

**Aus dem Institut für Anatomie
der Universität Rostock
Direktor: Professor Dr. med. Andreas Wree**

**CNTF-Expression
in Tiermodellen für Chorea Huntington**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Ahrens, Aline
aus Rostock, Mecklenburg-Vorpommern

Rostock, 2008
Dekan: Professor Dr. Emil Christian Reisinger

urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0093-6

Dekan: Prof. Dr. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Wree, Institut für Anatomie der Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Benecke, Klinik und Poliklinik für Neurologie der
Universität Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. med. K. Endlich, Institut für Anatomie und Zellbiologie der
Universität Greifswald

Tag der Promotion: 20.05.2009

Meiner Familie

*Das erste, was der Mensch im Leben vorfindet,
das letzte, wonach er die Hand ausstreckt,
das kostbarste, was er im Leben besitzt,
ist die Familie.*

Adolph Kolping (1813-1865), dt. Theologe

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Chorea Huntington	8
1.1.2 Klinik	8
1.1.2 Neuropathologie	10
1.1.3 Therapeutische Möglichkeiten	12
1.2 Exzitotoxische Tiermodelle der Chorea Huntington	13
1.3 CNTF	14
1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Tiere und Tierhaltung	17
2.2 Exzitotoxische Läsionen und Kontrollläsionen	17
2.3 Kontrolle erfolgreicher Läsionen	18
2.4. Gehirnproben	19
2.4.1 Perfusion und Entnahme der Gehirne	19
2.4.2 Histologische Färbungen	19
2.4.3 Immunhistochemie	21
2.4.4 Analyse und Dokumentation der Gewebeschnitte	22
2.5 Untersuchung von CNTF-Proteinlysaten	23
2.5.1 Western Blot	23
2.5.2 Quantifikation der Western Blot Banden	25
2.6 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	26
2.6.1 Nachgewiesene Proteine und deren Antikörper	26
2.6.1.1 β -Aktin	26
2.6.1.2 CNTF	27
2.6.1.3 GFAP	28
2.6.1.4 NeuN	29

3. Ergebnisse	34
3.1 Ergebnisse der Apomorphin-induzierten Rotationen	34
3.2 Morphologische Veränderungen im Quinolinsäure-läsioniertem CPu	38
3.3 CNTF-Expression im Quinolinsäure-läsioniertem CPu	41
3.4 Messungen des CNTF-Proteingehalts	42
3.5 GFAP-Immunreaktivität der läsionierten Gehirne	44
3.6 Neuronale Degeneration im Läsionsgebiet	44
4. Diskussion	45
4.1 Kritische Auseinandersetzung mit dem Tiermodell	45
4.2 Expression von CNTF	48
4.3 Klinische Studien mit CNTF	52
4.4 Schlussfolgerung	54
Literaturverzeichnis	56
Anhang	79
Thesen	80
Erklärung	81
Lebenslauf	82
Publikationen	83
Danksagung	84

Abkürzungsverzeichnis

a/bFGF	acidic/basic fibroblast growth factor
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BSA	bovine serum albumine
CNTF	ciliary neurotrophic factor
Cplx2	Complexin 2
CPu	Caudatus-Putamen
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
dpi	dots per inch
DRPLA	dentato-rubro-pallido-luisyan atrophy
Enk	Enkephalin
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
g	Gramm
GAP	growth-associated protein
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
IL-1	Interleukin 1
kb	Kilobit
l	Liter
LGE	lateral ganglionic eminence
LIF	leukemia inhibitor factor
MAP2	microtubule-associated protein 2
MSN	medium spiny neuron
NCAM	neural cell adhesion molecul
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NT	Neurotrophin
PBS	Phosphatpufferlösung
PFA	Paraformaldehyd

PNS	peripheres Nervensystem
PPN	Nucleus pedunculopontinus
QA	Quinolinsäure
SBMA	spinobulbär-muskulöse Atrophie
SNC	Substantia nigra pars compacta
Sub P	Substanz P
TRIS	Puffersubstanz (TRIS-hydroxymethylaminomethan)
ZNS	zentrales Nervensystem

Antikörper

CNTF	ciliary neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
NeuN	neuron-specific nuclear protein
Cy ²	Cyanin-Farbstoff 2 (Amersham International)

1. Einleitung

1.1 Chorea Huntington

1.1.1 Klinik

Chorea Huntington, zum ersten Mal 1872 von Georg Huntington beschrieben (Purdon et al., 1994), ist eine genetische, autosomal dominante neurodegenerative Erkrankung, die nicht nur ausschließlich mit motorischen Störungen einhergeht, sondern auch durch kognitive und psychiatrische Dysfunktionen geprägt ist (Reiner et al., 1988). Erste klinische Symptome treten überwiegend zwischen dem 35. und 50. Lebensjahr auf. Bei einem möglichen früheren Beginn wird sie als juvenile Form bezeichnet. Die Lebenserwartung beträgt 10 bis 20 Jahre (im Durchschnitt 17 Jahre) nach Erstmanifestation, wobei der Tod durch sekundäre Komplikationen eintritt (Bird und Coyle, 1986; Bachoud-Lévi et al., 2000). In den westlichen Ländern hat Chorea Huntington eine Prävalenz von 3/10000. Von diesen 3 Fällen weist eine klinische Symptome auf. Die anderen zwei hingegen sind Genträger, die diese Erkrankung mit 100%iger Wahrscheinlichkeit im Laufe der Zeit entwickeln werden (Huntington Study Group, 1993).

Charakteristischer Weise geht Chorea Huntington mit Störungen in der unwillkürlichen und willkürlichen Motorik einher, die sich progradient entwickeln. Besonders die oberen Extremitäten zeigen krankheitsspezifische unwillkürliche Bewegungen wie Choroathetose, die zwischen plötzlich einschießenden häufig asymmetrischen und langsamen, bizarr geschraubten Bewegungen abwechseln. Des Weiteren sind choroathetotische Störungen in den Mund-Wangen-Gesichtsregionen vorhanden, welche das Sprechen, Kauen und Schlucken beeinflussen (Darely et al., 1975; Podoll et al., 1988, Folstein, 1989). Die krankhafte Willkürmotorik beinhaltet Bradikinesien, wie zum Beispiel verlangsamte Initialbewegungen und das Ausführen von schwach koordinierten Bewegungen. Störungen der Willkürmotorik treten besonders in Erscheinung in Form von Gangunterbrechungen, zudem bei Greifbewegungen und manuellen Fertigkeiten (Girotti et al., 1988). Eine verminderte Fähigkeit, Gegenstände visuell zu verfolgen und ein gelegentlicher Nystagmus weisen auf Störungen der okulomotorischen Funktion hin (Leigh et al., 1983). Zusätzlich kann eine verminderte visuelle Wahrnehmungsfähigkeit als Frühsymptom auftreten (Butters et al., 1978; Moses et al., 1981).

Psychiatrische Störungen sind häufig und können auch vor den charakteristischen motorischen Beeinträchtigungen auftreten (Folstein, 1983; Schoenfeld et al., 1984; Webb und Trzepacz, 1987). Affektive Störungen sind bei Chorea Huntington die häufigsten psychiatrischen Störungen, mit dem Auftreten von Depressionen in einer Häufigkeit von 50% (Heathfield, 1967) sowie Manie und Hypomanie mit einer Häufigkeit von 12% (Peyser und Folstein, 1990; Folstein et al., 1983). Die affektive Komponente ist von besonderer Wichtigkeit, wenn man das Risiko eines Suizides, der im Rahmen dieser Erkrankung mit einer Häufigkeit von 7% auftritt, zu Grunde legt (Reed et al., 1958). Psychiatrische Symptome, wie Apathie, Reizbarkeit und Impulskontrollprobleme, welche mit der mutmaßlichen subkortikalen Demenz assoziiert sind (Cummings und Bensen, 1988), wurden auch im Rahmen der Chorea Huntington Erkrankungen beobachtet (Dewhurst et al., 1969; Burns et al., 1990; McHugh und Folstein, 1975; Caine und Shoulson, 1983).

Kognitive Defizite treten zeitgleich mit den Bewegungsstörungen auf und weisen eine unaufhaltsame Progredienz auf. Innerhalb des ersten Jahres nach Beginn der offensichtlichen motorischen Veränderungen, zeigen die allgemeinen intellektuellen Fähigkeiten neben milden diffusen Störungen vor allem eine Beeinträchtigung neu Erlerntes zu erinnern (Butters et al., 1978; Moses et al., 1981). Des weiteren können leichte Aufmerksamkeitsdefizite, Schwierigkeiten beim Lösen von Problemen und Sprachstörungen beobachtet werden, wobei diese im Vergleich zu anderen Störungen die zeitlich größte Verschlechterungstendenz zeigen (Brandt et al., 1984; Caine et al., 1978; Mayeaux et al., 1986; White et al., 1992).

Innerhalb der ersten Jahre dieser Erkrankung bleiben die expressiven und rezeptiven Sprachfähigkeiten, ausgenommen vom Stimmapparat, meist unverändert oder zeigen nur minimale Veränderungen. Somit sind zum Beispiel Aphasien in den frühen Stadien selten (Butters et al., 1987; Podoll, 1988). Mit dem Fortschreiten der Erkrankung jedoch beginnt die Sprachfähigkeit abzunehmen und kombiniert mit frühen kognitiven Störungen entwickelt sich generell ein intellektueller Zustand der geistigen Retardierung (Norton, 1975; Butters et al., 1978; Josiassen et al., 1982; Brandt et al., 1984).

1.1.2 Neuropathologie

Die neuropathologischen Veränderungen bei Chorea Huntington sind vor allem durch den progressiven Zellverlust und die Atrophie im Nucleus caudatus und Putamen sowie durch den selektiven Untergang von GABA-ergen Projektionsneuronen mit Astrogliose gekennzeichnet (VonSattel und DiFiglia, 1998; de Almeida, 2001; Gutekunst et al., 2002; Rubinsztein, 2003). Die striatalen Medium Spiny Neurons sind hierbei die anfälligsten Zellen. Davon sind die Neuronen, die Enkephalin enthalten und zum externen Globus pallidum projizieren, stärker betroffen als die, die Substanz P enthalten und zum internen Globus pallidus projizieren (Gutekunst et al., 2002; Rubinsztein, 2003). In der späten Phase der Erkrankung verlieren der Nucleus caudatus und das Putamen bis zu 90 % ihrer GABA-ergen Golgi TypII Neuronen (Lange et al., 1976). Zu den weiteren Hirnregionen, die betroffen sind, gehören die Substantia nigra, die kortikalen Schichten 3, 5 und 6, die CA1-Region des Hippokampus (Spargo et al., 1993), der Gyrus angularis im Lobus parietalis (MacDonald et al., 1997; MacDonald und Halliday, 2002), die Purkinje-Zellen des Cerebellums (Jeste et al., 1984), die lateralen tuberalen Kerne des Hypothalamus (Kremer et al., 1991; Kremer, 1992) und der zentromediale parafaszikuläre Komplex des Thalamus (Heinsen et al., 1999).

In den frühen Phasen von Chorea Huntington ist es möglich, daß das Gehirn keine nachweisbaren Neurodegenerationen aufweist (Myers, 1991; Mizuno et al., 2000; Gomez-Tortosa et al., 2001). Trotzdem gibt es zahlreiche Beweise für neuronale Dysfunktionen, die auch schon bei asymptomatischen Patienten vorhanden sind. Bei Neuronen des Kortex ist die Immunreakтивität für Nervenfasern, Neurofilamente, Tubulin, und MAP 2 vermindert und die Konzentration von Cpx2 verringert (Modregger et al., 2002; DiProspero et al., 2004). Diese Elemente sind mit der Synapsenfunktion, der Vollständigkeit des Zytoskeletts und dem axonalen Transport assoziiert und haben Bedeutung für kortikale Dysfunktionen der Erkrankung (Walker, 2007).

Das Gen, welches für die Erkrankung verantwortlich ist, wurde auf dem kurzen Arm des Chromosom 4, Lok:p16.3 lokalisiert und verschlüsselt das Protein Huntingtin, welches mehr als 3000 funktionelle Gruppen besitzt (Huntington Study Group, 1993). Exon 1 des wild-type Gens enthält eine polymorphe Strecke von ununterbrochenen CAG-Basentriplettrepeats, die in eine Reihe von aufeinanderfolgenden Glutaminresten (der Polyglutaminkette) übersetzt werden. Asymptomatische Individuen haben 35 oder

weniger CAG-Repeats. Chorea Huntington wird hingegen durch 36 oder mehr Basentriplettrepeats verursacht (Rubinsztein et al., 1996).

Es liegt eine umgekehrte Proportionalität zwischen der Anzahl der CAG-Repeats und dem Alter des Krankheitsbeginns vor (Ambrose et al., 1994; Geschwind et al., 1997; Stevanin et al., 2000; Margolis und Ross, 2001; Piccioni et al., 2001; Bates und Benn, 2002; Bae et al., 2005). Forschungsergebnisse lassen vermuten, daß die Länge der Polyglutaminreste auf die Schwere der Erkrankung hinweisen (Foroud et al., 1999; Squitieri et al., 2002; Mahant et al., 2003). Die meisten Patienten, bei denen die Erkrankung im Erwachsenenalter zum Ausbruch kommt, haben zwischen 40-50 CAG-Basentriplettrepeats. Bei einer Menge von 55 CAG-Repeats besteht sehr häufig die juvenile Form der Erkrankung. Bei etwa 70% der Erkrankungen korreliert das Alter der Erstmanifestation indirekt der Anzahl der Basentriplettrepeats (VonSattel und DiFiglia, 1998; Ho et al., 2001).

Weiterhin sind vor allem bei der juvenilen Form neuronale intranukleäre Einschlüsse in einer Reihe von Hirnregionen zu beobachten. Dazu gehören das Striatum, die Amygdala, Hippocampus, Nucleus ruber und Cerebellum. Diese Einschlüsse bestehen aus Ansammlungen von Polyglutaminen (Emerich und Thanos, 2006).

Die genaue Pathogenese der Chorea Huntington ist bis heute noch nicht bekannt. Eine der vielen Theorien besagt, daß durch das Falten der verlängerten Polyglutaminketten vom mutanten Huntingtin in eine β -Form intranukleäre und zytoplasmatische Einschlüsse gebildet werden (Davies et al., 1997; Hague et al., 2005). Obwohl das auf pathologische Polyglutaminverarbeitung hinweist und es in betroffenen Individuen lange vor dem Auftreten von Symptomen vorhanden ist (Gomez-Tortosa et al., 2001), deuten Beobachtungen darauf hin, daß diese Einschlüsse keine Vorhersage über zelluläre Dysfunktionen oder Krankheitsaktivität machen (Mukai et al., 2005). In einigen transgenen Mausmodellen für Chorea Huntington treten die Einschlüsse erst nach dem Beginn der Symptome auf (Menalled et al., 2003). Die Zellen, die diese Einschlüsse haben, scheinen länger zu überleben (Arrasate et al., 2004) und was die Erscheinung von Einschlüssen in histopathologischen Proben und dem Beginn von neurologischen Symptomen betrifft, ist bis jetzt nur wenig Korrelation zwischen den verschiedenen Zell- und Tiermodellen für diese Veränderung und dem humanen Chorea Huntington gesehen worden (Gomez-Tortosa et al., 2001, Menalled et al., 2003; Arrasate et al., 2004; Kaytor et al., 2004; Van Raamsdonk et al., 2005; Zuccato et al., 2005).

Aronin und Mitarbeiter sowie Davies und Mitarbeiter wiederum haben 1999 Aggregate des mutanten Huntingtin in Gehirnen von Mausmodellen für Chorea Huntington und in striatalen und kortikalen Neuronen von verstorbenen Patienten mit Chorea Huntington gefunden. Der genaue Mechanismus, ob und wie diese Aggregate neuronale Zelluntergänge verursachen, wird noch kontrovers debattiert.

1.1.3 Therapeutische Möglichkeiten

Trotz der Fortschritte in der Forschung in den letzten 20 Jahren hat die medizinische Behandlung von Chorea Huntington kaum Fortschritte gemacht. Die Erkrankung gilt bis heute als nicht heilbar und es gibt zur Zeit für diese Erkrankung auch noch keine befriedigende symptomatische Therapie. Die Überlebensrate von betroffenen Personen in der Lake Maracaibo Region von Venezuela, wo medizinische Technologien nicht erreichbar sind, ähnelt stark dem der Bevölkerung die kompletten Zugang zur medizinischen Versorgung hat (Craufurd und Snowden, 2002). Antichoreatische Medikamente, wie Tetrabenazine (Huntington Study Group, 2006) oder Neuroleptika bieten Patienten mit schwerer Chorea eine Unterbrechung der ständigen unwillkürlichen Bewegungen. Dennoch sollte eine abnehmende Wirkung dieser Arzneien keine Indikation zur Dosiserhöhung sein, da sie Bradikinesien, Rigidität, Depression oder auch Sedation verursachen können. Die affektiven Störungen bei Chorea Huntington sollten gezielt psychiatrisch behandelt werden (Walker, 2007).

Zur Zeit werden Medikamente zur Behandlung der Chorea Huntington, die die Progredienz der Erkrankung verlangsamen sollen, in klinischen Studien getestet. Einige von ihnen haben schon bei Tierversuchen Erfolge gezeigt (Gardian et al., 2005). Eine bemerkenswerte Studie ist mit Coenzym Q10 durchgeführt worden, welches schon in transgenen Tiermodellen für Chorea Huntington Effektivität gezeigt hat und eine mögliche Besserung der Patienten in humanen Studien versprechen könnte (Huntington Study Group, 2001). Man nimmt an, daß diese Substanz die mitochondrialen Funktionen bei Chorea Huntington steigert. Eine klinische Langzeitstudie mit hohen Dosen des Coenzymes Q10 steht kurz vor dem Beginn (Walker, 2007).

1.2 Exzitotoxische Tiermodelle der Chorea Huntington

Grundlagenforschung an Tiermodelle für bestimmte Erkrankungen sind wichtig, um die zugrunde liegenden pathologischen und pathogenetischen Ereignisse sowie die Funktions- und Verhaltensstörungen zu untersuchen. Darüber hinaus ist die Erprobung von Behandlungsstrategien an solchen Modellen vor dem Einsatz am Menschen unabdingbar. Voraussetzung dafür ist aber, daß diese Modelle möglichst genau die pathologischen Mechanismen und die Symptome der menschlichen Erkrankung nachahmen.

Die frühesten Beobachtungen über die Auswirkungen von Exzitotoxizität in der Pathogenese von Chorea Huntington erhielt man von Studien mit Kainat. Diese exzitatorische Aminosäure, die aus Kelp, einer Braunalgenart, gewonnen wurde, ist ein selektiver Agonist des K-Subtypen des Glutamatrezeptors. Intrastriatale Injektionen von Kainat in das Rattenstriatum zerstörten dort alle Neurone, außer den großen Zellen und den Ersatzaxonen mit afferentem Ursprung. Diese biochemischen Veränderungen stimmten auch mit der Pathologie der Chorea Huntington überein (DiFiglia, 1990). Spätere Studien mit Glutamat, dem endogenen Neurotransmitter der kortikostriatalen Verbindung (Fonnum et al., 1981), demonstrierten, daß die Neuronen des Nucleus caudatus effektiv zerstört werden, wenn Kainat langsam dort hinein injiziert wird (McBean and Roberts, 1984). Schwarcz und Mitarbeiter (1983) fanden heraus, daß Quinolinsäure, ein endogener Metabolit des Tryptophans, ähnliche Effekte im Nucleus caudatus hat wie Kainat und Glutamat. Auch die Astrogliareaktion, die durch Ibotensäure (Isaacson et al., 1987), ein Glutamat-Analogon, verursacht wurde, hatte verblüffende Ähnlichkeit mit der Gliose bei Chorea Huntington. Durch diese Studien wurde anfänglich geschlussfolgert, daß Glutamat oder eine andere exzitatorische Aminosäure, die auf einen der Glutamatrezeptor Subtypen wirkt, an der Pathogenese von Chorea Huntington beteiligt ist.

Spätere biochemische Studien mit menschlichem postmortalem Gewebe des Kynureninweges, ein Metabolit beim Abbau von Tryptophan, führte zur Synthese von Quinolinsäure und Kynorensäure. Danach wurde vermutet, daß metabolische Veränderungen in Chorea Huntington zu neuronalen Untergängen durch Exzitotoxizität führen (DiFiglia, 1990). Schwarcz et al. (1988) zeigten, daß 3-Hydroxyanthranilsäure-Oxidase, das Synthaseenzym der Quinolinsäure, sowohl im Striatum bei Chorea Huntington als auch in anderen Hirnregionen deutlich vermehrt war. Beal und Mitarbeiter (1992) fanden Beweise für die verringerte Synthese von Kynorensäure, ein Antagonist

exzitatorischer Aminosäuren, im Chorea Huntington Putamen. Angespornt von diesen Erkenntnissen und der Andeutung von der NMDA-Rezeptor vermittelten Toxizität bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, fiel das Interesse auf den NMDA-Rezeptor und dessen Agonisten, da sie möglicherweise von Bedeutung in der Pathogenese von Chorea Huntington seien.

An einem verbesserten exzitotoxischen Model zeigten Beal und Mitarbeiter (1986) daß Quinolinsäure und andere Agonisten, die am NMDA-Rezeptor wirken, die neurochemischen und neuropathologischen Veränderungen bei Chorea Huntington exakter reproduzieren als Kainat. Durch Quinolinsäureläsionen in Ratten reduzierte sich der Gehalt der Neurotransmitter (GABA, Substanz P), die in Medium Spiny Neurons (MSN) präsent sind, und wobei Somatostatin, ein Neurotransmitter aus den Medium Aspiny Neurons, unangetastet blieb.

