

Charakterisierung neuraler Stammzellen (CSM14.1-Zellen) *in vitro* und *in vivo* nach Transplantation in das Striatum von Hemiparkinson-Ratten

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Stefan Jean-Pierre Haas, geb. am 23.01.1971 in München

aus Rostock

Rostock, 1.10.2008

urn:nbn:gbv:28-diss2009-0100-9

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter G. Weiss (Institut für Biowissenschaften,
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock)
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree (Institut für Anatomie, Medizinische Fakultät der
Universität Rostock)

Das Wissenschaftliche Kolloquium fand am 18.5.2009 statt.

Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, 1.10.2008

Stefan Jean-Pierre Haas

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungen und Symbole	VI
1. Einleitung	1
1.1 Morbus Parkinson	1
1.2 Zellersatztherapie	4
1.3 Neurale Stammzellen und dopaminerge Differenzierung	5
1.4 Immortalisierte neurale Stammzellen	8
1.5 Tiermodelle des Morbus Parkinson	9
1.6 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 <i>In vitro</i> Experimente an CSM14.1-Zellen	13
2.1.1 Verwendete Zelllinie und Kulturbedingungen	13
2.1.2 Zelldifferenzierung <i>in vitro</i>	13
2.1.3 Morphologie und Immunhistochemie von Zellkulturen	14
2.1.4 Untersuchungen von CSM14.1-Proteinlysaten	17
2.2 Läsions- und Transplantationsexperimente	19
2.2.1 Verwendete Tiere	19
2.2.2 Einseitige dopaminerge Deafferentierung	20
2.2.3 Apomorphin-induzierte Rotationen	21
2.2.4 Transplantation PKH26-markierter CSM14.1-Zellen	22
2.2.5 Aufarbeitung der Gehirne	23
2.2.6 Anfertigen von Gewebeschnitten und Vorbereitung für die Immunhistochemie	23
2.3 Auswertung und Dokumentation der histologischen Präparate	24
2.4 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper	25
2.4.1 Primärantikörper	27
2.4.2 Sekundärantikörper	33
2.5 Statistische Auswertung der Apomorphin-induzierten Rotationen	34

3. Ergebnisse	36
3.1 <i>In vitro</i> Differenzierung der CSM14.1-Zellen	36
3.1.1 Zellbiologie und morphologische Veränderungen	36
3.1.2 Neuronale Differenzierung	40
3.1.3 Dopaminerge Differenzierung	45
3.1.4 Expression neurotropher Faktoren	48
3.2 Läsions- und Transplantationsexperimente	51
3.2.1 Läsionsausmaß und Rotationsergebnisse	51
3.2.2 Vitalität der Zellen nach Markierung und Transplantation	55
3.2.3 Integration der CSM14.1-Zellen nach Transplantation in das ZNS	57
4. Diskussion	60
4.1 Charakterisierung der CSM14.1-Zellen <i>in vitro</i>	60
4.1.1 Zellbiologie und morphologische Veränderungen	60
4.1.2 Neuronale Differenzierung <i>in vitro</i>	62
4.1.3 Dopaminerge Differenzierung <i>in vitro</i>	67
4.1.4 Zusammenfassung der <i>in vitro</i> Befunde	74
4.2 Charakterisierung der CSM14.1-Zellen <i>in vivo</i>	75
4.2.1 Validität der PKH26-Markierung	75
4.2.2 Migration, Integration und Tumorigenität der CSM14.1-Zellen nach intrastriatler Transplantation	78
4.2.3 <i>In vivo</i> Differenzierung der CSM14.1-Zellen	82
4.2.4 Einfluß der Transplantation auf Apomorphin-induzierte Rotationen im unilateralen 6-OHDA-Läsionsmodell der Ratte	84
4.2.5 Zusammenfassung der <i>in vivo</i> Befunde	88
4.3 Ausblick	89
5. Anhang	92
5.1 Zusammenfassung	93
5.2 Tabellenanhang	94

5.2.1 Anhang zu Diagramm 1	94
5.2.2 Anhang zu Diagramm 2	94
5.2.3 Anhang zu Diagramm 3	95
5.3 Literaturverzeichnis	96
5.4 Eigene Publikationen	128
5.4.1 Veröffentlichungen	128
5.4.2 Posterbeiträge und sonstige Veröffentlichungen	129
5.5 Danksagung	133
5.6 Lebenslauf	134

Abkürzungen und Symbole

A8	Area 8 (Nucleus retrorubralis)
A9	Area 9 (Substantia nigra pars compacta)
A10	Area 10 (Area tegmentalis ventralis)
ABC-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
Ach	Acetylcholin
ALDH2	Aldehyddehydrogenase-2
AMCA	Aminomethylcoumarin-Acetat
AP	Anterior – Posterior
Aq	Aqueductus mesencephali
BCA-Kit	Bicinchoninic acid assay-Kit (Proteinbestimmungs-Kit)
bFGF8	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor 8
BG	Blutgefäß
BDNF	“Brain derived neurotrophic Factor”
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
β-3 Tub	β-3 Tubulin
Ca	Commissura anterior
Cc	Corpus callosum
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
Co	Cortex
CPu	Caudatus-Putamen-Komplex (Striatum der Ratte)
CY2	Carbocyanine-Dye 2 TM
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidino-Phenylindol
DAT	Dopamintransporter
DDC	Dihydroxy-L-Phenylalanin-Decarboxylase
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
E14	Embryonaltag 14
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>En1, En2</i>	<i>Engrailed 1 und 2</i> (Homeobox Gene)
Enk	Enkephalin
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen

EZM	extrazelluläre Matrix
FKS	fötales Kälberserum
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
GABA	γ -Aminobuttersäure
GRID	Gadolinium Rhodamin Dextran
GalC	Galactocerebrosid
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor
GDNFR α 1	Rezeptorkomplex-alpha-1 für GDNF
GFAP	Gliäres fibrilläres saures Protein
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPe	Globus pallidus externus
GPe	Globus pallidus internus
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IL- α -1	Interleukin- α -1
IL-11	Interleukin-11
iPS	idiopathisches Parkinsonsyndrom
LacZ	β -Galactosidase-Gen
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
<i>Lmx1b</i>	LIM homeodomain transcription factor 1 beta
LV	Ventriculus lateralis
MAP5	mikrotubulinassoziiertes Protein 5
ML	Medio - Lateral
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MRT	Magnetresonanztomographie
MSN	striatale „medium spiny type“ Neurone
MVB	mediales Vorderhirnbündel
NC	Nucleus caudatus
Nestin	neurales Stammzellprotein
NeuN	neuronaes nukleäres Protein
NF	Neurofilament
NGS	normales Ziegenerum (engl.: normal goat serum)
NSE	neuronenspezifische Enolase
Nurr1	nukleärer Retinsäurerezeptor 1

Nvl	Nucleus ventrolateralis thalami
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
Ot	Tuberculum olfactorium
Nvat	Nucleus ventralis anterior thalami
PBS	Phosphatpufferlösung
PFA	Paraformaldehyd
PK	Positivkontrolle
PLP	Proteolipid Protein
Put	Putamen
<i>Ptx3</i>	Pentraxin 3 (Homeobox Gen)
Ratte-Hipp	Hippocampus der Ratte
Ratte-SN	Mesenzephalon der Ratte
RT	Raumtemperatur
S-100	Astrozytenspezifisches Kalzium-bindendes Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shh	Sonic hedgehog
Snc	Substantia nigra pars compacta
Snr	Substantia nigra pars reticulate
SP	Substanz P
STN	Nucl. Subthalamicus
TH	Tyrosinhydroxylase
Th	Thalamus
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
V	Vertikal
VMAT2	vesikulärer Monoamintransporter 2
VTA	Area tegmentalis ventralis
ZNS	Zentralnervensystem

Alle nicht aufgeführten Abkürzungen physikalischer Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System (*Système International d'Unité*).

1. Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

Das idiopathische Parkinsonsyndrom (iPS) ist eine neurodegenerative Erkrankung, unter der ca. 1-2,5% aller über 60jährigen in der Bundesrepublik Deutschland leiden (Birkmayer und Danielczyk, 1991; Gerlach et al., 2001, Ries et al., 2008). Die erste Beschreibung dieser Erkrankung erfolgte durch den englischen Arzt James Parkinson (Parkinson, 1817). Die vier Kardinalsymptome des iPS sind der Rigor, der Tremor, die Bradykinese und die posturale Instabilität (Birkmayer und Danielczyk, 1991; Rohkamm, 2000; Gerlach et al., 2001). Der Rigor, das sogenannte Zahnradphänomen, kann als eine generelle Muskelsteifheit umschrieben werden. Die Extremitäten lassen sich hierbei aufgrund eines inneren Muskelwiderstands nur unter Kraftaufwand ruckartig in eine Beugestellung bringen. Die Bradykinese oder Akinese (auch Bewegungsunlust genannt, da Parkinson-Patienten oftmals nicht in der Lage sind, aus dem Sitzen aufzustehen oder sich aus dem Bett zu erheben) erschwert zudem deren Fähigkeit repetitive Bewegungen durchzuführen (z. B. Gehbewegungen). Ein weiteres Charakteristikum dieser Erkrankung, der Tremor der distalen Extremitäten, wird vor allem während Ruhephasen augenfällig. Besonders hervorgehoben sind dabei zitternde Bewegungen, mit einer Frequenz von 2-3 Hertz, von Daumen und den opponenten Fingern, die dann das sogenannte Pillendrehen durchführen (Birkmayer und Danielczyk, 1991; Gerlach et al., 2001). Auf dieses Symptom fällt auch der ursprüngliche Begriff der Parkinson'schen Erkrankung zurück, nämlich Schüttellähmung oder im Englischen: shaking palsy (Parkinson, 1817; Birkmayer und Danielczyk, 1991; Gerlach et al., 2001).

Von der ersten wissenschaftlichen Beschreibung dieser Erkrankung und ihren Symptomen (Parkinson, 1817) dauerte es weitere hundert Jahre bis zur Erkenntnis, daß eine Abnahme der Pigmentierung im Mittelhirn, genauer in der Substantia nigra, mit dieser Erkrankung einhergeht (Tretiakoff, 1919). Inzwischen weiß man, daß melaninhaltige dopaminerge Nervenzellen in der Substantia nigra pars compacta degenerieren und die Symptome des iPS erst dann manifest werden, wenn ca. 70% dieser Zellpopulation bereits abgestorben sind (Lozano et al., 1998; Gerlach et al., 2001). Durch das Absterben dieser Nervenzellen wird das dopaminerge nigrostriatale System irreparabel geschädigt, und es kommt zu den oben beschriebenen Symptomen der Parkinson'schen Erkrankung (Marsden, 1992; Lozano et al., 1998; Gerlach et al., 2001). Heute ist allgemein bekannt, daß die Symptomatik dieser Krankheit auf einem Mangel des Neurotransmitters Dopamin in dem Terminalgebiet der Substantia nigra pars compacta beruht (Marsden, 1992). Dieses Areal, das Corpus striatum,

genauer der Nucleus caudatus und das Putamen sind wie der Globus pallidus externus und internus, der Nucleus subthalamicus und die Substantia nigra pars compacta den Basalganglien und somit funktionell dem extrapyramidalen-motorischen System zuzuordnen (Marsden, 1992; Zilles und Rehkämper, 1998; Gerlach et al., 2001). Die Basalganglien erhalten ihre Efferenzen vom gesamten Kortex und projizieren über den Thalamus zum prämotorischen Kortex zurück. Aus **Abbildung 1** wird ersichtlich wie die Bewegungsabläufe durch die Basalganglien im Normalfall und beim iPS verändert werden.

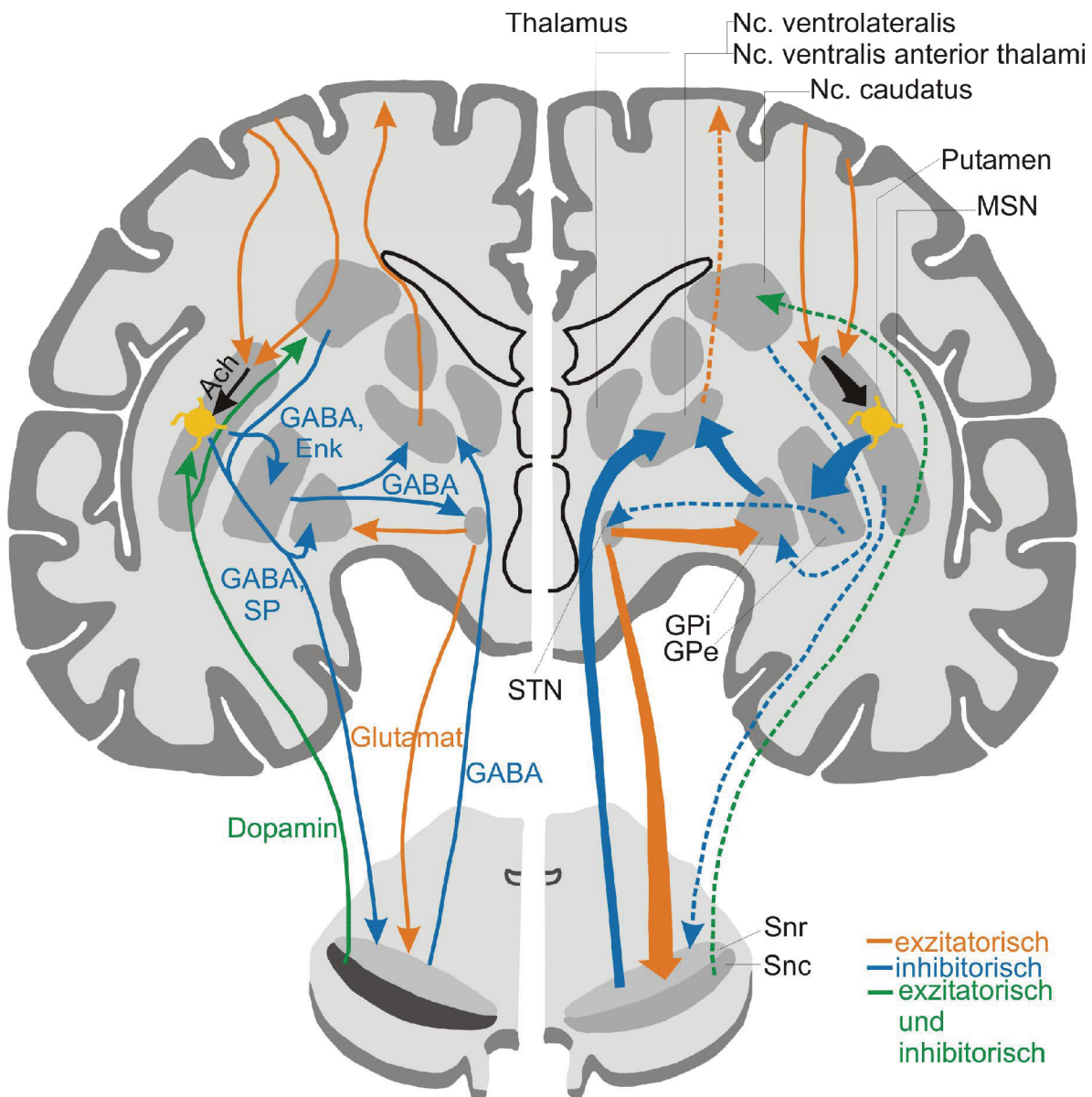


Abb. 1) Funktionelle Organisation des menschlichen extrapyramidalen motorischen Systems (links: Normalzustand, rechts: Parkinson-Syndrom):

Erklärung siehe unten im Text.

