary neurotrophic factor overexpression in neural progenitor cells (ST14A) increases proliferation, metabolic activity, and resistance to stress during differentiation. *J.Neurosci.Res.*2003. 71: 228-236.
183. Weinreich, K Differenzierung der neuronalen Stammzelllinie ST14A *in vitro*: eine immunzytologische und quantitative Studie. Dissertation, Universität Rostock, 2004.
184. Westfall TA, Brimeyer R, Twedt J, Gladon J, Olberding A, Furutani-Seiki M, Slusarski DC Wnt-5/pipetail functions in vertebrate axis formation as a negative regulator of Wnt/beta-catenin activity. *J.Cell Biol.*2003. 162:889-898.
185. Widner H, Tetrud J, Rehncrona S, Snow B , Brundin P, Gustavii B, Bjorklund A, Lindvall O, Langston JW Bilateral fetal mesencephalic grafting in two patients with parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *N.Engl.J.Med.* 1992. 327: 1556-1563.
186. Witt K, Pulkowski U, Herzog J, Lorenz D , Hamel W, Deuschl G, Krack P Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus improves cognitive flexibility but impairs response inhibition in Parkinson disease. *Arch.Neurol.*2004. 61: 697-700.
187. Wittstock M, Rehfeldt C, Mix E, Zettl UK Comparison of three different proliferation assays for mouse myoblast cultures. *Anal.Biochem.*2001. 292: 166-169.
188. Wodarz A, Nusse R Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 1998. 14: 59-88.
189. Wu W, Li L, Yick LW, Chai H, Xie Y, Yang Y, Pevette DM, Oppenheim RW GDNF and BDNF alter the expression of neuronal NOS, c-Jun, and p75 and prevent motoneuron death following spinal root avulsion in adult rats. *J.Neurotrauma.*2003. 20: 603-612.
190. Zager EL, Black PM Neural transplantation. *Surg.Neurol.* 1988. 29: 350-366.
191. Zheng H, He C, Zhou S, Li Z, Chen S, Zhang S, Huang Y, Lu C, Yan J [The neuroattract growth effect of ciliary neurotrophic factor on recurrent laryngeal nerve regeneration]. *Zhonghua.Er.Bi.Yan.Hou.Ke.Za.Zhi.*2002. 37: 333-337.

192. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR The machinery of programmed cell death. *Pharmacol.Ther.*2001. 92: 57-70.
193. Zimmermann KC, Green DR How cells die: apoptosis pathways. *J.Allergy Clin.Immunol.*2001. 108: 99-103.

## ***Danksagung***

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2000 bis Juli 2007 im Neurobiologischen Labor der Klinik für Neurologie der Universität Rostock im Rahmen Forschungsschwerpunktes „Organisation, Degeneration und Reorganisation des Zentralnervensystems“ unter der Leitung von Prof. Dr. Arndt Rolfs, Klinik für Neurologie, und Prof Dr. Andreas Wree, Institut für Anatomie.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Arndt Rolfs, leitender Oberarzt der Klinik für Neurologie des Zentrums für Nervenheilkunde der Universität Rostock, der nicht nur in großzügiger Weise hervorragende Arbeitsbedingungen in Klinik und Forschung geschaffen hat, sondern dessen umfassendes Wissenschaftsverständnis in vielen intensiven Diskussionen meine Arbeit stimuliert, inspiriert und kritisch begleitet hat.

Herrn Dr. Eilhard Mix danke ich als brillanten Wissenschaftler und großartigen Mentor für seine richtungsweisende Rolle bei der Betreuung meiner Promotionsarbeit und das Vertrauen, welches er in mich als Doktorandin in seiner Arbeitsgruppe gesetzt hatte, und der mir eine fundierte wissenschaftliche Ausbildung ermöglichte und in vielerlei Hinsicht Denk- und Handlungsprinzipien wissenschaftlicher Tätigkeit eindrucksvoll näher gebracht hat.

Den Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Anatomie, allen voran Herrn Prof. Dr. Andreas Wree, und des Instituts für Biochemie, insbesondere Herrn Prof. Dr. Robert Jaster, gebührt besonderer Dank für die freundschaftliche Zusammenarbeit, Weitergabe ihrer wertvollen Erfahrungen und zahlreichen Diskursen, die mir oft eine wichtige Entscheidungshilfe gewesen sind.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe danke herzlich ich für ihren großen persönlichen Einsatz, Teamgeist und hohe Motivation, womit sie in einer sehr kollegialen Atmosphäre die wissenschaftliche Leistung voranbringen.

Der Abteilung Radiologische Diagnostik der Klinik für Radiologie danke ich für wissenschaftliche Teamarbeit und die freundliche und unkomplizierte Bereitstellung von Röntgenfilmentwicklungsautomaten und -Materialien, ohne die viele Aspekte dieser Arbeit nicht hätten untersucht werden können.

Der Stiftung Steinbeis Technologietransfer danke ich für ihre großzügige Unterstützung des Forschungsprojektes und für die Drittmittelfinanzierung meiner Stelle.

Großer Dank gebührt natürlich meiner Familie, die den bisherigen Weg ermöglichte und die mir immer unterstützend und hilfreich zur Seite stand.

## ***Erklärung***

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit vorher weder in der medizinischen Fakultät der Universität Rostock noch in einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig verfaßt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Neustrelitz, Juli, 2007.

Sabine Fürstenberg.