1.3 CNTF

Neurotrophe Faktoren sind nicht nur für die embryonale Entwicklung des komplexen und komplizierten Netzwerkes von neuronalen Zellen, die das Nervensystem bilden, essentiell, sondern sie sind auch an der Erhaltung und Reparatur des adulten Nervensystems beteiligt (Weisenhorn et al., 1999). Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) hat in den letzten Jahren zunehmende Aufmerksamkeit für seine möglichen Aktionen an der physiologischen Erhaltung und der Antwort auf Verletzungen im adulten ZNS gewonnen (Ip und Yancopoulos, 1996).

CNTF gehört neben Interleukin 6, leukemia inhibitory factor und anderen zur Familie der Zytokine mit vier α -Helices (Sendtner et al., 1994; Weisenhorn et al., 1999). Frühere Studien haben gezeigt, daß sich die Synthese von CNTF auf Gliazellen des postnatalen Nervensystems beschränkt (Stöckli et al., 1991; Dobrea et al., 1992), mit der höchsten Konzentration in Schwann Zellen, Astrozyten des Nervus opticus und im Bulbus olfactorius (Stöckli et al., 1991; Guthrie et al., 1997). Astrozytäre CNTF-Expression wurde auch in Faserbahnen wie der Fornix gefunden, ist aber in den Bereichen der zentralen grauen Substanz niedrig (Dallner et al., 2002). Dort wird es aber nach mechanischer oder ischämischer Läsion drastisch hochreguliert, sowohl im läsionierten Gebiet als auch im deafferenzierteren Zielgebiet der läsionierten Neurone (Guthrie et al., 1997; Lee et al., 1997). Überexpression von CNTF in transgenen Mäusen führt zu

gliotischen Reaktionen nach Läsion oder bei neurodegenerativen Erkrankungen (Winter et al., 1995). Mäuse, denen CNTF fehlt, gedeihen initial prächtig, zeigen aber nach ein paar Monaten eine verstärkte Degeneration der Motoneurone (Masu et al., 1993). Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, daß endogenes CNTF sowohl am Schutz als auch an der Reparatur von verletzten Neuronen und von axonalen Projektionsneuronen, die mechanischem Stress ausgesetzt sind (periphere Motoraxone, Nervus opticus), beteiligt ist, sowie bei der anhaltenden Regeneration (olfaktorisches System) und bei der intensiven plastischen Umgestaltung (septo-hippocampales System) mitwirkt (Stöckli et al., 1991; Winter et al., 1995; Dallner et al., 2002).

Auch in Tiermodellen von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Huntington wurden die neuroprotektiven Eigenschaften des CNTF schon mehrmals nachgewiesen. Therapeutische Applikationen von CNTF in Tiermodellen bei Chorea Huntington (Emerich et al., 1998; Mittoux et al., 2000; Regulier et al., 2002; Weinelt et al., 2003) und Morbus Parkinson (Hagg und Varon, 1993) haben gezeigt, daß CNTF neuroprotektive Eigenschaften besitzt. 2% - 3% der menschlichen Population haben ein Defizit an CNTF (Takahashi et al., 1994; Thome et al., 1997), und die Ergebnisse von Giess und Mitarbeiter aus den Jahren 1998 und 2002 deuten darauf hin, daß ein CNTF-Defizit an neurologischen Erkrankungen beteiligt sein könnte.

Auch andere Cytokinderivate und Neurotrophine sind ebenfalls in der Lage einen Schutz der Neurone im Läsionsmodell mit Quinolinsäure bei Ratten herbeizuführen, so zum Beispiel Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (Perez-Navarro et al., 1999; Alberch et al., 2002), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Alberch et al., 2002) oder Nerve Growth Factor (NGF) (Schumacher et al., 1991; Emerich et al., 1994; Menei et al., 2000). Es wurde beobachtet, daß sowohl die Expression von GDNF-mRNA als auch die seines Rezeptors GFRalpha1 nach Quinolinsäureläsion zwischenzeitlich zunimmt (Bresjanac und Antauer, 2000; Marco et al., 2002). Der gleiche Effekt wurde für die mRNA-Level von NGF (Canals et al., 1998) und BDNF (Checa et al., 2000) beschrieben.

1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Vergleichbare Daten bezüglich der Expression von CNTF mRNA oder CNTF Protein im CPu nach Quinolinsäureläsion oder anderen exzitatorischen Läsionen sind bis heute nicht

verfügbar. Zudem ist die Datenlage über den CNTF-Proteingehalt im intakten CPu unzureichend und widersprüchlich (DeAlmeida et al. 2001; Regulier et al. 2002). Deswegen sollte der zeitliche Verlauf der Expression von CNTF Protein im CPu nach unilateraler Läsion mit Quinolinsäure mit Hilfe von immunhistochemischen Nachweisen untersucht werden. Zusätzlich wurde mit der quantitativen Western Blot Methode der CNTF-Proteingehalt in Proteinlösungen des CPu von der intakten Vergleichsgruppe, scheinläsionierten und quinolinsäureläsionierten Tieren bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere und Tierhaltung

Die Untersuchungen wurden an 3 - 5 Monate alten männlichen Wistar-Ratten (n = 17) (Rattus norvegicus, Charles River WIGA, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere betrug zum Zeitpunkt der Quinolinsäureläsion 400 g. Die Tiere wurden bei $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ im 12 Stunden hell/dunkel Rhythmus zu zweit in Makrolonkäfigen (720 cm² Fläche) mit freiem Zugriff auf Trinkwasser und Standardnahrung (Ssniff, Soest, Deutschland) im Tierstall des Instituts für Anatomie der Universität Rostock gehalten. Die Pflege und der Umgang mit den Tieren geschah unter den Regeln und Vorschriften der örtlichen Kontrollbehörden.

2.2. Exzitotoxische Läsionen und Kontrolläsion

Die Tiere (n = 17) wurden vor der stereotaktischen Operation durch intraperitoneale Injektionen mit Fentanyl (0,25 mg/kg Körpergewicht, Curamed, Karlsruhe, Deutschland) und Dehydrobenzperidol (5 mg/kg Körpergewicht, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) anästhesiert und narkotisiert. Der Kopf der Tiere wurde dann in einem stereotaktischen Apparat (Kopf, Tujunga CA, USA) so eingespannt, daß die Schädeloberfläche horizontal (flat skull position) lag (Paxinos und Watson, 1986). Dieses wurde gewährleistet, indem die Ohrbolzen des Apparates in den knöchernen Gehörgängen der narkotisierten Tiere eingeführt wurden, der Gaumen auf einer Vorrichtung, die 3,3 mm unterhalb der Interaurallinie eingestellt war, ruhte und ein Bügel über der Nase die Ratten in dieser Position fixierte. Mit einer ca. 2,5 cm langen sagittalen Inzision, wurden die Haut, Bindegewebe und Periost durchtrennt. Nach Darstellung der Suturae sagittalis coronaria und lambdoidea wurden diese ausgemessen, die „flat skull position“ wurde überprüft und mit den festgelegten Daten des Atlas von Paxinos und Watson (1992) verglichen. So konnten die stereotaktischen Koordinaten dieses Atlases für die Auffindung des rechten und linken Caudatus Putamen (CPu) genutzt werden. Nach Ermittlung der Injektionskoordinaten anhand der stereotaktischen Referenzpunkte (Bregma, Sutura sagittalis) erfolgte eine kleinflächige (ca. 2 x 2 mm) Trepanation des nun freiliegenden Schädelknochens mit Hilfe eines Handstückbohrers (Reco Dental, Wiesbaden, Deutschland). Die Dura mater wurde mit einem

feinen Skalpell eröffnet und die Wunde mit steriler Kochsalzlösung ausgespült. Eine 26 G 5 μ l Hamilton-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) wurde mittels eines Halters durch das Bohrloch im Schädeldach in die zuvor bestimmte Tiefe eingeführt. Nach einer Wartezeit von einer Minute wurden 2 x 0,5 μ l einer 0,09 M Quinolinsäure-Lösung (Sigma, Saint Louis, MO, USA), die in 0,1 M Phosphatpufferlösung (titriert mit 1 M NaOH zu pH 7,4) gelöst war, über einen Zeitraum von 4 Minuten injiziert. Die Koordinaten für die beiden Injektion der Säure ausgehend von Bregma (Schnittpunkt von Sutura coronalis und Sutura sagittalis) waren 1) A = +1,2; L = 2,8; V = -5,5 und 2) A = +0,0; L = 3,6; V = -5,5 (Paxinos und Watson, 1992). Nach weiteren 5 min wurde die Injektionsnadel durch langsames Zurückziehen entfernt. Danach wurde bei den Tieren auf der kontralateralen Seite eine Kontrolläsion durchgeführt, die durch eine Injektion von 0,5 μ l 0,1 M DMEM (Gibco) ins CPu hervorgerufen wurde. Das Procedere und die Koordinaten waren äquivalent zu den zuvor beschriebenen Läsionierungsangaben.

2.3. Kontrolle erfolgreicher Läsionen

Basierend auf den Erkenntnissen von Norman et al. (1988) und Björklund et al. (1994) sind Apomorphin-induzierte Rotationen sensitive und schnelle Nachweismethoden einer Schädigung im Striatum, die auf einem Untergang striataler Neurone, die D1/D2-Rezeptoren tragen, beruht. Der nicht selektive D1/D2-Rezeptoragonist Apomorphin löst bei unilateral quinolinsäureläsionierten Ratten ein charakteristisches ipsilaterales Drehverhalten aus. Diese Rotationen können ausgewertet und mit der Menge an unilateral abgestorbenen striatalen Neuronen korreliert werden.

Sieben Tage, 14 Tage und 28 Tage nach Läsion wurde mit den Tieren Apomorphin-induzierte Rotationen durchgeführt. Den mit Äther anästhesierten Tieren wurde das Apomorphin (1,0 mg/kg Körpergewicht in isotonischer Kochsalzlösung, Teclapharm, Lüneburg, Germany) subkutan injiziert und diese dann in ein automatisiertes Rotometer gespannt. Das Rotometer war ein Eigenbau nach Plänen, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. Guido Nikkah (Abteilung Stereotaktische Neurochirurgie, Neurochirurgische Klinik der Universität Freiburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden. Die Rotationen wurden über 30 Minuten gemessen, wobei eine Rotation als komplette ipsilaterale Drehung definiert war. Die Nettodifferenz aus beiden Richtungen pro Minute wurde festgehalten. Um schon vor der

Läsionierung bestehende Hirnschäden auszuschließen, wurden sieben Tage vor dem operativen Eingriff Kontrollrotationen, wie zuvor beschrieben, mit den Tieren durchgeführt.

2.4. Gehirnproben

2.4.1 Perfusion und Entnahme der Gehirne

Perfusion der Ratten: Nach einer Überlebenszeit von 7, 14 und 28 Tagen nach Läsion wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Gabe von 80 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium (Serva, Heidelberg, Deutschland) getötet. Nach Eröffnung des Brustkorbes wurde der linke Herzventrikel mit einer feinen Schere eröffnet, eine Glaskanüle über den Ventrikel in den Aortenbogen eingeführt und fixiert. Anschließend wurde der rechte Herzvorhof mit einer feinen Schere eröffnet. Die Vorspülung der Blutgefäße wurde mit einem Flaschensystem, unter einem Druck von 100-110 mmHg, mit 50 ml einer eiskalten 0,9%igen NaCl-Lösung vorgenommen. Danach wurden die Tiere mit 500 ml eiskaltem PFA (in 0,1 M PBS, pH 7,4) perfundiert. Um dem Gehirn möglichst große Mengen des Fixans zukommen zu lassen, wurde zusätzlich die Aorta abdominalis abgeklemmt. Nach der Entnahme der Gehirne wurden diese für 4 Stunden bei Raumtemperatur in 4% PFA immersionsfixiert und anschließend über Nacht bei 4°C in einer 20%igen Saccharoselösung (in 0,1 M PBS, pH 7,4) entwässert und kryoprotektiert. Nachdem die Gehirne vollständig abgesunken waren, erfolgte das Einfrieren in -50°C kaltem Isopentan (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Hirne wurden dann bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.4.2 Histologische Färbungen

Von allen Tieren wurden mittels eines Kryostaten (Jung CM3000, Leica, Bensheim, Deutschland) 25 µm dicke serielle Hirnschnitte angefertigt und entsprechend für Nissl- und Markscheidenfärbungen in TRIS-Puffer (TRIS, 0,1 M, pH 7,4, Sigma) überführt. Nach dreimaligem Waschen in TRIS wurden die für Nissl- und MS-Färbungen bestimmten Schnitte direkt auf gelatinisierte Objektträger (Chrom-Kalium-Gelatine-Lösung) aufgezogen und auf einer 37°C warmen Heizplatte 90 Minuten getrocknet. Parallelschnitte, die der

Immunhistochemie unterzogen werden sollten, wurden einzeln in 24er Paletten, die 0,1 M TRIS mit 20% Saccharose (pH 7,4) beinhalteten, überführt und über Nacht bei 4°C gelagert.

Nissl-Färbung: Die Objektträger wurden dreimal für je 1-2 Minuten in Aqua dest. gespült und dann für 30 Minuten in 60°C warmer Kresylviolettlösung (1 g Kresylviolettacetat, Sigma, Saint Louis, MO, U.S.A., in 1000 ml Aqua dest. gelöst und filtriert) gefärbt. Zum Differenzieren der Schnitte wurde eine aufsteigende Alkoholreihe (2 x 70%, 1 x 80%, 2 x 90%, 2 x 96%, 2 x 100%) verwendet, in die die Objektträger für 2 Minuten getaucht wurden. Vor dem Eindecken mit Depex (Serva, Heidelberg, Deutschland) und Deckgläschen wurden die Schnitte mit Hilfe von 3 Xylolbädern (je 5 Minuten) vollständig entwässert.

Markscheidenfärbung: Entsprechende Schnitte wurden auf Objektträgern aufgezogen und in einer mit 0,1 M neutralem Phosphat gepufferten 3,7%igen Paraformaldehydlösung für 45 Minuten fixiert. Nach dreimaligem Spülen in Aqua dest. (je 1 - 2 Minuten) erfolgte die Inkubation in einer Lösung aus 67% Pyridin (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 37% Essigsäureanhydrid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 30 Minuten. Dann wurden die Objektträger nach 3 x 5 minütiger Aqua dest.-Spülung in eine Ammoniumsilbernitratlösung (0,1% Ammoniumnitrat, Sigma, Saint Louis, MO, U.S.A.; 0,1% Silbernitrat, VEB Feinchemie, Sebnitz, Deutschland; 3 mM Natriumhydroxid, Sigma, Saint Louis, MO, U.S.A.) zur Vorentwicklung gegeben. Danach erfolgte eine dreimalige Spülung für je 3 Minuten in 1%iger Essigsäure. Zum Sichtbarmachen der am Myelin gebildeten Silberkerne wurde ein physikalischer Entwickler (0,3 M Natriumbikarbonat, Merck, Darmstadt, Deutschland; 0,1 % Ammoniumnitrat; 0,1% Silbernitrat; 0,5% Wolframatokieselsäure, Sigma, Saint Louis, MO, U.S.A.; Agfacolor Bleichfixierbad, Agfa, Deutschland) verwandt, in dem die Objektträger 30 - 45 Minuten verblieben. Die Entwicklung wurde gestoppt, indem die Objektträger 2 x 5 Minuten in 0,5% Essigsäure getaucht und dann für 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gehalten wurden. Als nächstes wurden die Schnitte in einem photographischen Fixierer (Acidofix, Agfa, Deutschland) für 10 Minuten fixiert und anschließend zuerst für 10 Minuten in Leitungswasser und dann kurz mit Aqua dest. gespült. Um die richtige Farbintensität zu erhalten, wurden die Objektträger für je 2 Minuten in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%, 2 x 100%) gegeben und abschließend, vor dem Eindecken mit Depex (Serva, Heidelberg, Deutschland) und Deckgläschen, für 3 x 5 Minuten in Xylol entwässert.

2.4.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde ohne Verwendung von Detergentien durchgeführt, da die verschiedenen CNTF-Antikörper keine spezifische Färbung unter Verwendung von Detergentien zeigten. Da aber CNTF zum größten Teil intrazellulär gelegen ist (Adler R, 1993; Richardson PM, 1994), wurde das Thawmounting durchgeführt (Haas et al., 2000), um den Antikörpern den Zugang zu intrazellulären Epitopen zukommen zu lassen. Entsprechend der von Haas et al. (2000) beschriebenen Prozedur wurden die Schnitte im hyperosmotischen Medium mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in 5 Zyklen eingefroren und aufgetaut und anschließend 3 Mal in 0,1 M TRIS gewaschen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die frei schwimmenden Schnitte in 0,1 M TRIS, das 3% Rinderserumalbumin (BSA, Sigma, Saint Louis, MO, U.S.A.) und 5% Normales Ziegen-Serum oder Normales Pferde-Serum (beide Life Technologies Inc., Scotland, UK), entsprechend des zweiten Antikörpers, enthielt, für 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Damit wurde der unspezifische Hintergrund blockiert. Danach wurden die Schnitte über 2 Tage bei 4°C mit den Erstantikörpern, die in 0,1 M TRIS und 1% BSA gelöst waren, inkubiert. Die Erstantikörper reagierten gegen CNTF (Huhn, polyklonal, 1 : 300, Promega, Madison, WI, U.S.A. oder Ziege, polyklonal, 1 : 250, R & D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.), GFAP (Maus, monoklonal, 1 : 400, Sigma, Saint Louis, MO, U.S.A.) und NeuN (Maus, monoklonal, 1 : 1000, Chemicon, Temecula, PA, U.S.A.). Als Negativkontrolle wurde von jeder Serie der letzte Hirnschnitt nicht mit dem entsprechenden Erstantikörper inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden dann dreimal in 0,1 M TRIS gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit den biotinylierten Zweitantikörpern gegen Huhn (Esel, polyklonal, 1 : 200, Dianova, Hamburg, Deutschland), gegen Ziege (Esel, polyklonal, 1 : 200, Dianova, Hamburg, Deutschland) oder mit den CY²-konjugierten Zweitantikörpern gegen Maus (Ziege, polyklonal, 1 : 400, Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Serien in 0,1 M TRIS wurden die Schnitte, die gegen GFAP und NeuN gefärbt wurden, auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte bei 37°C für 90 Minuten getrocknet. Danach wurden die Objektträger mit Hilfe eines Fluoreszenzeindeckmediums und Deckgläschchen eingedeckt.

Das Fluoreszenzeindeckmedium erhält die Fluoreszenzen und ist somit für Dauerpräparate geeignet. Zum Herstellen dieses Mediums werden 6 g Glycerol und 2,4 g niedermolekularer Polyvinylalkohol bei 40 – 45°C über 12 Stunden in 6 ml Aqua dest. gelöst. Dann wurde 12 ml TRIS (0,2 M, pH 8,5) hinzugegeben und 30 Minuten bei 60 – 70°C verrührt.

Die Anti-CNTF markierten Serien wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem ABC-Komplex (1 : 500 für Lösung A und B, Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) inkubiert, gefolgt von dreimal Waschen in 0,1 M TRIS. Anschließend fand die Inkubation der Schnitte in Fluoreszein-Avidin-D (Streptavidin-FITC, 1 : 250, Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) für 2 Stunden bei Raumtemperatur statt. Zuletzt wurden die Hirnschnitte nochmals dreimal in 0,1 M TRIS gewaschen und dann auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und mit Fluoreszenzeindeckmedium und Deckgläschchen eingedeckt. Die CNTF-Serie für die Lichtmikroskopie wurde nach der Thawmount-Behandlung (in TRIS gelöst) dreimal in 0,1 M TRIS gewaschen und anschließend für 20 Minuten in 3% H₂O₂ gelegt, um endogene Peroxidasen zu zerstören. Danach wurden die Schnitte in 0,1 M TRIS dreimal gewaschen und für 4 Stunden in 0,1 M TRIS, welches 3 % BSA und 5 % Normales Pferde Serum beinhaltet, inkubiert. Die Hirnschnitte wurden für zwei Tage bei 4 °C mit dem Erstantikörper gegen Ratten CNTF (Ziege, polyklonal, 1 : 250, R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.), gelöst in 0,1 M TRIS und 1% BSA, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,1M TRIS wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem biotinylierten Zweitantikörper gegen Ziege (Esel, polyklonal, 1 : 200, Dianova, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Es folgte das dreimalige Waschen der Schnitte in 0,1 M TRIS und die Inkubation für 2 Stunden in dem ABC-Komplex (1 : 500 für Lösung A und B, Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.). Danach wurden die Schnitte wieder dreimal in 0,1 M TRIS gewaschen und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit der DAB-Lösung (5 mg DAB [Sigma, Saint Louis, MO U.S.A.] in 100 ml 0,1M TRIS mit 1 µl 30% H₂O₂ gelöst) inkubiert. Die Schnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und mit dem Eideckmedium Depex (Serva, Heidelberg, Deutschland) und Deckgläschchen eingedeckt.