Legende: Ach: Acetylcholin, Enk: Enkephalin, GABA: γ -Aminobuttersäure, GPe: Globus pallidus externus, GPi: Globus pallidus internus, MSN: striatale „medium spiny type“ Neurone, NC: Nucleus caudatus, Nvl/vat: Nucleus ventrolateralis/ventralis anterior thalami, Put: Putamen, Snc: Substantia nigra pars compacta, Snr: Substantia nigra pars reticulata, SP: Substanz P, STN: Nucl. subthalamicus, Th: Thalamus, NC und Put werden auch als Striatum bezeichnet. (Modifiziert nach Rohkamm, 2000).

Im Normalfall bewirken die dopaminergen Neurone der Substantia nigra pars compacta (Snc) eine Stimulation der γ -Aminobuttersäure-abhängigen (GABAergen) Neurone des Striatums. Die D₁-Rezeptoren (erregend wirkende Dopaminrezeptoren) dieser Neurone bewirken daraufhin über das direkte Bahnsystem eine Hemmung der Substantia nigra pars reticularis (Snr), die ebenfalls aus GABAergen Neuronen besteht. Die im Striatum vorhandenen D₂-Rezeptoren (hemmend wirkende Dopaminrezeptoren) führen zu einer Hemmung der GABAergen striatalen Projektionsneurone des Globus pallidus externus (GPe). Die wiederum über GABA als Transmitter auf die Neurone im Nucleus subthalamicus (STN) projizieren. STN-Neurone senden mittels Glutamat erregende Signale zum Globus pallidus internus (GPi) und der Snr. GABAerge hemmende Einflüsse von GPi und Snr gelangen dann zu den Nuclei ventrolateralis und ventralis anterior des motorischen Thalamus (Nvl/vat), der auf kortikale Areale über den Neurotransmitter Glutamat erregend wirkt, womit schließlich eine Rückkopplung vorliegt (Basalganglienschleife). So wirkt Dopamin also über einen direkten Weg (D₁-Rezeptoren) inhibierend und über einen indirekten Weg (D₂-Rezeptoren) stimulierend auf die Snr und den GPi. Je kleiner der dort stimulierende Einfluss ist, desto kleiner ist auch der stimulierende Effekt auf den motorischen Thalamus und um so kleiner ist der hemmende Einfluß auf den Kortex und die Bewegungen. Beim iPS kommt es zu dramatischen Veränderungen dieser Basalganglienschleifen. Durch das Absterben der dopaminergen Neurone in der Snc fällt der stimulierende Einfluß auf die D₁-Rezeptoren des Striatums weg, und damit auch der inhibierende Effekt des Striatums auf die Snr. Dies ist somit ein Ausfall des direkt hemmenden Weges. Auf der anderen Seite entfällt der inhibierende Einfluss auf die D₂-Rezeptoren des Striatums, und im folgenden auch die hemmenden Effekte vom Striatum auf den GPe, bzw. von dort auf den STN. Dieser kann dann ungehemmt den GPi stimulieren. Von dem GPi gelangen daraufhin mehr inhibitorische Impulse zum motorischen Thalamus und dieser schickt dann wiederum weniger aktivierende Signale zum motorischen Kortex.

Daraus folgt, dass durch den Dopaminmangel eine Hemmung des motorischen Thalamus und demzufolge ein stark hemmender Effekt auf die Bewegungsbildung im Kortex besteht.

Die Ursache des iPS ist in den meisten Fällen bis heute nicht bekannt (Lozano et al., 1998; Gerlach et al., 2001; Toulouse und Sullivan, 2008; Weintraub et al., 2008). Eine kausale Heilung oder Prävention ist somit aufgrund der ungeklärten Ursachen bislang nicht möglich. Jedoch wurde durch die L-Dopa Substitution, einer Blut-Hirn-Schranke gängigen Vorstufe des Dopamins, eine wirksame Maßnahme zur Linderung der Symptomatik entwickelt (Carlsson et al., 1957; Gerlach et al., 2001). Mit Einführung der L-Dopa-Therapie wurde die

Behandlung der Parkinsonpatienten sozusagen revolutioniert, jedoch treten nach ca. 5-15 Jahren der L-Dopa Substitution schwere Nebenwirkungen auf, die einen Abbruch dieser Behandlungsmaßnahme erzwingen (Tolosa et al., 1998; Ries et al., 2008; Toulouse und Sullivan, 2008). Neben dieser pharmakologischen Routinebehandlung werden daher auch weitere Ansätze zur Behandlung dieser neurodegenerativen Erkrankung in tierexperimentellen und klinischen Studien verfolgt. Einige dieser Versuche beinhalten hierbei stereotaktische Verfahren, in denen bestimmte Kerngebiete im ZNS selektiv zerstört werden (Laitinen et al., 1992) oder neuerdings die sogenannte tiefe Hirnstimulation, bei der die gezielte elektrophysiologische Stimulation einzelner Hirnareale, insbesondere des Nc. subthalamicus, zur Linderung der Parkinsonsymptomatik führt (Benabid et al., 1991; Benazzouz und Hallett, 2000; Toulouse und Sullivan, 2008). Jedoch können nur ca. 5-10% der Patienten mit iPS, u.a. aufgrund der Auswahlkriterien und der benötigten Infrastrukturen der operativen Einrichtungen, einer solchen Behandlung zugeführt werden (Singh et al., 2007).

Eine weitere aussichtsreiche Behandlungsstrategie, die sogenannte intrazerebrale Transplantation oder Zellersatztherapie, wird seit den 70iger Jahren des 20. Jahrhunderts erforscht (Björklund und Lindvall, 2000). Diese Behandlungsmethode wurde in der Vergangenheit auch schon erfolgreich an Parkinsonpatienten angewandt (Olanow et al., 1996; Piccini et al., 1999; Freed et al., 2001; Olanow et al., 2003).

1.2 Zellersatztherapie

Die Tatsache, daß die Symptome der Parkinsonerkrankung auf einem Dopaminmangel im Terminalgebiet der degenerierenden Substantia nigra pars compacta beruhen (Marsden, 1992) hat zu experimentellen Studien geführt, deren Ziel es ist, diesem Mangel an Dopaminsynthetisierenden Zellen durch gezielte Transplantation entgegen zu wirken (Björklund und Lindvall, 2000; Ries et al., 2008). Als Grundlage dieser Therapiemethode dienten tierexperimentelle Transplantationsstudien an Nagetieren und nichtmenschlichen Primaten, bei denen zuvor künstlich ein Morbus Parkinson induziert wurde (siehe Kapitel 1.5). Zellen aus unterschiedlichsten Geweben oder Organen wurden bislang in präklinischen Studien transplantiert. In erfolgreichen Studien an Nagetieren und nichtmenschlichen Primaten kamen Zellen aus dem chromaffinen Nebennierenmark (Freed et al., 1981), dem Glomuskörperchen (Espejo et al., 1998; Luquin et al., 1999), dem ventralen Mesenzephalon von Feten unterschiedlichster Spezies (Herman und Abrous, 1994; Björklund und Lindvall, 2000) sowie

Sertoli-Zellen aus dem Hoden zum Einsatz (Borlongan et al., 1997; Liu et al., 1999). Alle hierbei verwendeten Zellen oder Gewebe enthielten katecholaminerge Zellen, zu denen auch die dopaminergen Zellen in der Substantia nigra gehören. Die Grundidee hinter diesen unterschiedlichen Studien ist es, das Corpus striatum, in das die Zellen transplantiert wurden, mit Hilfe der transplantierten Zellen dopaminerg zu reinnervieren (Gagnon et al., 1993; Björklund und Lindvall, 2000; Ries et al., 2008).

Aufgrund dieser vielversprechenden präklinischen Studien erhielten in der Folgezeit Parkinson-Patienten Zelltransplantate aus dem eigenen chromaffinen Nebennierenmark (Backlund et al., 1985; Olson et al., 1991), dem ventralen Mesenzephalon von Schweinefeten (Deacon et al., 1997) oder dem ventralen Mesenzephalon von abgetriebenen humanen Feten (Olanow et al., 1996; Piccini et al., 2000; Freed et al., 2001). Allerdings wird gegenwärtig nur noch die Transplantation von Zellen aus dem ventralen Mesenzephalon aus humanen Feten durchgeführt, da sich Transplantate aus den beiden anderen Zell- oder Gewebetypen in klinischen Studien als nicht erfolgreich herausstellten (Hagell und Brundin, 2001). Bislang erhielten ca. 300 Parkinsonpatienten intrazerebrale Transplantate aus dem ventralen Mesenzephalon von jeweils 3-8 menschlichen Feten eines bestimmten postkonzeptionalen Alters (7. - 12. Woche) pro Patient (Hagell und Brundin, 2001; Bauer et al., 2002). Vor allem jüngere Patienten zeigten nach dieser Behandlung eine Besserung der klinischen Symptomatik, die auch mit einem erhöhten Dopamingehalt im Corpus striatum einherging (Piccini et al., 2000; Freed et al., 2001), d. h. eine dopaminerge Reinnervation im Empfängerhirn nach intrazerebraler Transplantation ist möglich.

Die Tatsache, daß beim iPS eine singuläre Zellpopulation betroffen ist und die Symptome auf dem Nichtvorhandensein eines einzelnen Neurotransmitters beruhen, macht eine Zellersatztherapie, bei der die absterbenden oder toten dopaminergen Neurone durch Spenderzellen ersetzt werden, zu einer hoffnungsvollen Behandlungsmethode. Weiterhin erhofft man sich von diesen Behandlungsstrategien beim iPS neue Erkenntnisse und Therapieansätze für eine Reihe von weiteren neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. dem Morbus Alzheimer oder der Chorea Huntington (Björklund und Lindvall, 2000; Peterson, 2002; Rossi und Cattaneo, 2002).

1.3 Neurale Stammzellen und dopaminerge Differenzierung

Die ethischen Bedenken bei der Verwendung von Spenderzellen, die von abgetriebenen menschlichen Feten stammen, machen die Erforschung alternativen Spendermaterials

notwendig (Björklund und Lindvall, 2000; Rossi und Cattaneo, 2002). Weiterhin spielen auch methodische Probleme eine wichtige Rolle bei der Suche nach Alternativen, da für die Transplantation eines Parkinsonpatienten bislang 3-8 Feten verwendet werden (Olanow et al., 1996; Piccini et al., 2000; Freed et al., 2001) und das Spendermaterial nie in ausreichender Menge zur Verfügung stehen würde. Ferner können bakterielle und virale Kontaminationen dieses, jeweils frisch gewonnenen Gewebes nicht ausgeschlossen werden (Björklund und Lindvall, 2000).

Als aussichtsreiche Variante könnten sich pluripotente neurale Stamm- oder Progenitorzellen herausstellen (Björklund und Lindvall, 2000; Peterson, 2002; Rossi und Cattaneo, 2002), aus denen im Laufe der Entwicklung alle Nerven und Gliazellen des Zentralnervensystems bei Säugetieren hervorgehen (Sauer, 1935; Rakic, 1971; Svendsen et al., 2001; Temple, 2001). Die Definition der pluripotenten neuralen Stammzelle *in vitro* und *in vivo* ergibt sich durch folgende Kriterien: sie proliferiert, generiert sich dadurch selbst und ist in der Lage Tochterzellen hervorzubringen, die sich in Neurone oder Gliazellen differenzieren können (Gage, 1998). In **Abbildung 2** ist dieser Ablauf der Differenzierung sowie der Nachweis der unterschiedlichen Zelltypen mittels immunhistochemischer Marker schematisch dargestellt. Während der Entwicklung des Nervensystems finden sich die neuralen Stammzellen hauptsächlich innerhalb der subventrikulären Zone entlang der Ventrikel und des Zentralkanals des Rückenmarks, wo sie nach ihrer Proliferation Tochterzellen abgeben, die dann in ihre entsprechenden Zielgebiete migrieren um schließlich in Nerven- oder Gliazellen auszudifferenzieren (Rakic, 1971; Culican et al., 1990; Temple, 2001). Das Vorkommen neuraler Stammzellen ist nicht einzig auf die Embryonal- und Fetalentwicklung beschränkt. Ausgehend von den wegbereitenden Studien der Arbeitsgruppe um Fernando Nottebohm (1985), die erstmals adulte Neuroneogenese aus einem bei adulten Singvögeln existierenden Vorrat an neuralen Stammzellen nachwiesen, konnte die Existenz neuraler Stammzellen in der Folgezeit auch im Gehirn adulter Nagetiere (Reynolds und Weiss, 1992; Temple und Alvarez-Buylla, 1999), adulter Primaten (Gould et al., 1999) und inzwischen auch für das ZNS des erwachsenen Menschen (Eriksson et al., 1998; Palmer et al., 2001, Sanai et al., 2004; Curtis et al., 2007) gezeigt werden.

Inzwischen vorliegende Daten belegen, daß sich diese Zellen aus fetalen und adulten Gehirnen gewinnen lassen und sie in Kultur unter Verwendung bestimmter Mediensupplemente vermehrt und weiterhin charakterisiert werden können (Reynolds und Weiss, 1992; Svendsen und Rosser, 1995; Palmer et al., 1997). Eine weitere Reihe von Studien zeigt, daß sich aus fetalen und auch adulten neuralen Stammzellen zudem Zellen

generieren lassen, die Eigenschaften dopaminergener Neurone besitzen und somit eine äußerst aussichtsreiche Option für die Zellersatztherapie darstellen (Daadi und Weiss, 1999; Wagner et al., 1999; Rossi und Cattaneo, 2002).