2.4.4 Analyse und Dokumentation der Gewebeschnitte

Die Hirnschnitte wurden mit Hilfe eines Leitz Aristoplan Mikroskops (Wetzlar, Deutschland) analysiert. Dieses Forschungsmikroskop verfügt über einen Filterblocksatz für Fluoreszenzmikroskopie, sodaß blau (AMCA), grün (Cy²) und rot (Cy³) emittierende Fluoreszenzen detektiert werden konnten. Zudem verfügt es über einen rot/grün Kombinationsfilter. Die Präparate wurden mit einem Kameraaufsatz für Kleinbildfilme dokumentiert und die Filme später mittels Diascanner (CanoScan 2700F, Canon) mit 1360 dpi digitalisiert.

Zur Dokumentation der mit Quinolinsäure läsionierten Hemisphäre und der kontralateralen scheinläsionierten Kontrollseite wurde die Belichtungszeit des Filmes beibehalten, damit die Unterschiede der ausgestrahlten Lichtintensität zum Ausdruck kamen, welche durch die unterschiedliche Behandlung der Hemisphären und somit dem unterschiedlichem Gehalt an CNTF hervorgerufen wurden.

2.5 Untersuchungen von CNTF-Proteinlysaten

2.5.1. Western Blot

Um eine weitere Charakterisierung des CNTF-Gehalts im CPu (intakt/scheinläsioniert) durchzuführen, wurden Proteinlysate aus den Rattenhirnen bezüglich des CNTF-Gehalts mit Hilfe der Western Blot-Technik untersucht. Diese Methode ist sensitiver als die oben beschriebene Immunohistochemie an Hirnschnitten. Zudem lässt sie quantitative Aussagen über den Gehalt von Proteinen zu, da vergleichende Mengen an Gesamtproteinen und Standards (rekombinantes CNTF) untersucht werden können.

Vier Wochen nach der Quinolinsäureläsion wurden vier Ratten mit einer Überdosis Pentobarbital (80 mg/kg, Serva, Heidelberg, Deutschland) getötet und transkardial mit 4°C warmer isotonischer Kochsalzlösung (50 ml) perfundiert. Die Gehirne wurden sofort entnommen und Gewebeblöcke, die das quinolinsäureläsionierte und das scheinläsionierte Corpus Striatum enthielten, wurden herausgeschnitten. Als Kontrollen dienten Gewebeblöcke von intakten, nicht läsionierten Tieren (n = 4). Vergleichbare Mengen frischen Gewebes (50 mg Gewebe pro 1000 µl Probenpuffer) wurden für 5 Minuten in SDS (Sodiumdodecylsulfat) Probenpuffer (Laemmli, 1970) bei 95°C denaturiert. Der Proben- bzw. Lysepuffer bestand aus folgenden Reagenzien: 52 ml Aqua dest., 1 g SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland), 5 g Glycerin (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 92,5 mg EDTA (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,4 g TRIS (Serva, Heidelberg, Deutschland), 10 mg Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 2,5 ml β-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Die Proteine wurden elektrophoretisch nach der Methode von Laemmli (1970) in denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Page Gelen aufgetrennt. Hierbei wurden fertige acrylamidhaltige Trenngele (Criterion-Gel, Bio-Rad, München, Deutschland) mit einem Gradienten von 4 – 15% verwendet. Pro Spur wurden 30 µl SDS Probenpuffer (entsprechend 1,5 mg des frischen Gewebes von den verschiedenen Striata) aufgetragen. Zusätzlich wurde

auch rekombinantes Ratten-CNTF (R & D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.) für 5 Minuten in SDS Probenpuffer gekocht und dann in verschiedene Konzentrationen aufgetragen. So daß es als positive Kontrolle diente und für den CNTF-Proteingehalt der Gewebelösung als Vergleich genutzt werden konnte. Bei konstanten 170 V unter Verwendung einer Mini-Elektrophoresekammer (Criterion-Cell, Bio-Rad, München, Deutschland) dauerte die Gelelektrophorese ca. eine Stunde. Der Elektrodenpuffer bestand aus 3 g TRIS (Serva, Heidelberg, Deutschland), 14,4 g Glycin (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 g SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland) und 1 l H₂O. Als Marker wurde ein Molekulargewichtsstandard von 6,5-17 kDa verwendet (Bio-Rad, München, Deutschland).

In der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wandern die Proteine durch ein elektrisches Feld in einem Polyacrylamid-Netzwerk (Acrylamid/Bisacrylamid), das als Molekularsieb fungiert. Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine auf Grund ihrer Masse trennen. Die Zugabe des Detergents Natriumdodecylsulfat führt zur Lösung nichtkovalenter Bindungen in nativen Proteinen. Die SDS-Anionen binden an die Hauptketten der Proteine, und der gebildete Komplex aus SDS und denaturiertem Protein wird dann der Elektrophorese unterworfen. Zur Reduktion möglicher Disulfidbrücken wird β-Mercaptoethanol und Dithiothreitol eingesetzt

Innerhalb eines Gels wäre die Detektion von Proteinen mit Antikörpern nur unter Verlust der Auflösung oder meist gar nicht zu erreichen. Daher wurden die im Gel aufgetrennten Proteine nach Abschluß der SDS-Page mittels Semidry Blot auf Nitrozellulosemembranen (Amersham, Freiburg, Deutschland) transferiert (geblottet). Der Blotpuffer bestand aus 5,8 g TRIS (Serva, Heidelberg, Deutschland), 2,9 g Glycin (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 0,375 g SDS (Serva, Heidelberg, Deutschland), 200 ml Methanol (JT Baker, Deventer, Holland) und 800 ml H₂O. Es wurde für eine Stunde ein konstanter Strom von 0,8 A pro cm² Geloberfläche auf die Blotkammer (Modell Semi-Phor, Hoefer, San Francisco, Ca, U.S.A.) angelegt. Die Spannungs- und Stromquelle für die Gelelektrophorese und den Semidry Blot lieferte ein Spannungsgeber (Modell 1500, Hoefer, San Francisco, Ca, U.S.A.).

Zur Visualisierung der nachzuweisenden Proteine erfolgte eine Antigen-Antikörper-Reaktion und die Detektion über ein geeignetes Substrat. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen auf den Membranen wurden diese zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierungslösung [0,1 M PBS (pH 7,4), 0,1% Tween 20 (PBS-T, Sigma, Saint Louis, MO, U.S.A.) und 1 % BSA (Sigma, Saint Louis, MO, U.S.A.)] inkubiert. Auf den Membranen konnte anschließend die Antigen-Antikörper-Reaktion stattfinden. Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C mit den Erstantikörpern gegen β-Aktin (Maus,

monoklonal, 1 : 3000, Sigma, Saint Louis, MO, U.S.A.), ein Produkt der housekeeping Gene, das als interner Standard dient, und gegen Ratten-CNTF (Ziege, polyklonal, 1 : 1000, R & D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.) inkubiert. Dann wurden die Membranen viermal 15 Minuten in PBS-T gewaschen und für ein Stunde bei Raumtemperatur mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Zweitantikörpern (Anti-Maus, 1 : 5000 und Anti-Ziege, 1 : 10000, beide Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) inkubiert. Danach erfolgten vier Waschschritte für je 15 Minuten in PBS-T. Die Membranen wurden daraufhin für 1 Minute mit einem ECL-Detektionskit (Amersham, Freiburg, Deutschland) inkubiert und anschließend die nach der Chemolumineszenz-Methode positiv markierten Banden unter Verwendung eines 100NIF-Röntgenfilms (Agfa, Mortsel, Belgien) detektiert. Die Belichtungszeit der Filme betrug 2 Minuten. Um eine anschließende Quantifizierung zu ermöglichen, wurde dieses Protokoll standardmäßig für alle durchgeführten Western Blots eingehalten.

2.5.2 Quantifikation der Western Blot Banden

Die Röntgenfilme wurde mit einer lateralen Auflösung von 800 dpi über einen hoch auflösenden Durchlichtscanner digitalisiert. Es wurde diese standardisierte Auflösung gewählt, da durch niedrigere Auflösungen Intensitätsvariationen entstehen und bei einer höheren Auflösung die Intensitätsverteilung größer ist und somit mehr Daten bearbeitet werden müssen, was einen größeren Zeitaufwand zur Folge hat und dabei keine neuen relevanten Informationen über die Intensitäten der Banden erbracht werden. Deshalb wurden diese Parameter für alle Blots verwandt. Um die Bandenintensität von sechs verschiedenen bekannten CNTF-Konzentrationen zu bestimmen, wurde Vergleichskonzentrationen mit Hilfe einer interaktiven Bildanalyse-Prozedur gemessen. Jede Bande, die 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 oder 0,5 ng/Spur entsprach, wurde fünfmal markiert, um somit das Streuungsphänomen der Banden zu reduzieren und die Variabilität der Messungen zu verringern. Der individuelle Hintergrund eines jeden Röntgenfilms wurde subtrahiert, damit ein Vergleich möglich war. Die Beurteilung wurde anhand eines Bildanalyse-Systems KS400 (Zeiss Vision) vorgenommen. Es konnten keine größeren Unterschiede beim Bewerten der Bilder mit Hilfe der Scannercharakteristiken Densitometric (umgewandelte Grauwerte) (Oberholzer et al., 1996) oder Intensitometric (original Grauwerte) festgestellt werden. Die Blots wurden vierfach durchgeführt. Somit konnte der Mittelwert zum Erstellen einer Exponentialfunktion erster Ordnung verwandt werden, um die Standartkurve zu erhalten. Die daraus resultierende

Gleichung wurde zum Errechnen des CNTF-Gehalts in den aufgetragen CPu-Lösungen genutzt.

Die Banden der drei Gruppen (intakte Kontrolle n = 4, scheinläsioniert n = 4, Quinolinsäure-läsioniert n = 4) wurden für CNTF und dem „Housekeeping-Protein“ β -Aktin (interne Kontrolle) quantifiziert. Jede Bande wurde dazu markiert und dreimal quantifiziert, um Variabilitäten in den Messungen zu reduzieren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Die Mittelwerte der drei Gruppen wurden über den zweiseitigen Mann-Withney U-Test verglichen. Der Mann-Withney U-Test ist ein verteilungsfreier Rangsummentest und daher auch zur Bewertung kleiner Stichproben geeignet.

2.6 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Die hier vorliegende Arbeit basiert im wesentlichen auf den Proteinnachweis mit Hilfe der Immunhistochemie und der Western Blot Methode, bei denen ausschließlich Antikörper zur Detektion der Proteine eingesetzt wurden. Aus diesem Grund wird im Folgenden etwas näher auf die verwendeten Antikörper und die durch sie markierten Strukturen eingegangen.

2.6.1 Nachgewiesene Proteine und deren Antikörper

2.6.1.1 β -Aktin

β -Aktin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und kann als so genanntes „Housekeeping-Protein“ angesehen werden, da es in allen Zellen in ähnlich hoher Konzentration vorliegt. In Western Blots dient es als Nachweis für das Einbringen gleicher Proteinmengen nach vorangegangener Proteinbestimmung. Somit ist es eine interne Kontrolle (Liao et al., 2000). Der von uns verwendete Antikörper (Klon AC-15, aus Maus, monoklonal, Sigma) bindet an das N-terminale Ende der β -Isoform von Aktin (North et al., 1993). Das Anti- β -Aktin wurde in unserer Studie für den Western-Blot 1:3000 verdünnt.

2.6.1.2 CNTF

Der Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) wurde in den parasympathischen Neuronen des Ganglion ciliare von Hühnerembryos als erstes entdeckt und nach seiner Tätigkeit dort auch benannt. Humanes und Ratten-CNTF bestehen aus 200 Aminosäuren, wobei deren Homologie bei etwa 85 % liegt (Richardson, 1994). Wie auch acidic und basic fibroblast growth factor (aFGF und bFGF) und Interleukin (IL)-1 fehlt CNTF ein hydrophobes Signalpeptid, welches die Freilassung des Proteins aus seiner Synthesezelle reguliert (Adler, 1993; Richardson, 1994). Die Primärsequenz von CNTF ist zu keiner anderen Sequenz der bekannten Proteine homolog (Richardson, 1994). Dagegen wurde mit einer computergestützten Profilanalyse herausgefunden, daß CNTF, leukemia inhibitor factor (LIF), Onkostatin M, IL-6 und der Granulozyten-Kolonien-stimulierende-Faktor zusammen den gleichen tertiären Aufbau mit vier α -Helizes haben (Bazan, 1991). Das Gen für humanes CNTF ist auf Chromosom 11 lokalisiert und enthält ein einziges 1 kb Intron innerhalb der kodierenden Domäne (Lam et al., 1991).

CNTF bindet mit sehr hoher Affinität an dem CNTF α -Liganden des CNTF-Rezeptorkomplex, der sowohl von Neuronen (MacLennan et al., 1996; Kahn et al., 1997; Kodower et al., 1997; Lee et al., 1997) als auch von Astrozyten exprimiert wird (Kirsch et al., 1998; Dallner et al., 2002). Besonders hoch wird er von reaktiven Astrozyten nach Läsion exprimiert (Rudge et al., 1994; Lisovoski et al., 1997).

Die Konzentration von CNTF in peripheren Nerven beträgt etwa 5 nmol/kg und ist damit 100mal höher als die Konzentration von NGF und anderen Neurotrophinen im Nervengewebe und 1000mal höher als für ein halbmaximale Aktivität nötig sein würde, wenn CNTF gleichmäßig verteilt wäre (Richardson, 1994). In den peripheren Nerven scheint die Synthese von CNTF durch direkte oder indirekte Signale reguliert zu werden. In den peripheren Nerven von ausgewachsenen Ratten wird CNTF von einigen, aber nicht allen Schwann Zellen synthetisiert. Es ist häufiger in myelinisierten als in unmyelinisierten Zellen vorhanden (Dobrea et al., 1992).

CNTF ist auch im ZNS enthalten, wo es hauptsächlich als astrozytärer Läsionsfaktor gesehen wird, der, ausgenommen vom N. opticus und Bulbus olfactorius, im intakten Gehirn sehr schwach exprimiert ist (Stöckli et al., 1991; Guthrie et al., 1997; Asan et al., 2003). Nach mechanischen oder ischämischen Hirnläsionen dagegen wird das Protein dramatisch hochreguliert (Guthrie et al., 1997; Lee et al., 1997) und führt zu einer starken Vermehrung reaktiver Astrozyten (Lisovoski et al., 1997). Der proliotische Effekt des CNTF konnte auch

nach exogener Anwendung (Levison et al., 1996) und bei transgenen Mäusen (Winter et al., 1995) gezeigt werden.

Experimentelle Modelle haben gezeigt, daß CNTF neuroprotektiv für verschiedene Neuronenpopulationen ist (Hagg et al., 1992; Sendtner et al., 1994; Clatterbuck et al., 1996; Sendtner et al., 1997; Thoenen und Sendtner, 2002). Ein besonderes Augenmerk sollte man auf die schon mehrmals nachgewiesenen neuroprotektiven Eigenschaften des CNTF in Tiermodellen von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Huntington (Emerich et al., 1998; Mittoux et al., 2000; Regulier et al., 2002; Weinelt et al., 2003) und Morbus Parkinson (Hagg und Varon, 1993) haben.

CNTF ist auch deshalb ein interessantes Protein für Untersuchungen, da nachgewiesen wurde, daß 2 bis 3% der menschlichen Population CNTF-defizient sind (Takahashi et al., 1994; Thome et al., 1997). Auch die Frage, welche Rolle die CNTF-Defizienz in neurologischen Erkrankungen spielt, wurde kürzlich aufgeworfen (Giess et al., 1998; 2002). Des weiteren wurde gezeigt, daß die Anzahl CNTF-haltiger Zellen in der Substantia nigra bei Patienten mit Morbus Parkinson verringert ist (Chauhan et al., 2001).

Zur immunhistochemischen Detektion von CNTF haben wir zwei verschiedene Antikörper verwendet. Anti-CNTF aus dem Huhn (polyklonal, Promega), welches in unserer Studie 1:300 verdünnt wurde, und Anti-CNTF aus der Ziege (polyklonal, R&D Systems Inc.), was wir in einer Verdünnung von 1:250 verwendet haben.

Als Positivkontrolle im Western Blot diente rekombinantes CNTF der Ratte (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), das eine molekulare Masse von ca. 22,8 kDa besitzt. Der polyklonale Antikörper stammt aus der Ziege und wurde in unseren Western Blot-Studien 1:1000 verdünnt.

2.6.1.3 GFAP

GFAP ist ein Intermediärprotein von reifen Astrozyten (Eng et al., 1971; Eng und Kosek, 1974; Debus et al., 1983; Franke et al., 1991; Eng et al., 2000). Das Molekulargewicht von GFAP im Ratten-ZNS beträgt ca. 51 kDa (Eng et al., 1980). GFAP kann eng mit dem Intermediärfilament Vimentin kolokalisiert sein, das nicht ausschließlich in Astrozyten vorkommt. Mit Neurofilamenten kommt GFAP nie zusammen in einer Zelle vor (Eng 1980), weshalb es einen der gebräuchlichsten Marker für Astroglia darstellt. Dazu wird es in radialen Bergmann-Gliazellen (Levitt und Rakic, 1980) exprimiert. Eine GFAP-Expression wurde

kürzlich in neuronalen Progenitorzellen nachgewiesen, wobei seine Funktion in diesen Zellen völlig unbekannt ist (Johansson et al., 1999; Doetsch et al., 1999; Laywell et al., 2000; Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2001; Cambell und Gotz, 2002). GFAP wird bei Astrogliose dramatisch hochreguliert, zusammen mit einer Astrozytenhypertrophie (Bignami und Dahl, 1976; Amaducci et al., 1981; Mathewson und Berry, 1985; Eddleston und Mucke 1993; Eng und Lee, 1995). Eine positive Markierung von Zellen mit GFAP stellt das sternförmige filamentöse Zellgerüst der Astrozyten dar, wobei der Zellkern ausgespart bleibt. In unserer Studie verwendeten wir für die Immunhistochemie ein Anti-GFAP aus der Maus (Klon G-A-5, monoklonal, Sigma) in einer Verdünnung von 1:400.

2.6.1.4 NeuN

NeuN (neuron-specific nuclear protein) ist ein lösliches Kernprotein mit einem Molekulargewicht von 46 – 48 kDa, das nicht zu den Kernmatrixproteinen gehört (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996). Seine Funktion ist bislang noch nicht geklärt. Aufgrund der Kernlokalisierung und der DNA-bindenden Eigenschaften wird vermutet, daß es sich um ein Transkriptionsfaktor handelt, der für die Ausbildung eines neuronalen Phänotyps verantwortlich ist. Es kommt ausschließlich in Neuronen von Wirbeltieren vor (Mullen et al., 1992; Sarnat et al., 1998) und tritt sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem auf (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996; Sarnat et al., 1998; Todd et al., 1998).

Der von uns verwendete Antikörper gegen NeuN (Klon A-60, aus Maus, monoklonal, Chemicon, Hofheim/Ts, Deutschland) bindet an eine Vielzahl von unterschiedlichen Nervenzelltypen. Jedoch erkennt er einige wenige Typen von Nervenzellen nicht, wie z.B. Purkinje-Zellen des Kleinhirns, Mitralzellen des Bulbus olfactorius (Mullen et al., 1992). Der Grund für das Fehlen der Immunreaktivität in diesen Zellen ist nicht bekannt (Sarnat et al., 1998; Todd et al., 1998). Nicht-neuronale Strukturen gehen weder im undifferenzierten noch im differenzierten Zustand Bindungen mit NeuN-Antikörpern ein (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996; Sarnat et al., 1998; Todd et al., 1998). Die Expression des NeuN tritt in Verbindung mit der terminalen Differenzierung der Neurone auf (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996) und/oder erscheint zu Zeitpunkten, die mit dem Verlassen der Neurone aus dem Zellzyklus korrespondieren (Mullen et al., 1992; Sarnat et al., 1998). Möglich ist auch, daß das Protein nur in Zellen exprimiert wird, die schon terminal differenziert sind. Laut Mullen

et al. (1992) und Sarnat et al. (1998) erscheint NeuN schon früh während der Entwicklung und ist auch noch im adulten Hirn vorhanden.

Das Protein NeuN kommt in Zellkernen und zu geringeren Anteilen auch im Zytoplasma um den Kern herum, bzw. im Perikaryon vor (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996; Todd et al., 1998). Es können verschiedene Grade der Färbung beobachtet werden, z.B. kann der Kern, mit Ausnahme des Nukleolus, intensiv gefärbt sein, während das Zytoplasma nur wenig Reaktion zeigt. Möglich ist auch der umgekehrte Fall, daß das Zytoplasma eine gute Färbung aufweist und der Kern weniger intensiv auffällt (Mullen et al., 1992). Das Protein NeuN färbt keine Kerne unreifer Nervenzellen, bis sie ein Stadium der Entwicklung erreicht haben, in dem sie die ersten Kriterien der Differenzierung erfüllt haben oder sich zumindest der reifen Funktion nähern (Sarnat et al., 1998). Von einigen Autoren wird eine Färbung bis in die proximalen neuronalen Ausläufer beschrieben (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996). Auch zytoplasmatische Organellen oder Oberflächenantigene können NeuN enthalten (Sarnat et al., 1998). NeuN ist ein permanenter Regulator von neuronenspezifischen Eigenschaften. Ob es im Zytoplasma eine Funktion ausübt oder dort lediglich synthetisiert wird, ist noch unbekannt (Mullen et al., 1992).

Aufgrund der intensiven Markierung der meisten postmitotischen ausdifferenzierten Neurone ist der monoklonale Antikörper NeuN ein Standartmarker für die Charakterisierung von Nervenzellen (Gage et al., 1995). Dieser Antikörper kam auch in einer Studie zur Verwendung, die sich erstmals mit der adulten Neuroneogenese im Gehirn des Menschen befasste (Eriksson et al., 1998).

Tabelle 1: Western Blot und Immunhistochemie: Primär-, Sekundärantikörper und Färbeprotokolle

Antigen	Block	1. Anti-körper	2. Antikörper	Biotin-System	Herkunft des 1. Antikörpers
<u>Western Blot:</u>					
<u>ß-Aktin</u>					
	Lösung aus PBS, 1%BSA, 0,1% Tween20	Maus Klon AC-15	Peroxidase-konjugiertes Pferd-anti-Maus Ig	-	Sigma-Aldrich Inc. Saint Louis, MO, U.S.A.
	1h, Raumtemperatur	1:3000, 24h, 4°C	1:5000, 1h, Raumtemperatur		
<u>Ratten-CNTF</u>					
	Lösung aus PBS, 1%BSA, 0,1% Tween20	Ziege Polyklonal 1:1000, 1h, Raumtemperatur	Peroxidase-konjugiertes Pferd-anti-Ziege Ig	R & D Systems Inc. Minneapolis, MN, U.S.A.	
			1:10000, 1h, Raumtemperatur		

Immun-
histochemie:

CNTF	Normales Pferde Serum 5%, 4h, Raum- temperatur	Huhn Polyklonal 1:300, 2d, 4°C	Biotinyliertes Esel-anti- Huhn Immunoglobulin (=Ig) 1:200, 24h, 4°C	ABC- Komplex A/B), 2h, Raum- temperatur; Fluoreszein Avidin D, 1:250, 2h, Raum- temperatur	Promega Madison, WI, U.S.A.
-------------	---	---	--	---	--------------------------------------

CNTF	Normales Pferde Serum 5%, 4h, Raum- temperatur	Ziege Polyklonal 1:250, 2d, 4°C	Biotinyliertes Esel-anti- Ziege Ig 1:200, 24h, 4°C	ABC- Komplex A/B), 2h, Raum- temperatur; Fluoreszein Avidin D, 1:250, 2h, Raum- temperatur	R & D Systems Inc. Minneapolis, MN, U.S.A.
-------------	---	--	---	---	--

GFAP	Normales Ziegen Serum 5%, 4h, Raum- temperatur	Maus Klon GA5 1:400, 2d, 4°C	CY ² - konjugiertes Ziege-anti- Maus Ig 1:400, 24h, 4°C	—	Sigma- Aldrich Inc. Saint Louis, MO, U.S.A.
-------------	---	---------------------------------------	--	---	---

NeuN	Normales Ziegen Serum 5%, 4h, Raum- temperatur	Maus Klon 377 1:1000, 2d, 4°C	CY ² - konjugiertes Ziege-anti- Maus Ig 1:400, 24h, 4°C	—	Chemicon Inc., Temecula, PA, U.S.A.
-------------	---	--	--	---	---

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Apomorphin-induzierten Rotationen

Grundlage unserer Untersuchung stellte die Anzahl von Apomorphin-induzierten Rotationen der Ratten dar. Für die Versuchsreihe wählten wir 3-5 Monate alte männliche Wistar-Ratten ($n = 17$), deren durchschnittliches Körpergewicht zum Zeitpunkt der Quinolinsäureläsion 400 g betrug. Da diese Rotationen im direkten Zusammenhang mit der unilateral gesetzten exzitatorischen Läsion des CPu der Ratten stehen, stellen sie ein aussagekräftiges Korrelat zum Ausmaß der striatalen Schädigung dar. In **Diagramm 1** und **Tabelle 2** (Anhang) sind die Ergebnisse der Apomorphin-induzierten Rotationen der Quinolinsäure-läsionierten Tiere eine Woche vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Läsion aufgeführt.

Eine Woche nach Läsion betrug der Mittelwert der Apomorphin-induzierten Rotationen 3,8 ($\pm 1,1$) Rotationen pro Minute und stieg zwei Wochen nach Läsion auf 5,1 ($\pm 1,3$) Rotationen pro Minute an. Es wurde ein Plateau erreicht, welches auch drei und vier Wochen nach Läsion mit 4,6 ($\pm 0,9$) bzw. 5,0 ($\pm 0,9$) Rotationen pro Minute bestehen blieb. Damit lagen die Rotationswerte im Bereich von erfolgreich läsionierten Tieren, wie schon in vergleichbaren Arbeiten gezeigt wurde (Norman et al., 1988; Björklund et al., 1994; Weinelt et al., 2003).

Um auszuschließen, daß die Tiere eine vorbestehende Funktionsstörung im Caudatus Putamen hatten, wurde bei allen Tieren eine Rotationsmessung 7 Tage vor Läsionierung durchgeführt. Da diese einen Wert von 0,9 ($\pm 1,8$) Rotationen pro Minute aufwies, waren die ausgewählten Ratten für die Verwendung als Chorea Huntington Tiermodelle als geeignet einzuschätzen.

Auf Grundlage des Rotationsverhaltens der Tiere konnte man die Vermutung anstellen, daß zwei Wochen nach Quinolinsäureläsion der Untergang von striatalen Neuronen und die damit verbundene Verminderung der dopaminergen Rezeptorzahl im läsionierten CPu komplett erreicht war. Gleichzeitig deuteten die Rotationsergebnisse darauf hin, daß die ipsilateralen Scheinläsionen, die Läsionen, die allein durch den Nadeleinstich und Injektion von $0,5\mu\text{l}$ Pufferlösung verursacht wurden, keine Auswirkungen auf die Verhaltensänderungen hatten.

Apomorphin-induzierte Rotationen (1 mg/kg, 30 min)

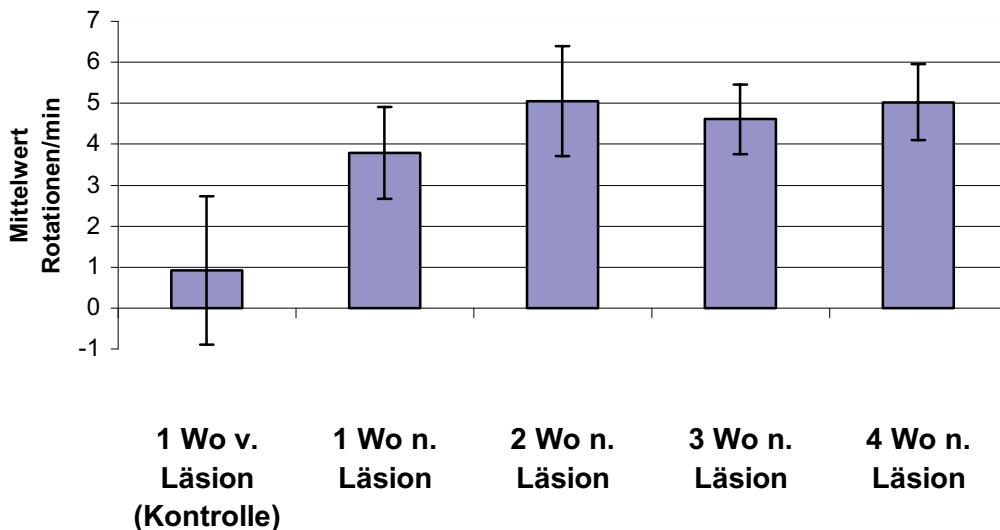


Diagramm 1: Apomorphin-induzierte Rotationen vor und nach unilateraler Läsion mit Quinolinsäure und kontralateraler Scheinläsion mit DMEM in das CPu von Ratten:

Dargestellt ist der Verlauf der Apomorphin-induzierten Rotationen 7 Tage vor Läsion, sowie 7, 14, 21 und 28 Tage nach Läsion. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

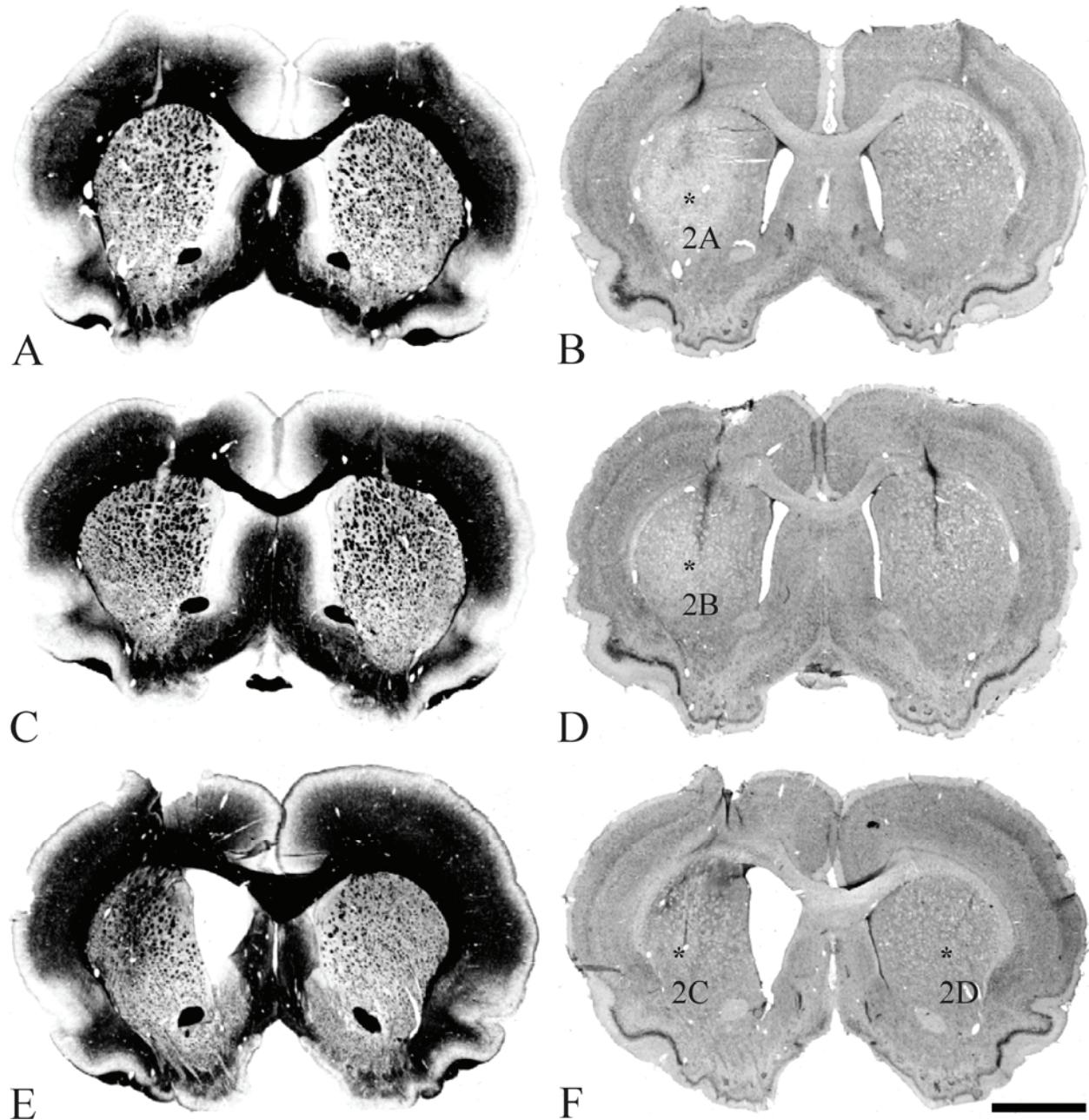


Abb. 1) Histologische Darstellung erfolgreich läsionierter CPu:

Abgebildet sind die Frontalschnitte in Injektionshöhe 7 Tage (A, B), 14 Tage (C, D), 28 Tage (E, F) nach einseitiger Quinolinsäureläsion (linke Hemisphäre).

Markscheidenfärbungen werden in der linken Spalte (A, C, E) gezeigt und Nissl-Färbung auf der rechten Seite (B, D, F).

Es sind eindeutig die Abnahme des Hirngewebes im linken CPu und die Vergrößerung des lateralen Ventrikels im Laufe der Zeit nach Läsion, im Vergleich zur scheinläsionierten Seite (rechte Hemisphäre) zu erkennen.

Maßstab (A-F) = 500 µm.

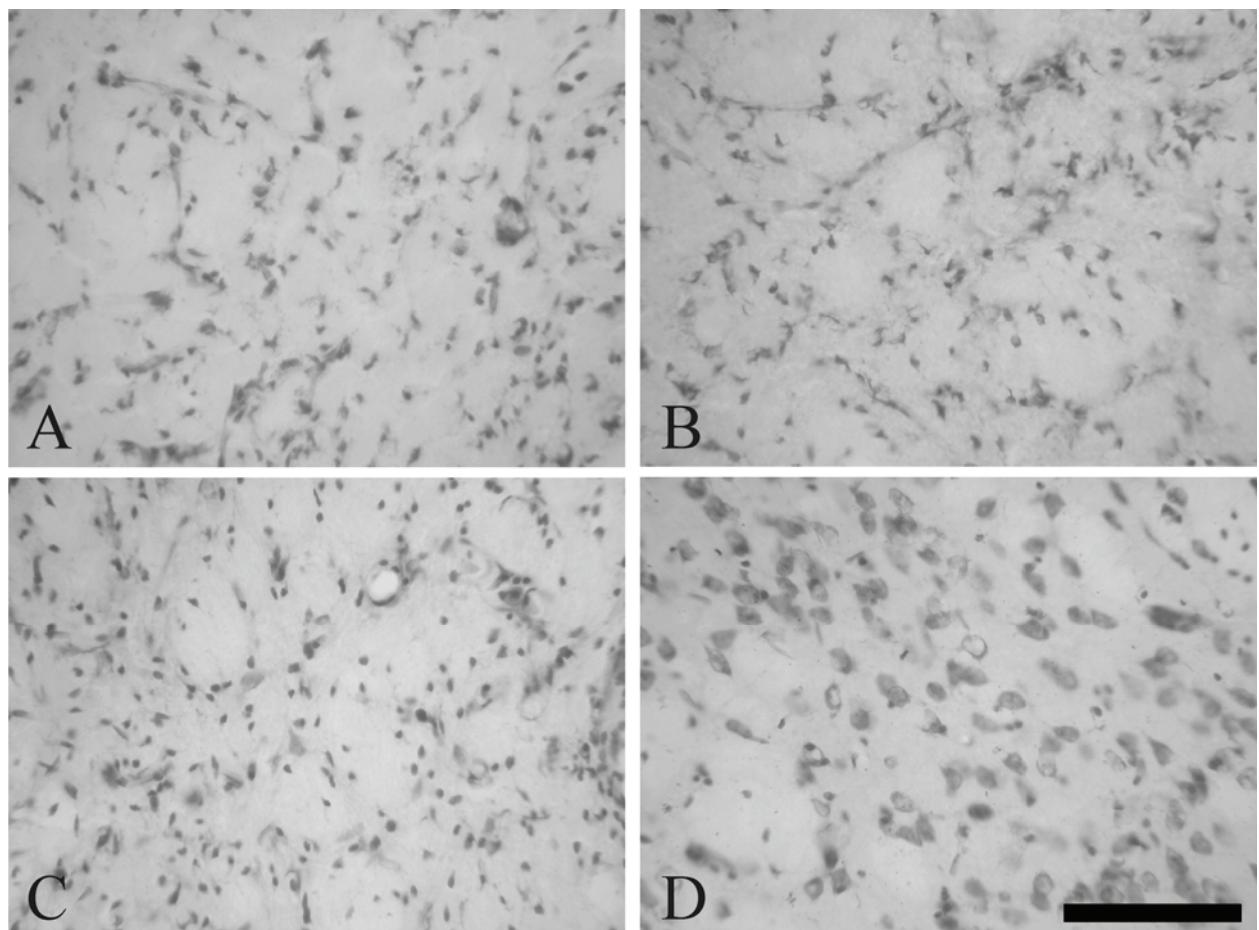


Abb. 2) Neuronaler Untergang und zunehmende Gliose nach Quinolinsäureläsion

Starke Vergrößerungen der Nissl-Färbung des CPu 7 Tage (A), 14 Tage (B) und 28 Tage (C) nach Quinolinsäureläsion zeigen den Verlust von Neuronen und die Vermehrung von Gliazellen im Verlaufe der Zeit. Im Vergleich dazu kann in der scheinläsionierten Hemisphäre 28 Tage nach Quinolinsäureläsion (D) kein Unterschied in der Menge der Neuronen und Gliazellen zu intakten Tieren beobachtet werden.

Maßstab = 100 µm

3.2 Morphologische Veränderungen im Quinolinsäure-läsionierten CPu

Exzitatorische Aminosäureläsionen des CPu entsprechen einigen der neuropathologischen Charakteristika, wie z.B. dem Untergang von Medium Spiny Neurons und der Vermehrung von Gliazellen im Läsionsgebiet, wie sie auch bei Chorea Huntington zu beobachten sind (DiFiglia, 1990). Zur Darstellung der beträchtlichen morphologischen Veränderungen verwendeten wir Nissl- und Markscheidenfärbungen. Ein über die Zeit fast vollständiger Verlust an striatalen Neuronen und der partielle Ersatz durch Gliazellen konnte mit Hilfe der Nisslfärbung (**Abb. 1B,D,F und Abb. 2**) beobachtet werden. Bei der Nisslfärbung werden die für Nervenzellen spezifischen, so genannten Nisslschollen (Stapel des rauen endoplasmatischen Retikulums) im Zellkörper gefärbt. In der **Abb. 2A-C** erkennt man, daß die Menge der großen, gezackt geformten Zellkörper, die einen Teil der Neuronen darstellen, abnimmt. Die dadurch entstandenen Freiräume werden aber nur teilweise von den kleineren Gliazellen aufgefüllt.

Die verschiedenen Nervenfaserbündel, die durch das CPu ziehen, scheinen von der Läsion nicht beeinflusst zu sein. Man erkennt an der Größe und Verteilung der Myelinscheiden (schwarz gefärbten Areale), daß die Nervenfaserbündel nur als Folge der Abnahme des neuronalen Gewebes im Striatum dichter zusammengerückt sind (**Abb. 1A,C,E**). Korrelierend zur Reduktion des striatalen Gewebes konnte eine Vergrößerung des lateralen Ventrikels in der läsionierten Hemisphäre, die über die gesamten 28 Tage zunimmt, beobachtet werden. Die kontralaterale scheinläsionierte Hemisphäre zeigte diese morphologischen Umgestaltungen nicht und unterschied sich somit nicht von intakten Gehirnen (**Abb. 1A-F**). Die einzige Veränderung, die beobachtet wurde, war die Glianarbe, erkennbar an der dunkleren strichförmigen Färbung als Verbindung zwischen Kortex und Striatum, die sich im Verlauf der Einstichstelle durch die Injektionsnadel gebildet hat. Eine Narbenbildung in solcher Form ist aber typisch für diese Einstichkanäle (**Abb. 1C, D**).

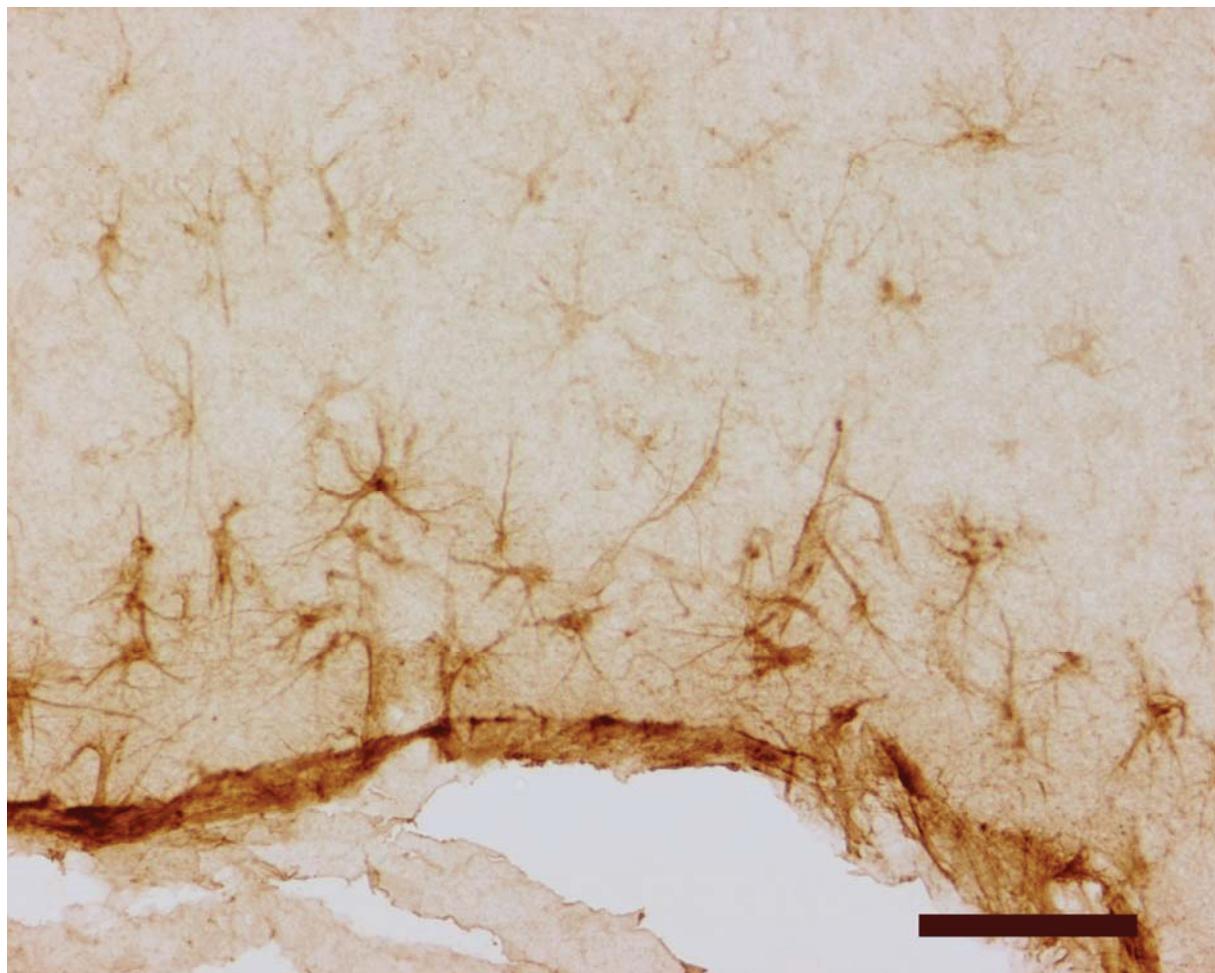


Abb. 3) Immunhistochemische Färbung und finale Visualisierung mit DAB der Glia limitans am Cortex

In der Abbildung sind viele CNTF-positive Astrozyten im Bereich der Gliagrenzmembran zu erkennen, was als Positivkontrolle für die verwendete Färbemethode fungiert.