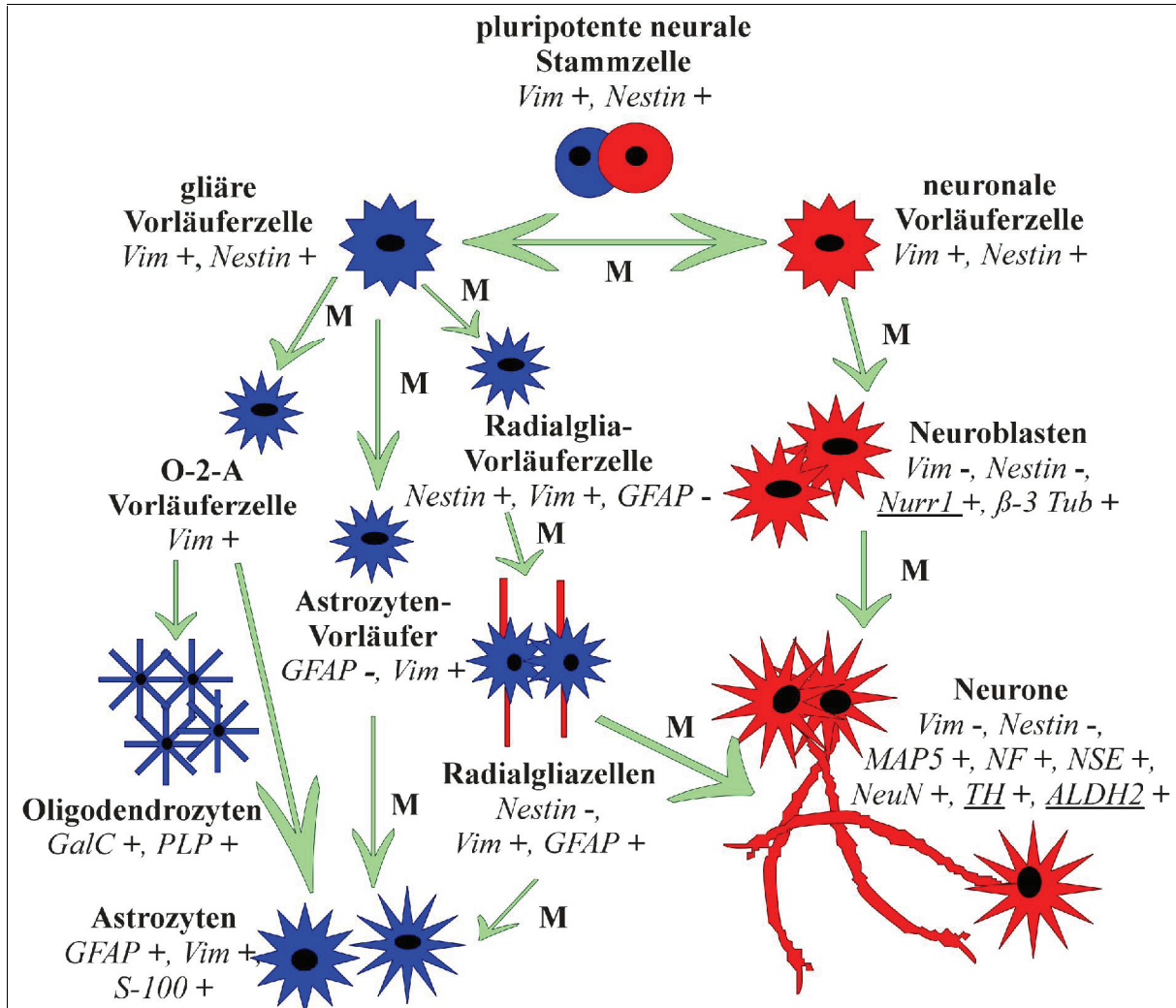


Abb. 2) Differenzierung der pluripotenten neuroektodermalen Stammzellen zu (dopaminergen) Neuronen oder zu Gliazellen:

Neuro- und Glioneogenese aus neuronalen Stammzellen (nach Rakic 1971; Culican et al., 1990; Perrone-Capano und DiPorzio, 2000; Svendsen et al., 2001; Götz 2001). Aus pluripotenten neuronalen Stammzellen entstehen über neuronale Vorläufer, nach weiteren mitotischen Teilungen die Neuroblasten. Diese sind noch teilungsfähig und proliferieren weiter, deren Tochterzellen schließlich verlieren ihre Teilungsfähigkeit und werden zu postmitotischen Neuronen. Die gliale Vorläuferzelle entwickelt sich zu den zwei Hauptgruppen der Makroglia im ZNS der Wirbeltiere, den Astrozyten und den Oligodendrozyten. Inzwischen ist auch die Genese von Neuronen aus Radialgliazellen beschrieben worden (Götz 2001). Die Darstellung bestimmter Markerproteine mittels Antikörperfärbungen kann zur Identifizierung und Charakterisierung des jeweiligen Zelltyps und seines Differenzierungsgrades herangezogen werden. Das Vorkommen des jeweiligen Markerproteins in der Zelle ist mit +, das Fehlen eines solchen durch ein - dargestellt. Marker für dopaminerge Vorläufer und reife dopaminerge Neurone sind unterstrichen.

Legende: M = Mitose, ALDH2 = Aldehyddehydrogenase-2, β-3 Tub = β -3 Tubulin, GalC = Galactocerebroside, GFAP = Gliäres fibrilläres saures Protein, Nestin = neurales Stammzellprotein, Nurr1 = nukleärer Retinsäurerezeptor 1, NF = Neurofilament, NSE = neuronenspezifische Enolase, NeuN = neuronales nukleäres Protein, MAP5 = mikrotubulinassoziiertes Protein 5, PLP = Proteolipid Protein, S-100 = Astrozytenspezifisches Kalzium-bindendes Protein, TH = Tyrosinhydroxylase.

Die *in vivo* Entwicklung dopaminerger Neurone im Mesenzephalon von Mäusen (*Mus musculus*) aus neuralen Stammzellen ist inzwischen sehr gut erforscht (Perrone-Capano und Di Porzio, 2000). Aus den Stammzellen werden während der frühen Ontogenese der Maus um den Embryonaltag 8,5 unter dem Einfluss verschiedener Faktoren Neuroblasten generiert, die hauptsächlich unter dem Einfluss der Signalmoleküle Sonic hedgehog (Shh) und dem basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktor 8 (bFGF8) beginnen, eine Differenzierung hin zu dopaminergen Progenitoren zu durchlaufen (Perrone-Capano und Di Porzio, 2000). In der weiteren Entwicklung, um den zehnten Embryonaltag, exprimieren diese Zellen die Boten-RNA (mRNA) des nukleären Retinsäurerezeptors Nurr1 (nuclear retinoic acid receptor 1), der zur Ausbildung eines dopaminerger neuronalen Phänotyps essentiell zu sein scheint und zeitlebens von dopaminergen Zellen exprimiert wird (Zetterström et al., 1997; Bäckman et al., 1999; Wallen et al., 1999; Perrone-Capano und Di Porzio, 2000). Das Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese, die Tyrosinhydroxylase (TH), ist in den dopaminergen Progenitoren erstmals um den Embryonaltag 11,5 nachweisbar (Zetterström et al., 1997; Saucedo-Cardenas et al., 1998; Perrone-Capano und Di Porzio, 2000), gefolgt von dem Retinaldehyd konvertierenden Enzym Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH2), welches als Indikator für einen ausgereiften dopaminergen Phänotyp herangezogen wird (McCaffery und Dräger, 1994; Haque et al., 1997; Wagner et al., 1999; Wallen et al., 1999).

1.4 Immortalisierte neurale Stammzellen

Trotz der oben aufgeführten Vorteile, die neurale Stammzellen, die aus Primärkulturen gewonnen werden, als potentielltes Spendermaterial haben, besitzen sie auch einige Nachteile. Sie bestehen meist aus heterogenen Zellpopulationen, in der verschiedenste Zelltypen vorkommen, sie können meist nur durch die Zugabe teurer Supplemente im „Stammzellmodus“ gehalten werden, und weiterhin ist ihre Expansion oftmals auf einige dutzend Passagen begrenzt (Snyder, 1994; Palmer et al., 2001). Diese Nachteile können durch die sogenannte Immortalisierung behoben oder reduziert werden.