Maßstab = 200 µm

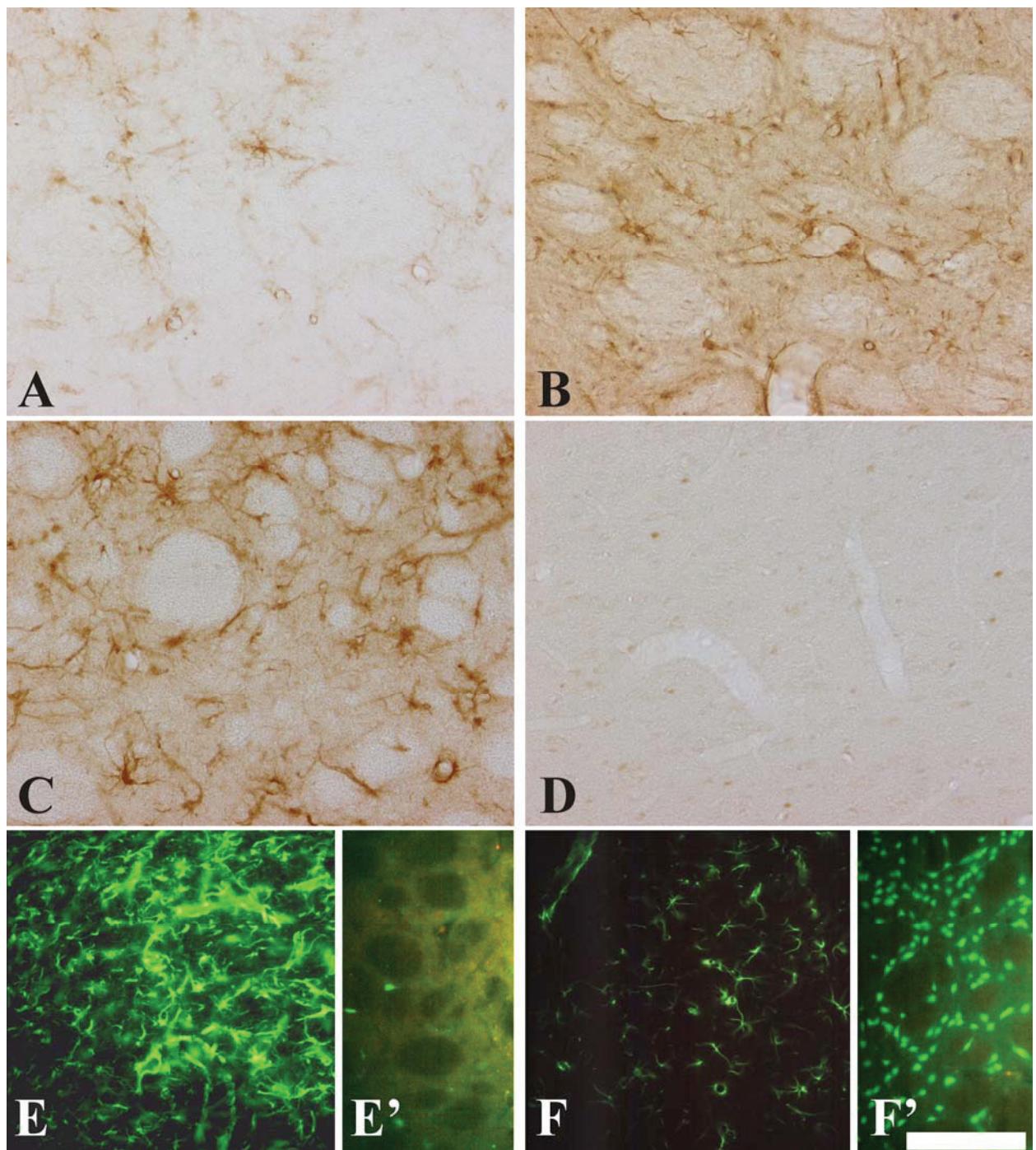


Abb. 4) Immunhistochemische Färbung von CNTF, GFAP und NeuN im Quinolinsäure-läsionierten und scheinläsionierten kontralateralen CPu

In der läsionierten Hemisphäre ist die zunehmende Färbeintensität für CNTF 7 Tage (A), 14 Tage (B) und 28 Tage (C) nach Quinolinsäureläsion gut zu erkennen. Die scheinläsionierte Hemisphäre (D) zeigt keine Immunreakтивität für CNTF. Im Quinolinsäure-läsioniertem CPu 28 Tage nach Läsion (E) ist die GFAP-Immunreakтивität stark erhöht im Vergleich zum scheinläsioniertem CPu (F). 28 Tage nach Quinolinsäureläsion ist durch die Immunfärbung gegen NeuN der Untergang der Neuronen im läsioniertem CPu (E') deutlich zu erkennen. Im Vergleich sind auf der scheinläsionierten Seite (F') viele NeuN-immunreaktive Zellen zu erkennen. Maßstab (A-D) = 100 µm, Maßstab (E, F) = 175 µm

3.3 CNTF-Expression im Quinolinsäure-läsierten CPu

Die Untersuchungen zur Expression von CNTF erfolgten mit Hilfe von immunhistochemischen Nachweismethoden. Es wurden zwei verschiedene Erstantikörper gegen CNTF (vom Huhn und von der Ziege) und verschiedene Detektionssysteme für CNTF-Antikörper verwendet. Darunter ist auch die finale Visualisierung mit Hilfe von Chromogen DAB (**Abb. 3 und Abb. 4A-D**). Beide Färbemethoden erbrachten übereinstimmende Ergebnisse. Wie schon mehrfach von anderen Arbeitgruppen beschrieben (Stöckli et al. 1991; Dobrea et al. 1992; Kirsch et al. 1998) zeigen die Positivkontrollen eine starke CNTF-Immunreaktivität in den Zellen des Bulbus olfactorius, die zur Gliagrenzmembran gehören. Ähnliches ist auch in den Zellen des Nervus opticus zu beobachten, der im engen Kontakt mit der Gliagrenzmembran (**Abb. 3**) bzw. mit Blutgefäßen liegt. Im Gegensatz dazu zeigten alle Negativkontrollen, die durch das Weglassen der Erstantikörper erfolgten, ein komplettes negatives Färbeverhalten. Dies entspricht zudem der Darstellung von intakten Gehirnen bei Kontrollratten.

Im weiteren Verlauf der Versuchsreihe zeigte sich eine Woche nach Quinolinsäureläsion bei den Versuchstieren im CPu eine leichte Färbung für CNTF mit einzelnen CNTF-enthaltenden Zellen mit Astrozytenmorphologie (**Abb. 4A**). Zwei Wochen nach Läsion war ein weiteres Ansteigen sowohl der Intensität der CNTF-Färbung als auch der Anzahl der CNTF-immunreaktiven Zellen zu beobachten (**Abb. 4B**). Eine weitere Intensivierung der CNTF-Färbung war 4 Wochen nach Quinolinsäureläsion zu erkennen (**Abb. 4C**). Dadurch konnte eine quantitative Zunahme von CNTF-enthaltenden Zellen über die Zeit nach erfolgter Quinolinsäureläsion dargestellt werden.

In der kontralateralen Hemisphäre, die eine DMEM-Injektion erhalten hatte, war CNTF bei allen Versuchstieren nur entlang der Einstichstelle durch die Injektionsnadel erkennbar. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Asada et al. (1995) überein. Da ansonsten im restlichen CPu der scheinläsierten Tiere keine weitere CNTF-Detektion stattgefunden hat (**Abb. 4D**), kann man durchaus davon ausgehen daß die CNTF-Konzentrationserhöhung eine Reaktion auf die exzitatorische Läsionierung mit Quinolinsäure ist.

In wieweit die Zunahme der CNTF-enthaltenden Zellen direkt proportional zur Zeit ist, konnte nicht ausreichend sicher geklärt werden, da keine exakte Auszählung der Zellen möglich war. Die Zellen, die CNTF enthielten, zeigten die gleiche Morphologie und Verteilung im CPu wie es für GFAP-immunreaktive Astrozyten mit großen geschwollenen Zellkörpern typisch ist.

3.4 Messungen des CNTF-Proteingehalts

Mit Hilfe der quantitativen Western Blot Methode wurde der Gehalt an CNTF-Protein im CPu von intakten, scheinläsionierten und Quinolinsäure-läsionierten Tieren 4 Wochen nach Läsion bestimmt. In der **Abb. 5A** werden die detektierten CNTF-Banden auf der Nitrozellulosemembran, die zur Visualisierung der Proteine verwendet wurde, dargestellt. Man kann erkennen, daß drei CNTF-spezifische Banden mit einem Molekulargewicht von 22,8 kDa unterschiedliche Prominenz haben. Die CNTF-Bande der Quinolinsäure läsionierten Striata ist wesentlich stärker ausgeprägt als die CNTF-Banden der scheinläsionierten Ratten und der Kontrolltiere. Wobei die Banden der letzten beiden Versuchsgruppen in etwa die gleiche Intensität haben.

Als interner Standard diente β -Aktin, ein Produkt des housekeeping Gens. Da der Gehalt dieses Housekeeping-Proteins (42 kDa) bei den drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede aufwies (**Abb. 5B**), mußte keine Korrektur bei der errechneten Dichte der CNTF-Banden vorgenommen werden. In den Lösungen, die 1 mg an Gesamtprotein enthielten, fanden wir in den CPu's der Quinolinsäure-läsionierten Hemisphären einen signifikant größeren Gehalt an CNTF ($2,76 \pm 1,71$ ng, $n = 4$) im Vergleich zu beiden anderen Gruppen, den scheinläsionierten Hemisphären ($0,68 \pm 0,25$ ng, $n = 4$) und den intakten Hemisphären ($0,55 \pm 0,16$ ng, $n = 4$) bei $P < 0,05$. Zwischen den Gruppen der intakten und scheinläsionierten Hemisphären war kein signifikanter Unterschied des CNTF-Gehalts zu beobachten(**Abb. 5C**).

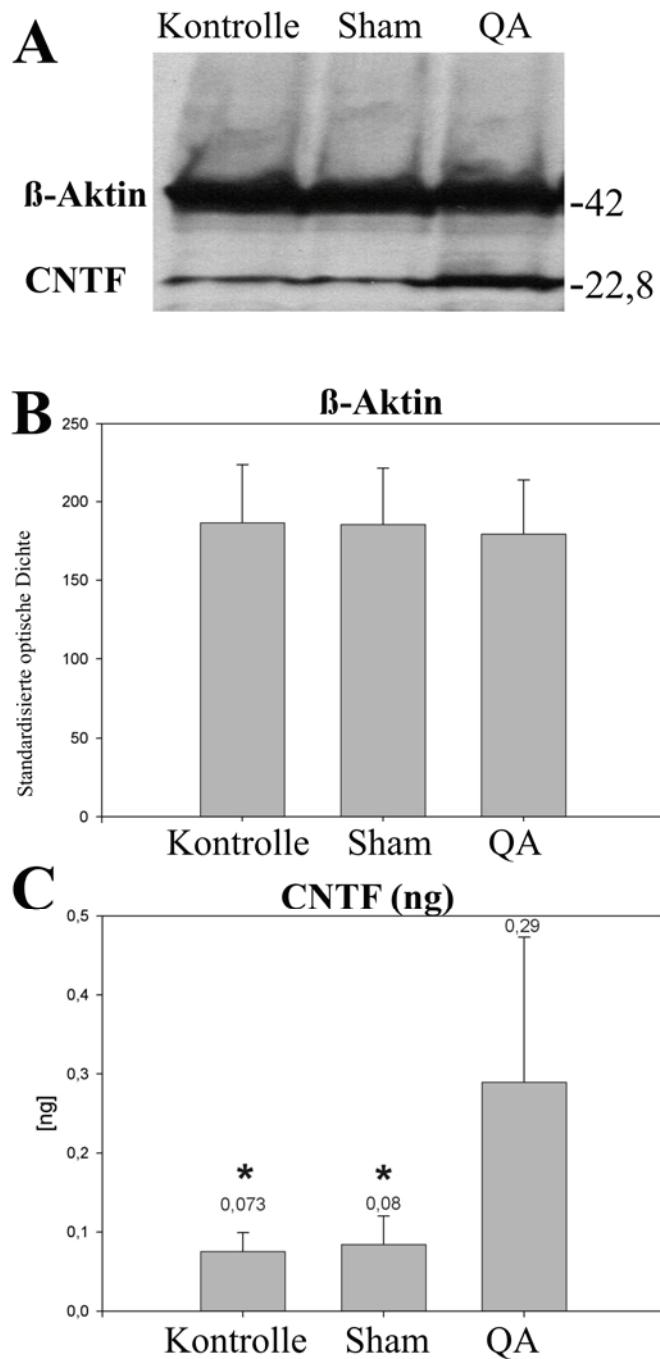


Abb. 5) Bestimmung des CNTF-Gehalts in intakten Kontrollen, scheinläsionierten und Quinolinsäure-läsionierten CPu 28 Tage nach Läsion mit Hilfe der Western Blot Methode

A: Typisches Ergebnis eines Western Blot mit Lösungen die CPu-Gewebe aus intakten Kontrolltieren, scheinläsionierten und Quinolinsäure-läsionierten Tieren enthalten und gleichzeitig gegen CNTF (22,8 kDa) und β -Aktin (42 kDa) inkubiert worden sind. Beim Messen der standardisierten optischen Dichte der β -Aktin-Banden in den verschiedenen Gruppen wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt (B). Dagegen erbrachten die Messungen der CNTF-Banden einen wesentlich höheren Gehalt an CNTF in quinolinsäureläsionierten CPu als vergleichsweise sowohl im scheinläsionierten CPu als auch im CPu der intakten Kontrolltiere ($*P<0,05$, U-test). In B und C stellen die Fehlerbalken die Standardabweichung dar.

3.5 GFAP-Immunreaktivität der läsionierten Gehirne

Auf den Parallelschnitten, gefärbt gegen GFAP, einem Intermediärprotein von reifen Astrozyten, ließ sich die Verteilung der Astroglia innerhalb des degenerierten CPu auf der läsionierten Seite darstellen (**Abb. 4E**). Über die Zeit (7d, 14d, 28d) ist, in Anlehnung an die Ergebnisse der CNTF-Immunreaktion, eine deutliche Zunahme der Anfärbung für GFAP zu erkennen (**Abb. nicht gezeigt**). Diese Zunahme betrifft auch hier sowohl die Intensität der Anfärbung als auch die Zahl der GFAP-immunreaktiven Zellen. 28 Tage nach Läsion war die GFAP-Expression im CPu sehr hoch (**Abb. 4E**). Dagegen war die GFAP-Anfärbung auf der scheinläsionierten Seite nur gering- bis mittelgradig hoch (**Abb. 4F**). Dies ist vergleichbar mit den Färbungen bei den intakten Kontrolltieren. Bei näherer Betrachtung der Morphologie und Verteilung der GFAP-immunreaktiven Zellen im CPu liegt die Vermutung nahe, daß es sich um reaktive Astrozyten handelt. Daraus läßt sich schlussfolgern, daß sowohl eine Veränderung der Morphologie als auch eine Proliferation von reifen Astrozyten im Gebiet der Quinolinsäureläsion stattgefunden hat. Durch die Injektion der Pufferlösung auf der kontralateralen Seite scheint die Astrozytenproliferation nicht getriggert worden zu sein.

3.6 Neuronale Degeneration im Läsionsgebiet

Auf Parallelschnitten, gefärbt gegen den neuronalen Marker NeuN, konnte man erkennen, daß schon nach einer Woche eine deutliche Reduktion der NeuN-Immunreaktivität im Vergleich zur scheinläsionierten Seite stattgefunden hat (**Abb. nicht gezeigt**). Diese schreitet so weit voran, daß nach 4 Wochen auf der läsionierten Seite nur noch vereinzelt NeuN-positive Zellen vorhanden waren (**Abb. 4E'**). Hier kann man von einer starken Neuronendegeneration, hervorgerufen durch die Quinolinsäureinjektion, ausgehen. Im CPu der scheinläsionierten Hemisphäre war keine Veränderung der Anzahl an NeuN-immunreaktive Zellen sichtbar (**Abb. 4F'**).

4. Diskussion

Die Relevanz für die Grundlagenforschung über CNTF liegt in der starken neurotrophen Wirkung, die CNTF nach Applikation im exzitatorisch läsionierten CPu der Ratte (Beal et al. 1986; Emerich et al. 1994, 1997a; Weinelt et al. 2003) oder im Corpus striatum von Primaten (Emerich et al. 1997b) entfalten kann.

In einer Phase1-Studie wurde sein Potential als Therapeutikum, nach intrathekaler Applikation bei Chorea Huntington Patienten untersucht (Bachoud-Levi et al. 2000; Bloch et al., 2004). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit für Daten, die über den endogenen Gehalt an CNTF-mRNA oder CNTF-Protein im intakten Ratten CPu sehr selten (Stöckli et al. 1991; De Almeida et al. 2001; Regulier et al. 2002) Aussagen machen können. Ebenso sind Erhebungen, die den endogenen Gehalt an CNTF im CPu nach exzitatorischer Läsion genauer beschreiben, in bisherigen Tierversuchsmodellen nur unzureichend erforscht worden. Deshalb erschien es uns wichtig, sowohl einen zeitlichen Verlauf der CNTF-Expression zu dokumentieren, als auch präzise Informationen über den Gehalt an endogenem CNTF-Protein im CPu bis zu 4 Wochen nach unilateraler Quinolinsäureläsion zu erstellen.

4.1 Kritische Auseinandersetzung mit dem Tiermodell

Die Verwendung von exzitatorischen Aminosäuren zur Auslösung neuronaler auf das Neostriatum begrenzter Zelluntergänge ist von unschätzbarer Wert für das Untersuchen von neuronalen Reorganisationsmustern und auch sehr wichtig für das Erforschen von Chorea Huntington. Bisherige Erkenntnisse lassen vermuten, daß die chronisch anhaltenden Zelluntergänge durch eine initiale Verletzung getriggert werden. Bemerkenswert ist, daß der progressive Zellverlust, der durch exzitatorische Aminosäuren hervorgerufen wird, auffallende Parallelen zum neuronalen Untergang bei Chorea Huntington aufweist. Dabei korrelieren die Gradienten des vermehrten Zellverlustes und die N. caudatus-Atrophie mit der Schwere der Erkrankung (DiFiglia, 1990).

Die Forschung an Chorea Huntington-Patienten und an postmortalem Gewebe wurde sehr stark vom exzitotoxischen Läsionsmodell beeinflusst. Die Studien zum Tryptophanmetabolismus (Schwarcz et al., 1988) und zur NMDA-Rezeptorverteilung (Young et al., 1988) und auch klinische Arzneimittelstudien (Shoulson et al., 1989; Walker, 1989)

zeigen eine direkte Verbindung zu der experimentellen Arbeit mit exzitatorischen Läsionsmodellen.

Viele Studien stimmen mit der Hypothese überein, daß ein endogenes Exzitotoxin, welches am NMDA-Rezeptor wirkt, ähnlich wie bei Chorea Huntington, einen Neuronenverlust und neurochemische Veränderungen im Neostriatum hervorrufen könnte (DiFiglia, 1990). Doch einige Charakteristika der Erkrankung, wie das verzögerte Auftreten von Symptomen im mittleren Alter und der initiale Neuronenverlust in der Nähe der Ventriculi laterales (VonSattel et al. 1985) und dem dorsalem Putamen (DiFiglia, 1990) sind durch die Hypothese nicht vollständig erklärt. So wurde auch der frühe Verlust von speziellen Subtypen der Medium Spiny Neurons im Matrixbereich des Neostriatums (Reiner et al., 1988) nicht nach exzitatorischer Verletzung bei Nagetieren beschrieben. Ein weiteres Problem stellt die Notwendigkeit für fortlaufenden kortikostriatalen Input (McGeer et Co., 1978), um neuronalen Zelluntergang im N. caudatus bei Nagern zu induzieren, dar. Hinzu kommt, dass die exzitotoxische Läsion regional unspezifisch ist, sodass andere Hirnregionen mit Glutamat-Rezeptoren ungünstig durch die Exposition mit exzitatorischen Aminosäuren beeinflusst sein können.