Bei einem dieser Verfahren, der temperatursensitiven Immortalisierung, wird durch retroviralen Gentransfer ein für das Onkogenprodukt Large-T-antigen kodierendes Gen stabil in das Genom von neuralen Stammzellen eingeführt. Anschliessend werden die erfolgreich transfizierten Zellen klonal selektiert und sind in der Lage bei einer Umgebungstemperatur von ca. 33° C beinahe unbegrenzte Zellteilungen durchzuführen (Koch-Brandt, 1993; Martinez-Serrano und Björklund, 1997; Cattaneo und Conti, 1998). Sie verlieren durch diese

Immortalisierung keine der Stammzeleigenschaften, sind in Standardmedien mit einfacher Zugabe von fetalem Kälberserum fast unbegrenzt expandierbar und entstammen als klonale Zellen einem einzelnen Zellklon, dessen Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden können (Snyder, 1994; Cattaneo und Conti, 1998). Die Tatsache, dass das immortalisierende Onkogenprodukt (Large-T-antigen) nur bei 33° C gebildet wird und es bei Umgebungstemperaturen um 39° C, welche der Körpertemperatur von Ratten und Mäusen (Schröder, 1986) und auch der Temperatur im Nagergehirn entspricht (Gordon, 1990; Martinez-Serrano und Björklund, 1997), nicht mehr von diesen Zellen gebildet wird, sie daraufhin ihre Zellteilungen einstellen und ausdifferenzieren, macht dieses Immortalisierungsverfahren ideal für eine Zellersatztherapie bei experimentell ausgelösten Modellen für neurodegenerative Erkrankungen.

1.5 Tiermodelle des Morbus Parkinson

Um neue Therapiemethoden für das iPS zu entwickeln und zu erproben, wurden bislang unterschiedliche Tiermodelle etabliert, die Auslöser und Symptome der Krankheit imitieren sollen, da die Parkinson'sche Erkrankung nur bei Menschen vorkommt und bislang noch keine Tierspezies bekannt ist, die diese Erkrankung aufweist (Beal, 2001).

Ein experimenteller Parkinson kann bei Nagetieren oder nichtmenschlichen Primaten durch Injektion oder systemische Applikation neurotoxischer Substanzen, wie z. B. 6-Hydroxydopamin (6-OHDA, Ungerstedt und Arbuthnott, 1970), 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP, Burns et al., 1983) oder dem Pestizid Rotenon (Betarbet et al., 2000) induziert werden. Modelle, die sich transgener Methoden bedienen, um den Verlauf eines Morbus Parkinson zu imitieren, sind bislang nur wenige publiziert worden. Eine Arbeit, in der bei Fruchtfliegen (*Drosophila melanogaster*) das Protein alpha-Synuclein mutiert vorliegt, zeigt ein Absterben TH-positiver Neurone bei diesen Tieren (Feany und Bender, 2000), allerdings kommt es bei einem transgenen Mausmodell, in dem mutiertes alpha-Synuclein überexprimiert wird, nicht zum Absterben dopaminerger Nervenzellen in der Substantia nigra und den somit einhergehenden Symptomen eines Morbus Parkinson (Abeliovich et al., 2000). Es ist allerdings zu erwarten, daß in der Zukunft diesen Modellen ein grösserer Erfolg beschieden sein wird (Beal, 2001).

Bei Nagetieren ist das unilaterale 6-Hydroxydopamin-induzierte Läsionsmodell bislang das am meisten verwendete und am besten charakterisierte (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970; Schwarting und Huston, 1996a, b). Hierbei wird Ratten (*Rattus norvegicus*) mittels einer

einseitigen stereotaktischen Injektion des catecholaminergen Neurotoxins 6-OHDA (Strukturformel siehe **Abb. 3**) in das mediale Vorderhirnbündel (MVB), das die nigrostriatale dopaminerge Faserbahn enthält, verabreicht. Das 6-OHDA muss direkt injiziert werden, da es die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. Das dem Dopamin vom Aufbau her ähnliche 6-OHDA wird dadurch von den dopaminergen nigrostriatalen Nervenzellen mit retrogradem axonalen Transport aufgenommen und folgt dann den gleichen Abbauwegen wie Dopamin (Karoum et al., 1993), wobei im Fall von 6-OHDA Wasserstoffperoxid freigesetzt wird. Zusätzlich löst es Ferritin-gebundenes Eisen, wodurch die effiziente Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Hydroxid-Radikalen gewährleistet wird. Diese metabolische Umsetzung von 6-OHDA in die für dopaminerge Neurone toxischen Radikale ist in **Abbildung 3** dargestellt. Durch diesen eleganten Eingriff, die Injektion von 6-OHDA in die nigrostriatale Faserbahn, werden weder das Mesenzephalon, noch das Corpus striatum (CPu) direkt geschädigt.

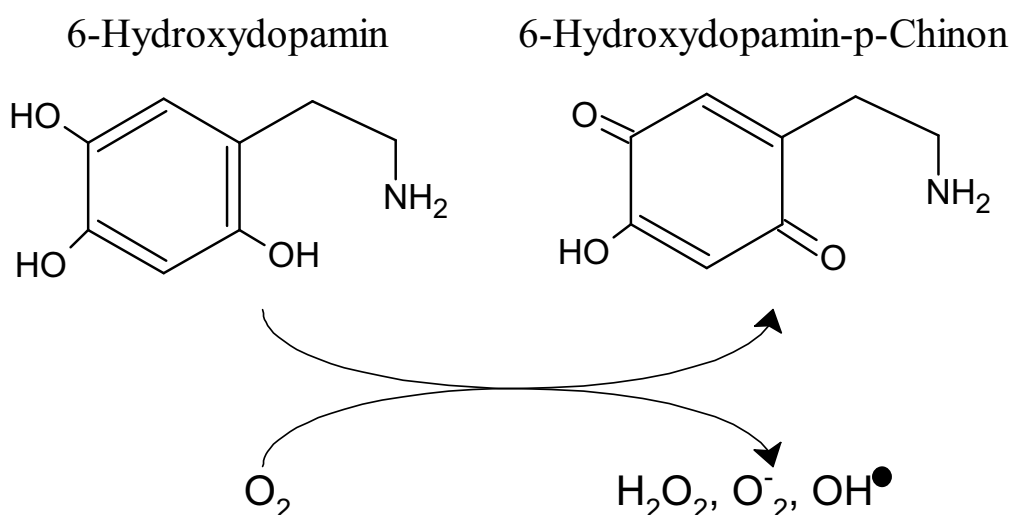


Abb. 3) Metabolisierung von 6-Hydroxydopamin zu 6-Hydroxydopamin-p-Chinon und Hydroxidradikalen:

Oxidation von 6-OHDA führt, über nicht gezeigte Zwischenformen, zu dessen Umwandlung in 6-Hydroxydopamin-p-Chinon und der Entstehung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2), einem Superoxidanion-Radikal ($O_2^{\cdot -}$) und einem Hydroxidradikal ($OH^{\cdot}$). (Nach Zigmond und Keefe, 1998).

Das Ausmaß der unilateralen Läsion kann dann nach Gabe des nichtselektiven D_1 - und D_2 -Rezeptoragonisten Apomorphin (Strukturformel siehe **Abb. 4**) ermittelt werden. Apomorphin löst bei erfolgreich läsionierten Tieren ein kontralaterales Drehverhalten aus (siehe **Abb. 4**), das sich folgendermaßen erklären läßt: Post-synaptische Dopamin-Rezeptoren in der

läsionierten Seite werden infolge der prä-synaptischen Denervierung supersensitiv, d. h. die Rezeptoren der ipsilateralen Seite reagieren empfindlicher auf Dopamin und Dopaminrezeptoragonisten, als die in der noch intakten kontralateralen Seite. Dadurch findet, im Vergleich zur intakten Seite, eine stärkere motorische Aktivität in der läsionierten Seite nach Gabe von Dopaminrezeptoragonisten statt. Dieses hat zur Folge, daß die läsionierte Seite der Intakten quasi „davonläuft“ und es zu einer Rotation gegen die nichtläsionierte intakte (kontralaterale) Gehirnhälfte kommt. Im Gegensatz hierzu lösen Dopamin-freisetzende Wirkstoffe, z. B. Amphetamine, ipsilaterale Rotationen aus (siehe **Abb. 4**). Diese Rotationen können mit Hilfe eines Rotometers ermittelt und quantifiziert werden. Die Anzahl der ausgeführten Rotationen korreliert mit dem Ausmaß der unilateralen dopaminergen Deafferentierung (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970; Schwarting und Huston, 1996a, b; Beal, 2001; Gerlach et al., 2001). Ist ein experimenteller Parkinson dann erfolgreich induziert worden, können mit den Versuchstieren die weiteren Experimente, z. B. eine Zellersatztherapie, durchgeführt werden und eine Abnahme der Rotationen als Kriterium für eine Besserung der Symptomatik herangezogen werden.

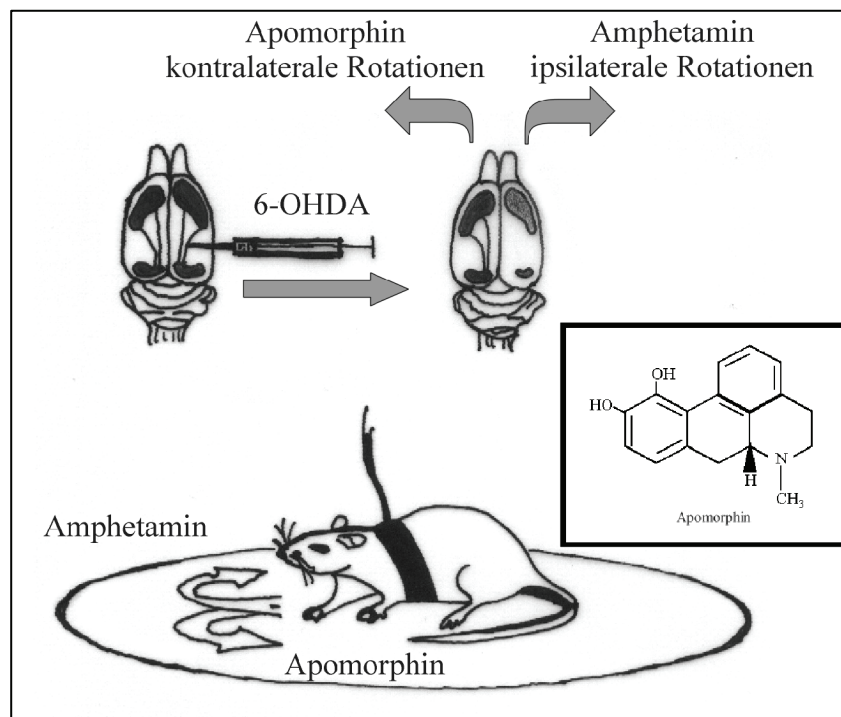


Abb. 4) Tiermodell des Hemiparkinson:

Nach unilateraler Injektion von 6-OHDA in das rechte mediale Vorderhirnbündel kommt es aufgrund von Radikalbildungen zum selektiven Absterben dopaminergener Nervenzellen in der Substantia nigra pars compacta. Daraufhin können kontralaterale Rotationen mit dem nichtselektiven D_1/D_2 -Agonisten Apomorphin (Strukturformel siehe eingefügte Abbildung) ausgelöst und mittels eines Rotometers quantifiziert werden. Diese Rotationen können direkt mit dem Maß der dopaminergen striatalen Deafferentierung korreliert werden.

Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die intrazerebrale Transplantation neuraler immortalisierter Progenitor- oder Stammzellen könnte sich in Zukunft als aussichtsreiche Therapieoption bei neurodegenerativen Erkrankungen erweisen. Ziel der folgenden Dissertation ist es, eine solche temperatursensitiv immortalisierte Progenitor- oder Stammzelllinie (CSM14.1-Zellen) *in vitro* und *in vivo* nach Transplantation in das Striatum von Hemiparkinson-Ratten eingehender zu untersuchen.

Mit Hilfe von immunzytochemischen Methoden und Western-Blotting sollen die Zellbiologie und die Differenzierung in Nerven- oder Gliazellen dieser aus dem ventralen Mesenzephalon von Ratten stammenden CSM14.1-Zellen unter definierten Kultur- und Differenzierungsbedingungen charakterisiert werden. Dabei werden weiterhin die dopaminerge Differenzierung dieser Zellen mit der aus der Literatur bekannten *in vivo* Differenzierung von dopaminergen Zellen aus der Substantia nigra pars compacta von Nagetieren verglichen. Zur Vervollständigung der zellbiologischen Charakterisierung soll die Expression ausgewählter Neurotrophine, die bislang zur Therapie des experimentellen Morbus Parkinson zum Einsatz kamen, bei den CSM14.1-Zellen untersucht werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird das *in vivo* Differenzierungsverhalten von CSM14.1-Zellen nach bilateraler Transplantation in das Corpus striatum von Ratten, bei denen zuvor ein Hemiparkinson ausgelöst wurde, untersucht. Hierbei sollen mit Hilfe von stereotaktischen Operationen, Apomorphin-induzierten Rotationen, lipophiler Fluoreszenzmarkierung von transplantierten Zellen und immunhistochemischen Methoden folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Wie weit migrieren, integrieren und differenzieren sich transplantierte undifferenzierte CSM14.1-Zellen *in vivo* im dopaminerg deafferentierten und kontralateralen, intakten Corpus striatum der Ratte?
- Lässt sich dieses Differenzierungsmuster mit der zuvor untersuchten *in vitro* Differenzierung unter definierten Kulturbedingungen vergleichen?
- Weiterhin soll, im Vergleich mit unilateral dopaminerg deafferentierten und anschließend scheintransplantierten Kontrolltieren, untersucht werden, ob die transplantierten CSM14.1-Zellen einen Einfluß auf das Apomorphin-induzierte Rotationsverhalten ausüben.

2. Material und Methoden

2.1 *In vitro* Experimente an CSM14.1-Zellen

2.1.1 Verwendete Zelllinie und Kulturbedingungen

Untersuchungsgegenstand der hier vorliegenden Studie waren temperatursensitiv immortalisierte mesenzepmale Progenitorzellen der Zelllinie CSM14.1 (Durand et al., 1990), welche aus dem ventralen Mesenzephalon von E14-Ratten gewonnen wurden. Diese Zellen wurden unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Prof. D.E. Bredesen (University of California, San Diego, Ca, USA) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung und Expansion der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator (NuAire, Plymouth, Mi, USA) in einer feuchten Atmosphäre bei 5% CO₂ unter der permissiven Temperatur von 33° C (Frederiksen et al., 1988a; Durand et al., 1990; Redies et al. 1991). Die Kulturmedien und Reagenzien stammten, soweit nicht anders vermerkt, alle von der Firma Gibco (Karlsruhe, Deutschland). Die CSM14.1-Zellen wurden in Gewebekultur-Petrischalen kultiviert (Greiner, Frickenhausen, Deutschland). Das sterile Nährmedium bestand aus DMEM (angereichert mit GlutaMAXTM, 1000 mg/L D-Glukose, Natriumpyruvat, Firma Gibco), 10% fötales Kälberserum (FKS) und 1% Antibiotika/Antimykotika-Lösung (Penicillin/Streptomycin, Gibco). Eine Passage mittels Trypsin (Gibco) erfolgte bei konfluenten Zellen ca. alle drei Tage.