Des weiteren besteht eine Diskrepanz zwischen dem neuronalen Verlust bei Chorea Huntington, der sich langsam über Jahrzehnte vollzieht, und der schweren innerhalb von Stunden bis Tagen verlaufenden neuronalen Dezimierung, die experimentell durch exzitatorische Aminosäuren induziert wird. Die zeitliche Diskrepanz adressierend konnte gezeigt werden, daß über einen längeren Zeitraum laufende intrastriatale Infusionen mit Glutamat (McBean und Roberts, 1984) oder auch verlängerte Expositionen von kortikostriatalen Co-Kulturen mit niedrig konzentrierter Quinolinsäure (Whetsell und Schwarcz, 1989) auch einen effektiven Zelluntergang verursachen. Die Arbeit von Roberts und DiFiglia (1989) beschreibt, daß die Reduktion der Gesamtgröße des Nucleus caudatus durch einzelne intrastriatale Injektionen mit Quinolinsäure nach 30-wöchigem post-Läsionsintervall signifikante größer ist als nach 2-wöchigem Intervall. Zellzählungen deuten darauf hin, daß die anhaltende Größenreduktion des Nucleus caudatus aus einem zusätzlichen langsamen Untergang von striatalen aus der Läsionszone projizierenden Neuronen resultieren. Der Neuronenverlust schließt auch große Zellen, die zu einem früheren Zeitpunkt nach der Läsion ausgespart wurden, mit ein.

Nach intrastriataler Läsion mit Ibotensäure findet für bis zu 6 Monaten, als Zeichen einer stattfindenden Neurodegeneration, eine narbige Gliose statt (Isacson et al., 1987). Diese Tatsache spielt unabhängig von den noch ausstehenden Ergebnissen bezüglich der primären

Ursachenforschung im Hinblick auf den Zusammenhang mit einer exzitotoxischen Verletzung eine wichtige Rolle bei der Progredienz des neuronalen Untergangs. Ein anhaltendes Ungleichgewicht zwischen den zerstörten neuronalen Zellpopulation des N. caudatus und dem daraus resultierenden Überschuß an kortikalen glutaminergen Afferenzen könnte lokal für eine Neuronendegeneration verantwortlich sein (DiFiglia, 1990). Auch wenn die exzitatorische Verletzung gegebenenfalls nur einen Teil einer weitaus komplexeren Anordnung von neuropathologischen Ereignissen darstellt, so ist sie dennoch ein wichtiger Faktor im Krankheitsverlauf.

Da die durch Quinolinsäure verursachten Läsionen Somatostatin/Neuropeptid Y-Neuronen nicht beeinflussen, beschreibt dieses Läsionsmodell die neurochemischen und histologischen Eigenschaften von Chorea Huntington besser als Tiermodelle mit anderen Exzitotoxinen. Es gibt weitere Eigenschaften, die Quinolinsäure als ätiologisches Mittel für Chorea Huntington attraktiv machen. So hat sich gezeigt, daß neonatale Tiere im Gegensatz zu erwachsenen Tieren resistent gegen Quinolinsäure sind (Schwarcz et al., 1984). Diese Ergebnisse stimmen mit dem typischen Beginn von Chorea Huntington im mittlerem Alter überein. Des weiteren wurde beobachtet, dass speziell das Striatum, der Globus pallidus und der Hippokampus von der Neurotoxizität der Quinolinsäure angegriffen werden, während Cerebellum, Substantia nigra, Amygdala, Septum und Hypothalamus weniger von der Quinolinsäure betroffen sind (Schwarcz et al., 1984). Viele dieser Regionen sind auch bei Chorea Huntington betroffen, wobei abweichend die größte Neuronendegeneration im Striatum zu sehen ist.

Exzitatorische Läsionen im Neostriatum von Ratten produzieren lokomotorische Hyperaktivität und Defizite im T-maze-Lernen, sowie verzögerten Aufgabenbewältigungen, die mit den motorischen und kognitiven Störungen bei Chorea Huntington durchaus vergleichbar sind (Divac et al., 1978; Dunnett et al., 1988; Isacson, 1986). Kritisch bleibt festzustellen, daß sich bei der Ratte nicht die Hyperkinesien, bzw. die choreatischen Bewegungen manifestieren, die für Chorea Huntington typisch sind. Hieraus ergibt sich eine Einschränkung bezüglich der Nutzen von Nagetiermodellen für das Evaluieren von Therapiemöglichkeiten dieser Erkrankung.

Im Affen (Kanazawa et al., 1986; Hantraye et al., 1990) verursachen unilaterale Läsionen des Caudatus-Putamen mit exzitatorischen Aminosäure (Kainat oder Ibotensäure), gefolgt von agonistischer Stimulation mit Dopamin, ein breites Spektrum von Symptomen, inklusive Chorea, Dystonie, Stellungsasymmetrien und Kopf- und orofaziale Dyskinesien. Diese haben bemerkenswerte Ähnlichkeiten mit den Symptomen von Chorea Huntington Patienten, denen dopaminstimulierende Medikamente verabreicht wurden (Beal, 1994). Aus ethischen und

wirtschaftlichen Gründen sind experimentelle Grundlagenforschungen an Nagetiermodellen den Primatenmodellen vorzuziehen.

4.2 Expression von CNTF

Die Ergebnisse über die zeitabhängigen Veränderungen des CNTF-Gehalts korrelierten mit den morphologischen Veränderungen, wie wir durch die immunhistochemische Visualisierung von CNTF gezeigt haben. Wir verwendeten dazu zwei verschiedene Antikörper, deren Detektion durch Immunfluoreszenz und auch mit Hilfe der ABC-Methode mit dem Chromophor DAB durchgeführt wurde. Beide Erstantikörper führten zu den gleichen Ergebnissen, die wir mit Hilfe von spezifischen Negativ- und Positivkontrollen verifizierten. Für die Positivkontrolle wurden Proben des Nervus opticus und des Bulbus olfactorius der Ratte, von denen bekannt ist, daß deren Astrozyten CNTF-Protein enthalten (Stöckli et al. 1991; Dobrea et al. 1992; Kirsch et al. 1998), mit den Antikörpern inkubiert. Die Intensität der Anfärbung bei den Positivkontrollen wurden mit dem markierten CNTF im quinolinsäurelasierten CPu verglichen. Die Intensität beider Gruppen war sehr hoch. Hingegen beobachteten wir in den scheinlasierten Hemisphären dieses Färbeverhalten nicht. Dort fanden wir nur eine schwache Immunreaktivität in der Nähe des Verlaufs der Injektionsnadel. Diese verstärkte regionale Expression von CNTF-mRNA, verursacht durch eine Stichwunde, wurde schon zuvor mittels *in situ* Hybridisation (Asada et al. 1995) beschrieben und dient als Hinweis für die Spezifität der von uns verwendeten Antikörper. Des weiteren wurde mit Hilfe des Western Blot Experiments die Spezifität eines der Erstantikörper durch Verwendung von rekombinantem Ratten-CNTF gezeigt. Das spezifische Markieren dieses Antikörpers in den Proteinlösungen von Gehirnen verschiedener Tiere wurde durch das Auftreten einer einzigen Bande auf der Höhe des Molekulargewichts von rekombinantem Ratten-CNTF dokumentiert.

In der Arbeit von Stöckli et al. (1991), welche den absoluten Gehalt an CNTF-mRNA nicht weiter quantitativ differenzierte, wurde der höchste CNTF-mRNA-Gehalt im Nervus ischiadicus beschrieben. Dagegen wurde im Vergleich zum Nervus opticus und Bulbus olfactorius, die beide ca. 20% der CNTF-mRNA des Nervus ischiadicus enthalten, der Gehalt an CNTF-mRNA im Striatum als gering angesehen. Es wurden aber keine spezifischen Angaben über den Gehalt an CNTF-Protein im adulten oder sich entwickelnden Striatum der Ratte gemacht.

In den Studien von De Almeida et al. (2001) und Regulier et al. (2002) wurde ein enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) angewandt, um den CNTF-Proteingehalt im Striatum der Ratte zu bestimmen. Der ELISA wurde sowohl ohne als auch nach einer lentiviralen CNTF-Übertragung, die vor der exzitatorischen Läsion mit Quinolinsäure stattgefunden hatte, durchgeführt. In beiden Studien war der CNTF-Proteingehalt der Kontrollstriata ($n = 3$, De Almeida et al. 2001; $n = 2$, Regulier et al. 2002) unter dem Detektionsniveau. Dennoch war in der ersten Studie der CNTF-Proteingehalt nach der lentiviralen Übertragung in das Striatum $0,94 \pm 0,33$ ng mg⁻¹ Protein und in der zweiten Studie $13,1 \pm 0,8$ ng mg⁻¹, in Abhängigkeit vom Verhältnis der injizierten Vektoren, welches 1:1 oder 1:5 (TRE-CNTF:PGK.tTA Lentiviren) betrug. Des weiteren führte in beiden Studien die Behandlung der Tiere mit lentiviralen Mechanismen zu neuronalem Schutz des striatalen Gewebes und zur Abnahme der Apomorphin-induzierten Rotationen. Der CNTF-Proteingehalt, den wir durch Western Blot im intakten CPu ($0,55 \pm 0,16$ ng mg⁻¹ Protein) und im scheinläsionierten CPu ($0,68 \pm 0,25$ ng mg⁻¹ Protein) ermittelt haben, scheint unterhalb des detektierbaren Niveaus für CNTF zu liegen, wie auch von De Almeida et al. (2001) und Regulier et al. (2002) für deren Kontrollgewebe unter Verwendung des ELISA beschrieben. In unserer Versuchsanordnung beobachteten wir einen Monat nach Quinolinsäureläsion einen CNTF-Proteingehalt von $2,76 \pm 1,71$ ng mg⁻¹ Protein im CPu, welches eindeutig gegenüber den intakten Kontrollen erhöht ist, aber dennoch unterhalb des von Regulier et al. (2002) beschriebenen Proteingehalts der lentivirale beeinflussten Striata liegt.

Der durch Immunhistochemie geführte Nachweis einer ausgeprägten zeitabhängigen lokalen CNTF-Erhöhung zwischen 14 Tagen und 29 Tagen nach Quinolinsäureläsion erklärt, warum ein neuroprotektiver Effekt des endogenen CNTF-Protein in unserem Läsionsmodell, zu einem Zeitpunkt als die striatalen Neurone schon dem Zelltod erlegen waren, nicht beobachtet werden konnte (Beal et al. 1986; DiFiglia, 1990). Die Rolle der endogenen CNTF-Proteinexpression zu diesem späten Zeitpunkt steht möglicherweise mit der Astrogliose und Bildung der Glianarbe in Verbindung. In einer Studie von Lee et al. (2000) wurde bewiesen, daß CNTF astrozytische Differenzierung oder Gliose induziert. Dieser Effekt des CNTF wurde in vitro bei der Differenzierung neuraler Stammzellen (Sun et al. 2001), in O-2A-immunoreaktiven Progenitorzellen (Hughes et al. 1988), für radiäre Gliazellen in kortikalen Schnittkulturen (Hasling et al. 2003) und bei differenzierenden embryonalen Stammzellen der Maus (Barberi et al. 2003) gezeigt. Forschungsergebnisse an Gehirnen von Mäusen, bei denen eine Überproduktion von CNTF zu beobachten war, zeigten einen Anstieg der GFAP-Immunoreaktivität und eine Hypertrophie der Astrozyten, im Vergleich zu deren nicht

transgenen Wurfgeschwistern (Winter et al. 1995). Die stereotaktische Injektion von CNTF in Wildtyp-Mäusen führte auch zu einer gliotischen Reaktion mit Anstieg der GFAP-Immunoreaktivität 24 Stunden nach Injektion. Dagegen konnte die Injektion von durch Wärme deaktiviertem CNTF einen solchen Effekt nicht hervorrufen (Winter et al. 1995). Vergleichbare Ergebnisse ergaben auch Studien mit Ratten (Clatterbuck et al. 1996).

Die Datenlage zum Mechanismus, wie CNTF eine reaktive Gliose induziert, ist bisweilen noch unklar und läßt keine schlüssige Erklärung zu. Ob CNTF direkt oder über andere Zelltypen reaktive Astrozyten erzeugt, bleibt noch zu klären. Es ist auch noch nicht bekannt, ob diese CNTF-induzierten reaktiven Astrozyten aus vorbestehenden Astrozyten oder aus Gliavorträgerzellen entstanden sind. CNTF fördert die Expression von GFAP und die Formung von astrozytischen Morphologien bei kultivierten Gliaprogenitorzellen (Lillien & Raff, 1990). Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass sich ein analoger in vivo Gliavorträgerzelltyp ähnlich auf CNTF reagiert und sich in eine Zelle differenziert, die viel GFAP exprimiert. Alternativ könnte sich CNTF auch direkt an reife Astrozyten binden und dann ein Signal für die Veränderung der zellulären Morphologie geben, sodass charakteristische reaktive Astrozyten entstehen. Von Rudge et al. (1994) wurden Daten veröffentlicht, die diese Theorie unterstützen. Astrozyten des Hippokampus besitzen einen funktionellen dreiteiligen CNTF-Rezeptorkomplex, sodass bei Exposition mit CNTF intrazellulär die gp130 Untereinheit phosphoryliert wird. Des Weiteren wurde gezeigt, daß bei physischen Verletzungen des Kortex die Synthese der CNTF-Rezeptor α -Untereinheit in Astrozyten ansteigt. Das könnte ein Beweis sein, daß CNTF eine physiologische Funktion bei der Signalgebung während der Astrozyten-gesteuerten Reaktion auf Verletzung hin hat. Bisher konnte nicht sicher nachgewiesen werden, ob Mikroglia/Hirnmakrophagen CNTF-Rezeptoren besitzen. Bewiesen ist aber das Fehlen solcher Rezeptoren bei peritonealen Makrophagen (Rudge et al., 1994).

In weiteren Studien wurde gezeigt, daß sich die dramatischen Veränderungen des CNTF-Gehalts nach neuronalem Trauma (Ip et al., 1993; Asada et al. 1995) oder nach Ischämie (Park et al., 2000) auf die Astrozyten proximal des Schadens beschränkt. Somit ist die vermutete Funktion der Astrozyten, denen der posttraumatische Erhalt und das Wiederherstellen neuronaler Funktionen zuzuordnen ist, bestätigt. Ein zusätzlicher Beweis, daß CNTF als Reaktion auf Verletzung oder anderen Stressfaktoren in Erscheinung tritt, ist die Tatsache, dass Mäuse, die homozygot für ein inaktiviertes CNTF-Gen sind, sich normal entwickeln und initial gut gedeihen. Erst später, wenn sie ausgewachsen sind, zeigen sie einen nur milden Verlust von Motoneuronen und Muskelschwäche. Auf diesen Beobachtungen basiert die

Theorie, daß CNTF nicht essentiell für die neuronale Entwicklung ist, sondern als Antwort auf Verletzung oder anderem Stress agiert (Masu et al., 1993; Sendtner et al., 1996). Endogenes, zytosolisches CNTF in myelinierenden Schwann-Zellen kann auch als Läsionsfaktor fungieren, nachdem es in adulten Mäusen nach Motoneuron-Axotomie sezerniert wird (Sendtner et al., 1997). Des weiteren schützt das Verabreichen von CNTF vor dem Verlust von cholinergen (Hagg et al., 1992), dopaminergen (Hagg & Varon, 1993), GABA-ergen (Anderson et al., 1996) und thalamikokortikalen (Clatterbuck et al., 1996) Neuronen in verschiedene Modellen von neurodegenerativen Erkrankungen. Daraus lässt sich schlussfolgern, daß die Gabe von CNTF zum geschädigten Nervensystem ein Ansatz für die Behandlung der Verhaltens- und neuroanatomischen Veränderungen bei neurologischen Erkrankungen sein könnte.

In einer anderen Studie, die von Kahn et al. (1995) durchgeführt wurde, induzierte die Infusion von CNTF ins neonatale Rattenhirn eine Hochregulation von GFAP bei den Empfängern. Eine CNTF-Überexpression, zum Beispiel im Striatum von Ratten, die durch Adenovirus-vermittelte Genübertragung hervorgerufen wurde, führte auch zu einer Erhöhung der GFAP-Immunoreaktivität und zu einem hypertrophierten Phänotyp in Astrozyten (Lisovoski et al. 1997).

Unsere Ergebnisse liefern wichtige Informationen bezüglich Strategien für Zellersatz, neurale Stammzellen eingeschlossen, die für die Behandlung von Chorea Huntington diskutiert werden (Björklund & Lindvall, 2000). Petersen et al. (1999) untersuchten den Einfluß von CNTF auf das Überleben von transplantierten Zellen, welche von dem lateralen Ganglienbügel von 14 Tage alten Ratten gewonnen worden sind und in das CPu von Ratten transplantiert wurden, die 14 Tage zuvor eine Quinolinsäureläsion erhalten hatten. Interessanterweise fanden sie heraus, daß Zellsuspensionen, die etwa 0,6 ng CNTF pro Injektion enthielten (3 µl Suspension *in toto*), nicht besser überlebten als Zellen von Kontrolltransplantaten, bei denen kein CNTF zugeführt wurde. Vergleichen wir diese Ergebnisse mit unserer Studie, könnte der hohe Anteil an endogenem CNTF, welcher möglicherweise selbst schon maximale überlebenssteigernde Effekte auf transplantierte Zellen ausübt, eine Erklärung für das Misslingen des signifikanten Schutzes der von Petersen und Mitarbeiter transplantierten Zellen sein. Leider haben sie ausschließlich Marker für Neurone verwendet und untersuchten nicht die Expression von Gliamarkern in ihrer Studie, so daß keine Aussage über die Veränderungen der Astrozyten und deren Gliose gemacht werden konnte.

Der laterale Ganglienbügel bei E14 Ratten enthält neurale Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in verschiedene Zellarten des ZNS zu differenzieren (Cattaneo & Conti, 1998; Zhou & Chiang, 1998). Es könnte von Interesse sein, in wie weit Unterschiede hinsichtlich der Differenzierung in die verschiedenen Zelllinien existieren. Die Frage ist, ob vergleichsweise mehr GFAP-positive Astrozyten aus neuronalen Stammzellen, die in quinolinsäureläsionierte Hemisphären transplantiert worden sind, entstehen oder sich mehr GFAP-positive Astrozyten bei der Transplantation in intakte Hemisphären entwickeln, als Folge des hohen Gehalts an endogenem CNTF, das durch das exzitatorische Ereignis exprimiert wurde. In anderen Transplantationsexperimenten zeigte sich, daß Nestin-positive Temperatur-sensitiv immortalisierte neurale Stammzellen, die ins Striatum von Ratten 2 Wochen vor einer exzitatorischen Läsion mit Ibotensäure transplantiert worden sind, vorzugsweise in GFAP-positive Zellen differenzierten (Lundberg & Björklund, 1996). Da keine Daten bezüglich des CNTF-Gehalts im Gehirn von Chorea Huntington Patienten vorhanden sind, ist unklar, welche Reparaturprozesse endogenes CNTF an transplantierten Zellen, die man bei Patienten mit Chorea Huntington transplantieren würde, in Gang setzen könnte. Und vielleicht könnte exogen zugeführtes CNTF eine Differenzierung von transplantierten fetalen Progenitor-/Stammzellen induzieren. Astrogliose, hauptsächlich in den Basalganglien, ist eines der Merkmale bei Chorea Huntington (Selkoe et al. 1982; Leigh et al. 1985), deshalb würde eine Studie, die sich mit den verschiedenen neurotrophinen Faktoren bei Chorea Huntington beschäftigt, von großem Interesse sein, denn es ist zum Beispiel bekannt, daß die Expression von GDNF und auch CNTF in der Substantia nigra bei Patienten mit Morbus Parkinson unterdrückt ist (Chauhan et al. 2001).

4.3 Klinische Studien mit CNTF

Aktuelle klinische Studien haben die Sicherheit und Verträglichkeit von CNTF-produzierenden Zellen (0,15-0,50 µg CNTF/Tag), welche in den lateralen Ventrikel von Chorea Huntington Patienten implantiert worden waren, ermittelt (Bachoud-Levi et al., 2000; Bloch et al., 2004). Mit Hilfe von neuropsychologischen, motorischen, neurologischen und neurophysiologischen Tests wurden die Chorea Huntington Symptome der Patienten analysiert und die striatale Pathologie mit MRI und PET-Scan überwacht.

Sechs Patienten mit Stadium 1 oder 2 der Chorea Huntington Erkrankung wurde eine Kapsel in den rechten lateralen Ventrikel implantiert, welche über 2 Jahre alle 6 Monate erneuert

wurde. Während der Studie waren keine Anzeichen einer CNTF-induzierten Toxizität zu erkennen, wobei bei 3 Probanden nach Absetzen der Therapie Depressionen auftraten, was aber auch auf das Fehlen jedweder weiterer therapeutischer Optionen zurückgeführt werden kann. Die Fortschritte, die man in den elektrophysiologischen Untersuchungsergebnissen beobachtete, korrelierten mit den Kapseln, die die größte Menge an CNTF freigelassen haben. Diese Phase 1 Studie zeigt die Sicherheit, Durchführbarkeit und Verträglichkeit einer solchen Infusionstherapie.

Während der CNTF induzierte Erhalt der striatalen Neurone und der Erhalt des intrinsischen Schaltkreises in Tiermodellen von Chorea Huntington beeindruckend ist, so konnte dieser Effekt jedoch beim Menschen nur geringergradig bei Nagetieren beobachtet werden. Bei den Primaten ist der wirksame Schutz von CNTF auf das Gebiet in der Nähe der implantierten Kapseln beschränkt. Somit ist der Bereich der Läsion noch riesig, und es ist sehr wahrscheinlich, daß die Diffusion von CNTF aus den Kapseln nicht suffizient genug ist, um weiter distal gelegene degenerierende Regionen zu schützen (Emerich & Thanos, 2006). Diese These wird durch eine Versuchsreihe unterstützt, welche die Effekte von intraventrikulär platzierten CNTF-Implantaten bei Primatenmodellen für Chorea Huntington untersucht. Im Gegensatz zu den Kapseln, die direkt ins Hirnparenchym implantiert worden sind, versagten die intraventrikulären gelegenen Implantaten beim Schutz von Neuronen jeden Zelltyps des Striatums (Kordower et al., 1999). Diese Beobachtungen bestärken die Hypothese, daß die Diffusion eine Schlüsselrolle bei Effektivität dieser experimentellen Therapieansatzes spielt.

Das komplette Fehlen an Neuronenschutz durch intraventrikulär platzierte Transplantate in Primaten sollte in den geplanten klinischen Studien, bei denen eingekapselte Zellen in den lateralen Ventrikel von Chorea Huntington Patienten implantiert werden, mehr Beobachtung finden. Da humane Studien klinisch relevante positive Effekte zum Ziel haben, stellt die Erhöhung der CNTF Lieferung einen wichtigen Faktor für den Erfolg dieser Studien dar. Ob die Transplantation einer größeren Menge an Kapseln, die Veränderung des Vektorsystems dieser CNTF-liefernden Zellen, bzw. die Veränderung des verwendeten Zelltyps oder die Veränderung der Eigenschaften der Polymermembran letztlich zu einer erhöhten Quantität an CNTF führen kann, bleibt noch abzuwarten.

4.4 Schlussfolgerung

Unsere Studie liefert Ergebnisse, die zeigen, daß in einem Quinolinsäuremodell die verschiedenen neuroanatomischen Veränderungen, die bei Chorea Huntington auftreten, reproduziert werden. Zudem konnten wir eine signifikante Erhöhung des CNTF-Proteingehalts über die Zeit im läsionierten CPu nachweisen und zeigen, daß das CNTF-Protein in Zellen exprimiert wird, die die Morphologie von protoplasmatischen Astrozyten haben. Die regulatorische Überproduktion von CNTF scheint mit der Formation der Glianarbe im läsionierten CPu zu korrelieren. Ob und wie eine CNTF-Expression von Astrozyten neuronalen Zelltod verhindert und ob sie neuronale oder gliale Differenzierung *in vivo*, insbesondere bei Stammzelltransplantaten, induziert, muß noch in kommenden Studien erforscht werden, um uns einen Schritt im Kampf gegen neurodegenerative Erkrankungen voranzubringen.

Die Polyglutaminexpression bei Chorea Huntington erlaubt eine eindeutige Diagnose der Erkrankung schon bei Kindern und sogar im Uterus (Huntington's Disease Collaborative Group, 1993). Der dadurch möglichen Frühdiagnostik kommt eine entscheidende Bedeutung zu, da bei eventueller neuroprotektiver Behandlung von Patienten mit Chorea Huntington vor der Entwicklung von substantieller Neurodegeneration und Verhaltensänderungen eine Vermeidung von strukturellen Hirnschäden möglich erscheint. Sollte man diese therapeutischen Möglichkeiten in der Zukunft umsetzen können, wäre eine Anwendung in Kombination mit anderen Therapiemaßnahmen durchaus denkbar. Demzufolge könnte die neuronale Zytarchitektur und die Physiologie des Striatums erhalten werden und dadurch der Entwicklung von Symptomen der Erkrankung zuvorgekommen werden (Kordower et al., 1999).

Es ist erforderlich, einige konkrete Ziele in der Grundlagenforschung zu erreichen, um eine kausale neuroprotektive Therapie für Chorea Huntington zu entwickeln. Dabei ist das größte Ziel, dem Verlust von GABA-ergen Medium Spiny Neuronen des Striatums vorzubeugen, welches das zentrale pathologische Merkmal bei Chorea Huntington ist. Der Erhalt der Nervenzellen sollte mit dem Erhalt der normalen Projektionen dieser Neuronen einher gehen. Es ist offensichtlich, daß eine Intervention von nur geringem Erfolg sein kann, wenn beim Erhalt der GABA-ergen Neuronen die Projektionen zum Globus pallidus und zur Substantia nigra pars retikularis ausgespart werden.

Klinisch ist es unumgänglich, sowohl die motorischen als auch die kognitiven Defizite therapeutisch zu erfassen. Nur das Reduzieren der motorischen Veränderungen, ohne die

Persönlichkeitsveränderungen, die Demenz und Psychosen mit einzubeziehen, wäre von geringem Nutzen. Während die striatale Degeneration eindeutig mit den motorischen Veränderungen bei Chorea Huntington verbunden ist, sind die Veränderungen im ZNS, die in kognitive Defizite resultieren, weniger klar. Sie könnten das Ergebnis von Dysfunktionen in den Basalganglien und/oder dem Kortex sein (Emerich & Thanos, 2006). Nichtsdestotrotz müssen die striatalen Neuronen und deren afferenten und efferenten Projektionen, die kortikalen Projektionen mit eingeschlossen, geschützt werden, um das Potential egal welcher neuroprotektiven Strategie zu maximieren und die motorischen und nicht-motorischen Veränderungen bei Chorea Huntington zu verhindern.

Literaturverzeichnis

Adler R (1993) Ciliary neurotrophic factor as an injury factor. *Neurobiology* 3: 785-789

Alberch J, Perez-Navarro E, Canals JM (2002) Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res Bull* 57: 817-822

Amaducci L, Forno KI, Eng LF (1981) Glial fibrillary acidic protein in cryogenic lesions of the rat brain. *Neurosci Lett* 21: 27-32

Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G et al. (1994) Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to expanded CAG repeat. *Somat Cell Mol Genet* 20: 27-38

Anderson KD, Panayotatos N, Corcoran TL, Lindsay RM, Wiegand SJ (1996) Ciliary Neurotrophic Factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7346-7351

Aronin N, Kim M, Laforet G DiFiglia M (1999) Are there multiple pathways in the pathogenesis of Huntington's disease? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 995-1003

Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431: 805-810

Asada H, Ip NY, Pan L, Razack N, Parfitt MM, Plunkett RJ (1995) Time course of ciliary neurotrophic factor mRNA expression is coincident with the presence of protoplasmic astrocytes in traumatized rat striatum. *J Neuroscience Res* 40: 22-30

Asan E, Langenhan T, Holtmann , Bock H, Sendtner M, Carroll P (2003) Ciliary neurotrophic factor in the olfactory bulb of rats and mice. *Neurosci* 120: 99-112

Bachoud-Lévi A-C, Déglon N, Nguyen J-P, Bloch J, Bourdet C, Winkel L et al. (2000) Clinical Protocol: Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using polymer encapsulated BHK cell line engeneered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther* 11: 1723-1729

Bae BI, Xu H, Igarashi S et al. (2005) P53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. New York: Oxford University Press, pp 348-362

Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, et al. (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nature Biotechnol* 21: 1200-1207

Bates GP, Benn C (2002) The polyglutamine disease: In: Bates G, Harper P, Jones L, eds. Huntington's disease. New York: Oxford University Press, pp 429-474

Bazan JF (1991) Neuropoietic cytokines in the haematopoietic fold. *Neuron* 7: 197-208

Beal MF (1994) Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease. *Curr Opin Neurol* 7: 542-547

Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz DW, Martin JB (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321: 168-171

Beal MF, Matson WR, Storey E, Milbury P, Ryan EA, Ogawa T, Bird ED (1992) Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *J Neurol Sci* 108: 80-87

Bignami A, Dahl D (1976) The astroglial response to stabbing. Immunofluorescent studies with antibodies to astrocyte-specific protein (GFA) in mammalian and submammalian species. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2: 99-110

Bird E.D. und Coyle J.T. (1986) Huntington's disease. Clinical Neurochemistry. Academic Press, London, pp 1-57

Björklund A, Lindvall O (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature Neurosci* 3: 537-544

Björklund A, Campbell K, Sirinathsingji DJ, Fricker RA, Dunnett SB (1994) Functional capacity of striatal transplants in rat Huntington model. In Dunnett SB & Björklund A (eds), *Functional neural transplantation*. Raven Press, New York, pp 157-95

Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Nguyen JP, Bourdet C, gaura V, Rémy P, Brugières P, Boissé M-F, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski M (2004) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engeneered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase 1 study. *Hum Gene Ther* 15: 968-975

Brandt J, Strauss ME, Larus J, Jensen B, Folstein SE, Folstein MF (1984) Clinical correlates of dementia and disability in Huntington's disease. *J Clin Neuropsychol* 6: 401-412

Bresjanac M, Antauer G (2000) Reactive astrocyte of the quinolinic acid-lesioned rat striatum express GFRalpha1 as well as GDNF in vivo. *Exp Neurol* 164: 53-59

Butters N, Sax D, Montgomery K, Tarlow S (1978) Comparison of neuropsychological deficits associated with early and advanced Huntington's disease. *Arch Neurol* 35: 585-589

Caine ED, Shoulson I (1983) Psychiatric syndromes in Huntington's disease. *Am J Psychiatry* 140: 728-733

Caine ED, Hunt RD, Weingartner H, Ebert MH (1978) Huntington's dementia: clinical and neuropsychological features. *Arch Gen Psychiatry* 35: 377-384

Campbell K, Gotz M (2002) Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci* 25: 235-238

Canals JM, Marco S, Checa N, Michels A, Perez-Navarro E, Arenas E, et al. (1998) Differential regulation of the expression of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 after excitotoxicity in a rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 5: 357-364

Cattaneo E, Conti L (1998) Generation and characterization of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A cells. *J Neurosci Res* 53: 223-234

Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM (2001) Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat* 21: 277-288

Checa N, Canals JM, Alberch J (2000) Developmental regulation of BDNF and NT-3 expression by quinolinic acid in the striatum and its main connections. *Exp Neurol* 165: 118-124

Clatterbuck RE, Price DL, Koliatsos VE (1996) Ciliary neurotrophic factor stimulates the expression of glial fibrillary acidic protein by brain astrocytes in vivo. *J Comp Neurol* 369: 543-551

Craufurd D, Snowden J (2002) Neuropsychological and neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *Am J Psychiatry* 162: 725-731

Dallner C, Woods AG, Deller T, Kirsch M, Hofmann H-D (2002) CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* 37: 374-378

Darey FL, Aronson AE, Brown JR (1975) Motor speech disorders. Philadelphia: W.B. Saunders

Davies SW, Turmaine M, Cozens BA et al. (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90: 537-548

Davies SW, Sathasivam K, Hobbs C, Doherty P, Mangiarini L, Scherzinger E, Wanker EE, Bates GP (1999) Detection of polyglutamine aggregation in mouse models. *Methods Enzymol* 309: 687-701

De Almeida LP, Zala D, Aebischer P, Déglon N (2001) Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 8: 433-446

Debus E, Weber K, Osborn M (1983) Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation* 25: 193-203

Dewhurst K, Oliver JE, Trick K, McKnight AL (1969) Neuropsychiatric aspects of Huntington's disease. *Confina Neurologica* 31: 258-268

DiFiglia M (1990) Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. *Trends Neurosci* 13: 286-289

DiProspero NA, Chen EY, Charles V, Plomann M, Kordower JH (2004) Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements. *J Neurocytol* 33: 517-533

Divac I, Markowitsch HJ, Pritzel M (1978) Behavioral and anatomical consequences of small intrastriatal injections of kainic acid in the rat. *Brain Res* 151: 523-532

Dobrea GM, Unnerstall JR, Rao MS (1992) The expression of CNTF message and immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Dev Brain Res* 66: 209-219

Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97: 703-716

Dunnett SB, Isacson O, Sirinathsinghji DJ, Clarke DJ, Björlund A (1988) Striatal grafts in rats with unilateral neostriatal lesions—III. Recovery from dopamine-dependent motor asymmetry and deficits in skilled paw reaching. *Neuroscience* 24: 813-820

Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurological disease. *Neuroscience* 54: 15-36

Emerich DF, Thanos CG (2006) Intracompartmental delivery of CNTF as therapy for Huntington's disease and Retinitis pigmentosa. *Curr Gene Ther* 6: 147-159

Emerich DF, Hammang JP, Baetge EE, Winn SR (1994) Implantation of polymer-encapsulated human nerve growth factor-secreting fibroblasts attenuates the behavioral and neuropathological consequences of quinolinic acid injections into rodent striatum. *Exp Neurol* 130: 141-150

Emerich DF, Cain CK, Greco C, Saydoff JA, Yi Hu Z, Liu H et al. (1997a) Cellular delivery of human CNTF prevents motor and cognitive dysfunction in a rodent model of Huntington's disease. *Cell Transplant* 6: 249-266

Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen E-Y, Chu Y et al. (1997b) Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 386: 395-399

Emerich DF, Bruhn S, Chu Y, Kordower JH (1998) Cellular delivery of CNTF but not NT-4/5 prevents degeneration of striatal neurons in a rodent model of Huntington's disease. *Cell Transplant* 7: 213-225

Eng LF (1980) The glial fibrillary acidic (GFA) protein. In: Bradshaw RA, Schneider DM (eds) *Proteins of the nervous system*. 2nd ed, Raven Press, New York, pp 85-117

Eng LF, Kosek JC (1974) Light and electron microscopic localization of the glial fibrillary acidic protein and S-100 protein by immunoenzymatic techniques. *Trans Am Soc Neurochem* 5: 160

Eng LF, Lee YL (1995) Intermediate filaments in astrocytes. In: Ransom BR, Kettenman H (eds) *Neuroglial cells*. Oxford University Press, New York, pp 650-667

Eng LF, Vanderhaegen JJ, Bignami A, Gerstl B (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28: 351-354

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 25: 1439-1451

Eriksson P, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Nat Med* 4: 1313-1317

Folstein SE (1989) Huntington's disease: a disorder of families. Baltimore MD: The John Hopkins University Press

Folstein SE, Abbott MH, Chase GA, Jensen BA, Folstein MW (1983) The association of affective disorder with Huntington's disease in a case series and in families. *Psychol Med* 13: 537-542

Fonnum F, Storm-Mathisen J, Divac I (1981) Biochemical evidence for glutamate as neurotransmitter in corticostriatal and corticothalamic fibres in rat brain. *Neuroscience* 6: 863-873

Foroud T, Gray J, Ivashina J, Conneally PM (1999) Differences in duration of Huntington's disease based on age of onset. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66: 52-56

Franke FE, Schachenmeyr W, Osborn M, Altmannsberger M (1991) Unexpected immunoreactivities of intermediate filament antibodies in human brain and brain tumors. *Am J Pathol* 139: 67-79

Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, Ray J (1995) Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11897-11883

Gardian G, Browne SE, Choi DK et al. (2005) Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Biol Chem* 280: 556-563

Geschwind DH, Perlman S, Figueroa KP et al. (1997) The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 60: 842-850

Giess R, Goetz R, Schrank B, Ochs G, Sendtner M, Toyka K (1998) Potential implication of a ciliary neurotrophic factor gene mutation in a German population of patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve* 21: 236-238

Giess R, Maurer M, Linker R, Gold R, Warmuth-Metz M, Toyka KV, Sendtner M, Rieckmann P (2002) Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 59: 407-409

Girotti F, Marano R, Soliveri P, Geminiani G, Scigliano G (1988) Relationship between motor and cognitive disorders in Huntington's disease. *J Neurology* 235: 454-457

Gomez-Tortosa E, MacDonald ME, Friends JC et al (2001) Quantitative neuropathological changes in presymptomatic Huntington's disease. *Ann Neurol* 49: 29-34

Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science* 227: 770-773

Gutekunst C, Norflus F, Hersch S (2002) The neuropathology of Huntington's disease. In: Bates G, Harper P, Jones L, eds. *Huntington's disease*. New York: Oxford University Press, pp 251-275

Guthrie KM, Woods AG, Nguyen T, Gall CM (1997) Astroglial ciliary neurotrophic factor mRNA expression is increased in fields of axonal sprouting in deafferented hippocampus. *J Comp Neurol* 386: 137-148

Haas SJP, Bauer P, Rolfs A, Wree A (2000) Immunocytochemical characterization of in vitro PKH26-labelled and intracerebrally transplanted neonatal cells. *Acta Histochem* 102: 273-280

Haas SJP, Ahrens A, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of CNTF. *J Anat* 204: 271-281

Hagg T, Varon S (1993) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6315-6319

Hagg T, Quon D, Higaki J, Varon S (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. *Neuron* 8: 145-158

Hague SM, Klaffke S, Bandmann O (2005) Neurodegenerative disorders: Parkinson's disease and Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 1058-1063

Hantraye P, Riche D, Maziere M, Isacson O (1990) A primate model of Huntington's disease: Behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions in the caudate-putamen in the baboon. *Exp Neurol* 108: 91-104

Hasling TA, Gierdalski M, Jablonska B, Juliano SL (2003) A radialization factor in normal cortical plate restores disorganized radial glia and disrupted migration in a model of cortical dysplasia. *Eur J Neurosci* 17: 467-480

Heathfield KWG (1967) Huntington's chorea: investigation into the prevalence of this disease in the area covered by the North East Metropolitan Regional Hospital Board. *Brain* 90: 203-232

Hefti F (1994) Neurotrophic factor therapy for nervous system degenerative diseases. *J. Neurobiol* 25: 1418-1435

Heinsen H, Rub U, Bauer M et al. (1999) Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 97: 613-622

Henderson JT, Seniuk NA, Roder JC (1994) Localization of CNTF immunoreactivity to neurons and astroglia in the CNS. *Mol Brain Res* 22: 151-165

Ho LW, Carmichael J, Swartz J, Wyttenbach A, Rankin J, Rubinsztein DC (2000) The molecular biology of Huntington's disease. *Psychol Med* 31: 3-14

Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M (1988) Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 335: 70-72

Huntington Study Group (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable in Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72: 1-18

Huntington Study Group (2001) A randomized, placebo-controlled trial of coenzym Q10 and remicamide in Huntington's disease. *Neurology* 57: 397-404

Huntington Study Group (2006) Tetrabenazine as antichorea therapy in Huntington's disease: a randomized controlled trial. *Neurology* 66: 366-372

Ip NY, Yancopoulou GD (1996) The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factor. *Annu Rev Neurosci* 19: 491-515

Ip NY, Wiegand SJ, Morse J, Rudge JS (1993) Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 5: 25-33

Isacson O, Dunnett SB, Björklund A (1986) Graft-induced behavioral recovery in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2728-2732

Isacson O, Fischer W, Wictorin K, Dawbarn D, Björklund A (1987) Astroglial response in the excitotoxically lesioned neostriatum and its projection areas in the rat. *Neuroscience* 20: 1063-1056

Jeste DV, Barban L, Parisi J (1984) Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease. *Exp Neurol* 85: 78-86

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96: 25-34

Joshiassen RC, Curry LM, Mancall EL (1983) Development of neuropsychological deficits in Huntington's disease. *Arch Neurol* 40: 791-796

Kahn MA, Ellison JA, Speight GJ, de Vellis J (1995) CNTF regulation of astrogliosis and activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* 685: 55-67

Kahn MA, Ellison JA, Chang RP, Speight GJ, de Vellis J (1997) CNTF induces GFAP in a S-100 alpha brain cell population: the pattern of CNTF-alpha suggests an indirect mode of action. *Dev Brain Res* 98: 221-233

Kanazawa I, Tanaka Y, Cho F (1986) 'Choreic' movement induced by unilateral kainate lesion of the striatum and L-DOPA administration in monkey. *Neurosci Lett* 71: 241-246

Kaytor MD, Wilkinson KD, Warren ST (2004) Modulating huntingtin half-life alters polyglutamine-dependent aggregate formation and cell toxicity. *J Neurochem* 89: 961-973

Kirsch M, Schneider T, Lee M-Y, Hofmann H-D (1998) Lesion induced changes in the expression of ciliary neurotrophic factor and its receptor in rat optic nerve. *Glia* 23: 239-248

Kordower JH, Yaping-Chu, MacLennan AJ (1997) Ciliary neurotrophic factor receptor α -immunoreactivity in the monkey central nervous system. *J Comp Neurol* 377: 365-380

Kordower JH, Iacson O, Emerich DF (1999) Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's Disease: Is neuroprotection possible? *Exp Neurol* 159: 4-20

Komure O, Sano A, Nishino N et al. (1995) DNA analysis in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy: correlation between CAG-repeat length and phenotypic variation and the molecular basis of anticipation. *Neurology* 45: 143-149

Kremer HP (1992) The hypothalamic lateral tuberal nucleus: normal anatomy and changes in neurological diseases. *Prog Brain Res* 93: 249-261

Kremer HP, Roos RA, Dingjan GM, Bots GT, Bruyn GW, Hofman MA (1991) The hypothalamic lateral tuberal nucleus and the characteristics of neuronal loss in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 132: 101-104

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lam A, Fuller F, Miller J, Kloss J, Manthorpe M, Varon S et al. (1991) Sequence and structural organization of the human gene encoding ciliary neurotrophic factor. *Gene* 102: 271-276

Lange H, Thörner G, Hopf A, Schröder KF (1976) Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic diseases. *J Neurol Sci* 28: 401-425

Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13883-13888

Lee JC, Mayer-Proschel M, Rao MS (2000) Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30: 105-121

Lee MY, Deller T, Kirsch M, Frotscher M, Hofmann H-D (1997) Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor α expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *J Neurosci* 17: 1137-1146

Leigh RJ, Newman SA, Folstein SE, Lasker AG, Jensen BA (1983) Abnormal ocular motor control in Huntington's disease. *Neurology* 33: 1268-1275

Leigh RJ, Parhad IM, Clark AW, Buettner-Ennever JA, Folstein SE (1985) Brainstem findings in Huntington's disease. Possible mechanisms for slow vertical saccades. *J Neurol Sci* 71: 247-256

Levison SW, Ducceschi MH, Young GM, Wood TL (1996) Acute exposure to CNTF in vivo induces multiple components of reactive gliosis. *Exp Neurol* 141:256-268

Levitt P, Rakic P (1980) Immunoperoxidase localization of glial fibrillary protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* 193: 815-840

Liao J, Xu X, Wargovich MJ (2000) Direct reprobing with anti-beta-actin antibody as an internal control for western blotting analysis. *Biotechniques* 28: 216-218

Lillien LE, Raff MC (1990) Differentiation signals in the CNS: Type-2 astrocyte development in vitro as a model system. *Neuron* 5: 111-119

Lin LF, Mismer D, Lile JD, Armes LG, Butler ET, Vannice JL, Collins F (1998) Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 246: 1023-1025

Lisovoski F, Akli S, Peltekian E, Vigne E, Haase G, Perricaudet M et al. (1997) Phenotypic alteration of astrocytes induced by Ciliary Neurotrophic Factor in intact adult brain, as revealed by adenovirus-mediated gene transfer. *J Neurosci* 17: 7228-7236

Logan A, Berry M, Gontalez AM, Frautschy SA, Sporn MB, Baird A (1994) Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci* 6: 355-363

Lundberg C, Björklund A (1996) Host regulation of glial markers in intrastriatal grafts of conditionally immortalized neural stem cell lines. *Neuroreport* 7: 847-852

MacDonald V, Halliday G (2002) Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 10: 378-386

MacDonald V, Halliday GM, Trent RJ, McCusker EA (1997) Significant loss of pyramidal neurons in the angular gyrus of patients with Huntington's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 492-495

MacLennan AJ, Vinson EN, Marks L, McLaurin D, Pfeifer M, Lee N (1996) Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor α in the rat nervous system. *J Neurosci* 16: 621-630

Mahant N, McCusker EA, Byth K, Graham S (2003) Huntington's disease: clinical correlates of disability and progression. *Neurology* 61: 1085-1092

Malatesta P, Hartfuss E, Götz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127: 5253-5263

Marco S, Canudas AM, Canals JM, Gavalda N, Perez-Navarro E, Alberch J (2002) Excitatory amino acids differentially regulate the expression of GDNF, neurturin, and their receptors in adult rat striatum. *Exp Neurol* 174: 243-252

Margolis RI, Ross CA (2001) Expansion explosion: new clues to pathogenesis of repeat expansion neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* 7: 479-482

Mariotti C, Castellotti B, Pareyson D et al. (2000) Phenotypic manifestations associated with CAG-repeat expansion in the androgen receptor gene in male patients and heterozygous females: a clinical and molecular study of 30 families. *Neuromuscul Disord* 10: 391-397

Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H (1993) Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365: 27-32

Mathewson AJ, Berry M (1985) Observation on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res* 327: 61-69

Mayeaux R, Stern Y, Herman A, Greenbaum L, Fahn S (1986) Correlates of early disability in Huntington's disease. *Ann Neurol* 20: 727-731

McBean GJ, Roberts PJ (1984) Chronic infusion of L-glutamate causes neurotoxicity in rat striatum. *Brain Res* 290: 372-375

McGeer EG, McGeer PL, Singh K (1978) Kainate-induced degeneration of neostriatal neurons: dependency upon corticostriatal tract. *Brain Res* 139: 281-283

McHugh PR, Folstein MF (1975) Psychiatric symptoms of Huntington's chorea: a clinical and phenomenological study. In: DF Benson, D Blumer, eds. *Psychiatric aspects of neurologic disease*. New York: Grune and Stratton, pp 151-166

Menalled LB, Chesselet M-F (2002) Mouse models of Huntington's disease. *Trends Pharmacol Sci* 23: 32-39

Menalled LB, Sison JD, Dragatsis I, Zeitlin S, Chesselet MF (2003) Time course of early motor and neuropathological anomalies in knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* 465: 11-26

Menei P, Pean JM, Nerriere-Daguin V, Jollivet C, Brachet P, Benoit JP (2000) Intracerebral implantation of NGF-releasing biodegradable microspheres protects striatum against excitotoxic damage. *Exp Neurol* 161: 259-272

Merrill JE, Benveniste EN (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 19: 331-338

Mittoux V, Joseph J-M, Conde F, Palfi S, Dautry C, Poyot T et al. (2000) Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 11: 1177-1187

Mizuno H, Shibayama H, Tanaka F et al. (2000) An autopsy case with clinical and molecular genetically diagnosed Huntington's disease with only minimal non-specific neuropathological findings. *Clin Neuropathol* 19: 94-103

Modregger J, DiProspero NA, Charles V, Tagle DA, Plomann M (2002) PACSIN 1 interacts with Huntingtin and is absent from synaptic varicosities in presymptomatic Huntington's disease brains. *Hum Mol Genet* 11: 2547-2558

Moses JA Jr, Golden CJ, Berger PA, Wisniewski AM (1981) Neuropsychological deficits in early, middle and late stage Huntington's disease as measured by the Luria-Nebraska neuropsychological battery. *Int J Neurosci* 14: 95-100

Mukai H, Isagawa T, Goyama E et al. (2005) Formation of morphologically similar globular aggregates from diverse aggregation-prone proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10887-10892

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116: 201-211

Myers RH, VonSattel JP, Paskevich PA et al. (1991) Decreased neuronal and increased oligodendroglial densities in Huntington's disease caudate nucleus. *J Neuropathol Exp Neurol* 50: 729-742

Noctor SC, Flint AC, Weisman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409: 714-720

Norman AB, Calderon SF, Giordano M, Sanberg PR (1988) Striatal tissue transplants attenuate apomorphine-induced rotational behaviour in rats with unilateral kainic acid lesions. *Neuropharmacology* 27: 333-336

Norton JC (1975) Patterns of neuropsychological test performances in Huntington's disease. *J Nerv Ment Dis* 161: 276-279

North AJ, Galazkiewicz B, Byers TJ, Glenney JR, Small JV (1993) Complementary distributions of vinculin and dystrophin define two distinct sarcolemma domains in smooth muscle. *J Cell Biol* 120: 1159-1167

Oberholzer M, Östreicher M, Christen H, Brühlmann M (1996) Methods in quantitative image analysis. *Histochem Cell Biol* 105: 333-355

O'Hearn E, Holmes SE, Calvert PC et al. (2001) SCA-12: tremor with cerebellar and cortical atrophy is associated with CAG repeat expansion. *Neurology* 56: 299-303

Park CK, Ju WK, Hofmann HD, Kirsch M, Ki KJ, Chun MH, Lee MY (2000) Differential regulation of ciliary neurotrophic factor and its receptor in the rat hippocampus following transient global ischemia. *Brain Res* 861: 345-353

Paxinos G, Watson C (1992) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York

Pérez-Navarro E, Arenas E, Marco S, Alberch J (1999) Intrastratal grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo. *Eur J Neurosci* 11: 241-249

Petersén Å, Emgård M, Brundin P (1999) Impact of a preceding striatal excitotoxic lesion and treatment with ciliary neurotrophic factor on striatal graft survival. *Brain Res Bull* 50: 275-281

Peyser CE, Folstein SE (1990) Huntington's disease as a model for mood disorders. *Mol Chem Neuropathol* 12: 99-119

Piccioni F, Simeoni S, Andriola I et al. (2001) Polyglutamine tract expansion of the androgen receptor in a motorneural model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Brain Res Bull* 56: 215-220

Podoll K, Caspary P, Lange HW, Noth J (1988) Language functions in Huntington's disease. *Brain* 111: 1475-1503

Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T et al. (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Gen* 14: 237-238

Purdon SE, Mohr E, Ilivitsky V, Jones BDW (1994) Huntington's Disease: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *J Psychiatr Neurosci* 19: 359-367

Régulier E, Pereira de Almeida L, Sommer B, Aebischer P, Déglon N (2002) Dose dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 13: 1981-1990

Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato C J, Penney JB, Young AB (1988) Differential loss of striatal projection neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5733-5737

Richardson PM (1994) Ciliary neurotrophic factor: A review. *Phar Ther* 63: 187-198

Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20: 570-577

Roberts RC, DiFiglia M (1989) Short- and long-term survival of large neurons in the excitotoxic rat caudate nucleus: a light and electron microscopic study. *Synapse* 3: 363-371

Roberts RC, DiFiglia M (1990) Evidence for synaptic proliferation, reorganization, and growth in the excitotoxic lesioned adult rat caudate nucleus. *Exp Neurol* 107: 1-10

Rubinsztein DC (2003) Molecular biology of Huntington's disease (HD) and HD-like disorders. In: Pulst S, ed. *Genetics of movement disorders*. California: Academic Press.: 365-377

Rubinsztein DC, Leggo J, Coles R, Almquist E, Biancalana V et al. (1996) Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet* 59: 16-22

Rudge JS, Li Y, Pasnikowski EM, Mattson K, Pan L Yankopoulos GD, Wiegand SJ, Lindsay RM, Ip NY (1994) Neurotrophic factor receptor and their signal transduction in rat astrocytes. *Eur J Neurosci* 6: 693-705

Rudge JS, Pasnikowski EM, Holst P, Lindsay RM (1995) Changes in neurotrophic factor expression and receptor activation following exposure of hippocampal neuron/astrocyte cocultures to kainic acid. *J Neurosci* 15: 6856-6867

Sarnat HB, Nochlin D, Born DE (1998) Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain Dev* 20: 88-94

Schoenfeld M, Myers RH, Cupples LA, et al. (1984) Increased rate of suicide among patients with Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 47 1283-1287

Schumacher JM, Short MP, Hyman BT, Breakefield XO, Isacson O (1991) Intracerebral implantation of nerve growth factor-producing fibroblasts protects striatum against neurotoxic levels of excitatory amino acids. *Neuroscience* 45: 561-570

Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219: 316-318

Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO, Köhler C (1984) Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 35: 19-32

Schwarcz R, Okuno E, White RJ, Bird ED, Whetsell W (1988) 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 4079-4081

Selkoe DJ, Salazar FJ, Abraham C, Kosik KS (1982) Huntington's disease: changes in striatal proteins reflect astrocytic gliosis. *Brain Res* 245: 117-125

Sendtner M, Carroll P, Holtmann B, Hughes RA, Thoenen H (1994) Ciliary Neurotrophic Factor. *J Neurobiol* 25: 1436-1453

Sendtner M, Götz R, Holtmann B, Escary JL, Masu Y, Carroll P, Wolf E, Brem G, Brulet P, Thoenen H (1996) Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr Biol* 6: 686-694

Sendtner M, Götz R, Holtmann B, Thoenen H (1997) Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 17: 6999-7006

Shoulson I, Odoroff C, Oakes D, Behr J, Goldblatt D, Caine E, Kennedy J, Miller C, Bamford K, Rubin A et al. (1989) A controlled clinical trial of baclofen as protective therapy in early Huntington's disease. *Ann Neurol* 25: 252-259

Spargo E, Everall IP, Lantos PL (1993) Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56: 487-491

Squitieri F, Canella M, Simonelli M (2002) CAG mutation effect on rate of progression in Huntington's disease. *Neurol Sci* 23 (Suppl 2): S107-108

Stevanin S, Durr A, Brice A (2000) Clinical and molecular advances in autosomal dominant cerebellar ataxias: from genotype to phenotype and physiopathology. *Eur J Hum Genet* 8: 4-18

Stöckli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Götz R, Lindholm D, Thoenen H (1989) Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342: 920-923

Stöckli KA, Lillien LE, Näher-Noé M, Breitfeld G, Hughes RA, Raff MC et al. (1991) Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* 115: 447-459

Sun Y, Nadal-Vincens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X et al. (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* 104: 356-376

Takahashi R, Yokoji H, Misawa H, Hayashi M, Hu J, Deguchi T (1994) A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet* 7: 79-84

Takamiya Y, Kohsaka S, Toya S, Otani M, Mikoshiba K, Tsukada Y (1986) Possible association of platelet-derived growth factor (PDGF) with the appearance of reactive astrocytes following brain injury in situ. *Brain Res* 383: 305-309

Tansey FA, Farooq M, Cammer W (1991) Glutamine synthetase in oligodendrocytes and astrocytes: new biochemical and Immunocytochemical evidence. *J Neurochem* 56: 266-272

Thoenen H, Sendtner M (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nature Neurosci* (Suppl 5): 1046-1050

Thome J, Nara K, Foley P, Michel T, Gsell W, Retz W, Rosler M, Riederer P (1997) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) genotypes: Influence on choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholine esterase (AChE) activities and neurotrophin 3 (NT3) concentration in human post mortem brain tissue. *J Brain Res* 38: 443-451

Todd AJ, Spike RC, Polgár E (1998) A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst_{2a} receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 85: 459-473

Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1997) Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal system. *Brain Res* 24: 485-493

Van Raamsdonk JM, Pearson J, Slow EJ, Hossain SM, Leavitt BR, Hayden MR (2005) Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 25: 4169-4180

VonSattel JP und DiFiglia M (1998) Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 369-242

VonSattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP (1985) Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 559-577

Walker FO (2007) Huntington's disease. *Lancet* 369: 218-228

Walker FO, Hunt VP (1989) An open label trial of dextromethorphan in Huntington's disease. *Clin Neuropharmacol* 12: 322-330

Webb M, Trzepacz PT (1987) Huntington's disease: correlation of mental status with chorea. *Soc Biol Psychiatry* 22: 751-761

Weinelt S, Peters S, Bauer P, Mix E, Haas SJP, Dittmann A et al. (2003) Ciliary neurotrophic factor overexpression in neuronal progenitor cells (ST 14A) increases proliferation, metabolic activity, and resistance to stress during differentiation. *J Neurosci* 71: 228-236

Weisenhorn DM, Roback J, Young AN, Wainer BH (1999) Cellular aspects of trophic actions in the nervous system. *Int Rev Cytol* 189: 177-265

Whetsell WO, Schwarcz R (1989) Prolonged exposure to submicromolecular concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system. *Neurosci Lett* 97: 271-275

White RF, Vasterling JJ, Koroshetz WJ, Myers R (1992) Neuropsychology of Huntington's disease. In: RF White, ed. *Clinical syndromes in adult neuropsychology: the practitioners handbook*. London: Elsevier Amsterdam, pp 213-251

Winter CG, Saotome Y, Levison SW, Hirsh D (1995) A role of ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. Proc Natl Acad Sci 92: 5865-5869

Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blümcke I (1996) NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. J Histochem Cytochem 44: 1167-1171

Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB (1988) NMDA receptor losses in Putamen from patients with Huntington's disease. Science 241: 981-983

Zhou FC, Chiang YH (1998) Long-term nonpassaged EGF-responsive neural precursor cells are stem cells. Wound Repair Regen 6: 337-348

Zuccato C, Liber D, Ramos C et al (2005) Progressive loss of BDNF in a mouse model of Huntington's disease and rescue by BDNF delivery. Pharmacol Res 52: 133-139

Anhang

1. Anhang zu Diagramm 1

In der Tabelle sind die Werte der Apomorphin-induzierten kontralateralen Rotationen von quinolinsäurelasierten Tieren dargestellt. Nur diese aufgeführten Werte gingen in die statistische Auswertung bezüglich des Rotationsverhaltens (siehe **Kapitel 3.1**) ein.

Tabelle 2: Anzahl der Rotationen aller Versuchstiere

Versuchs tier	R/min	R/min	R/min	R/min	R/min
	1 Wo v. Läsion	1 Wo n. Läsion	2 Wo n. Läsion	3 Wo n. Läsion	4 Wo n. Läsion
02-02	-0,7	2,9			
03-02	0,4	3			
45-02	4,4	4,4			
52-02	4,3	4,9			
04-02	-0,6	3,1	6,2		
05-02	0	5,5	2,5		
01-02	1,3	5,1	5,8	4,9	5,5
09-02	0,8	4,8	5,3	3,7	4,2
10-02	0,8	3	4,6	6	6
11-02	-0,3	2,4	5,2	5,1	5
14-02	0,3	5	4,6	5,6	5,2
46-02		5,2	7,8	4,7	5,4
47-02		2,5	3,8	3,8	6,3
48-02		2,9	3,5	3,5	4
49-02		4,2	5,9	5,1	6
50-02		2,7	4,8	3,6	3,5
51-02		2,8	5,7	4,7	4,2
Mittelwert	1,0	3,8	5,1	4,6	5,0
ST ABW	1,8	1,1	1,3	0,9	0,9

Thesen

1. Chorea Huntington ist eine autosomal dominante neurodegenerative Erkrankung, die nicht heilbar ist.
2. Bei der Chorea Huntington vollzieht sich durch bislang ungeklärte Pathomechanismen ein progressiver Zellverlust und eine Atrophie im Nucleus caudatus und Putamen.
3. Da es derzeit für die Erkrankung keine befriedigende symptomatische Therapie gibt und der Leidensdruck der Patienten zunimmt, besteht ein Bedarf an neuroprotektiven Therapiemethoden.
4. Das exzitatorische Läsionsmodell mittels Quinolinsäureinjektion eignet sich sehr gut bei der Grundlagenforschung für Chorea Huntington, da es die pathologischen Mechanismen und die Symptome der Erkrankung nachahmt.
5. Durch die exzitatorische Aminosäureläsion im CPu der Ratte wird ein starker Verlust an striatalen Neuronen und ein partieller Ersatz durch Gliazellen hervorgerufen.
6. Die verschiedenen Nervenfaserbündel, die durch das CPu ziehen werden nicht von der exzitatorischen Läsion beeinflusst.
7. Vier Wochen nach Läsion findet eine signifikante Erhöhung des CNTF-Proteingehalts im läsionierten CPu statt, und diese korreliert mit der Formation der Glianarbe.
8. CNTF wird in reaktiven Astrozyten gebildet, die sich vermehrt in dem Gebiet der Quinolinsäureläsion befinden.
9. CNTF hat als Therapeutikum Potential, wenn es direkt vor oder nach einer exzitatorischen Läsion appliziert wird, da es dann eine starke neurotrophe Wirkung entfaltet.
10. Die endogene CNTF-Expression ist an der Bildung einer Gliose beteiligt.

Erklärung

Die vorliegende Dissertation wurde weder vorher noch gleichzeitig bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Ich versichere an Eides statt, dass die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und ich andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die wörtlich oder inhaltlich verwendeten Quellen wurden als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich noch kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Rostock, 17.09.2008

.....
Aline Ahrens

Publikationen

Haas SJP, Ahrens A, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) Quinolinic acid lesion of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of CNTF. *J Anat* 204: 271-281

Weinelt S, Peters S, Bauer P, Mix E, Haas SJ, Dittmann A, Petrov S, Wree A, Cattaneo E, Knoblich R, Strauss U, Rolfs A (2003) Ciliary neurotrophic factor overexpression in neural progenitor cells (ST14A) increases proliferation, metabolic activity, and resistance to stress during differentiation. *J Neurosci Res* 71: 228-236

Haas SJP, Schmitt O, Petrov S, Ahrens A, Wree A (2002) Increase of CNTF after quinolinic acid lesion in the rat caudate Putamen investigated with immunohistochemistry and Western blotting. *Restor Neurol Neurosci* 20: 268 (Abstract)

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern danken, die in den Jahren meines Medizinstudiums immer für mich da waren und mir durch ihre, auch finanzielle Unterstützung, das Studium und die Anfertigung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Andreas Wree. Er war immer bereit, sein Wissen und seine Erfahrung in fruchtbaren Diskussionen einzubringen und die Experimente kritisch zu bewerten. Auch hatte er stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme, die am Rande der Arbeit entstanden und half beim Finden von Lösungen. Er wird mir so als Vorbild in Erinnerung bleiben.

Aus dem Institut für Anatomie haben viele Mitarbeiter zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Besondere Erwähnung verdient Stefan J.P. Haas. Er hat mir mit sehr viel Geduld die Methoden der Rotationsdurchführung, Histochemie und Immunhistologie beigebracht. Er fand immer Zeit, auch kleine Probleme im experimentellen Ablauf und in der späteren Auswertung zu analysieren und lösen zu helfen. Ohne ihn wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Mein weiterer Dank gilt Professor Dr. Oliver Schmitt für die bereitwillige Beratung bei der statistischen Auswertung der Experimente.

Nicht zuletzt möchte ich den MTA, Frau Kuhnke und Frau Waldmann, für die geleistete Arbeit herzlichen danken.

Auch möchte ich Prof. Dr. Arndt Rolfs und Dr. Eilhard Mix aus der neurologischen Klinik der Universität Rostock für ihre konstruktive Kritik und ihr Interesse an dieser Arbeit danken.

Herausragender Dank gebührt meinem Mann Rüdiger für die rückhaltlose Unterstützung und die sowohl aufmunternden und als auch anspornenden Worte während der Fertigstellung der Arbeit und die restlichen umso schöneren verbliebenen Stunden, die ich mit ihm verbringen durfte.