2.1.2 Zelldifferenzierung *in vitro*

Da die immortalisierten Progenitorzellen unter den Kultur- und Expansionsbedingungen von 33° C in 10% FKS-haltigem Medium in einem undifferenzierten Zustand vorliegen (Durand et al., 1990), war es nötig auf die nichtpermissive Umgebungstemperatur von 39° C, welche auch der Temperatur im Nagergehirn entspricht (Schröder, 1986; Gordon, 1990), zu erhöhen. Nach dem Protokoll von Winkler et al. (1998) wurde zusätzlich der Serumgehalt des Nährmediums auf 1% FKS reduziert. Ansonsten entsprach das serumreduzierte Differenzierungsmedium dem üblichen Kultivierungs- und Expansionsmedium (siehe oben). Die CSM14.1-Zellen wurden nach vorangegangener Passage wiederum in 10% FKS-haltigem Medium aufgenommen und für das Western-Blotting auf Petrischalen bzw. für die Histologie und Immunzytochemie auf Poly-L-Lysin-beschichteten (5 g auf 50 ml H₂O, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) Falcon-Kulturobjektträgern (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) ausgesäht und über Nacht bei 33° C kultiviert, um ein Anheften der Zellen auf dem Substrat zu gewährleisten. Danach erfolgte ein Wechsel in serumreduziertes Differenzierungsmedium, und die Zellen wurden bei 39° C in einer feuchten Atmosphäre bei 5% CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel mit dem Differenzierungsmedium erfolgte alle 3

Tage. Bei der Probenaufbereitung für das Western Blotting (siehe unten) erfolgte auch jeweils eine Zellzahlbestimmung der vitalen entnommenen Zellen mittels eines Hämatozytometers (Neubauer-Zählkammer, Fischer Scientific) und Trypanblau-Färbung (Sigma) wie bei Lindl (2000) beschrieben. Es wurden mindestens drei voneinander unabhängig angefertigte Kulturen ausgezählt, und die Mittelwerte dieser Zählungen gingen als Resultate für die Veränderungen der Zellzahl unter Differenzierungsbedingungen ein.

2.1.3 Morphologie und Immunohistochemie von Zellkulturen

2.1.3.1 Histologie

Für die weiteren Untersuchungen wurden CSM14.1-Zellen verwendet, die für zwei Tage unter permissiven Kulturbedingungen (2 d, 33° C, 10% FKS), oder für 3, 7, 10 und 14 Tagen unter Differenzierungsbedingungen (3 d, 7 d, 10 d oder 14 d, 39° C, 1% FKS) kultiviert wurden. Am Tag der Entnahme wurden diese jeweils kurz mit 0,1M Phosphatpuffer (PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,27 g KH₂PO₄, auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und auf pH 7,4 eingestellt, alle Reagenzien von Serva, Heidelberg, Deutschland) gespült und 1h bei Raumtemperatur (RT) mit 4% Paraformaldehyd (PFA, in PBS, Serva) fixiert. Für die histologische Färbung mit dem basischen Teerfarbstoff Kresylviolettazetat (Sigma), zur Darstellung der Zellmorphologie und der Nissl-Substanz (Romeis, 1989), wurden die Kulturen 2 x 5 min in Aqua dest. gespült und anschliessend für 3 min in einer wässrigen Kresylviolettazetatlösung (0,1%) gefärbt. Nach wiederholtem Waschen in Aqua dest. und der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate mit DePeX (Serva) eingedeckt.

2.1.3.2 Quantifizierung der Fortsatzlänge als Differenzierungsmaß

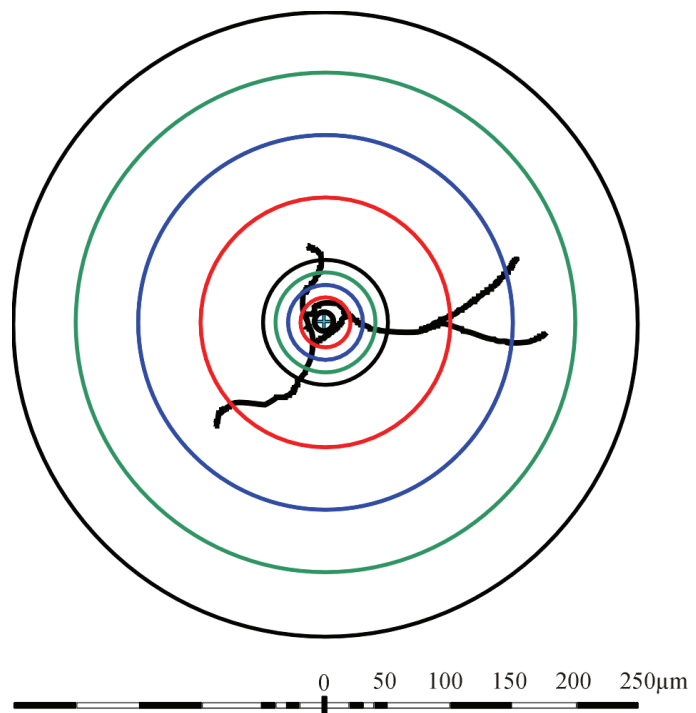
In Nissl-gefärbten Zellkulturen von undifferenzierten (2 d, 33° C, 10% FKS) und differenzierten Zellen (39° C, 1% FKS) zu den Zeitpunkten 7 d und 14 d wurde, als weiteres Maß für eine Differenzierung der Zellen, die Fortsatzlänge bestimmt. Hierzu wurden Zeichnungen von 20 Zellen aus den drei verschiedenen Kulturen (je n = 6) mittels Mikroskop (20x Objektiv und 10x Okular, Zeiss, Oberkochen) und Camera Lucida Einrichtung angefertigt. Durch verschieben des Objektisches um jeweils einen Millimeter in eine Richtung und Fokussierung auf die im Mikroskop-Sichtfeld zentral gelegene Zelle war sichergestellt, dass es sich um eine zufällige Zusammenstellung von Präparaten handelte. Ferner wurden nur Zellen verwendet, die klar abgrenzbare Zellgrenzen besaßen, die insgesamt

in der Fokusebene lagen und bei denen nur ein deutlich erkennbarer Zellkern vorhanden war. Es gingen keine Zellen in die Berechnungen ein, die pyknotische, bzw. apoptotische Morphologien aufwiesen. Diese waren erkennbar durch „zerrissen“ wirkende Membranen, Fragmente von Nuklei innerhalb der Zellen oder generell zerfallene Zellen (apoptotische Körperchen, „apoptotic bodies“). Das Ausmessen der individuellen Fortsatzlänge erfolgte dann mittels einer eigens angefertigten durchsichtigen Schablone (**Abbildung 5**). Auf dieser waren in definierten Abständen Messkreise aufgetragen. Es wurde zuvor mit einem Objektmikrometer (Carl Zeiss, Jena) ermittelt welche Größenverhältnisse bei den Camera Lucida Zeichnungen vorlagen. Der erste, zentral gelegene Kreis, entsprach einem Durchmesser von 40 μm , gefolgt von drei weiteren mit 60 μm , 80 μm und 100 μm . Darauf folgend kamen Messkreise die einem Durchmesser von 200 μm , 300 μm , 400 μm , 500 μm und 600 μm entsprachen. Der Nukleus der gezeichneten Zellen wurde in die zentrale Position gebracht und die Anzahl der Intersektionen zwischen den Kreisen, welche von einem Fortsatz berührt wurden, ermittelt. Bei abzweigenden Fortsätzen wurden nur die zusätzlichen Intersektionen hinzugerechnet. Basierend auf dieser Methode kann die Gesamtlänge der Fortsätze einer Zelle und somit auch einer Zellpopulation berechnet werden (Sholl, 1953; Skogh und Campbell, 2003).

Für die statistische Auswertung wurde ein nichtparametrischer U-Test (Mann-Whitney-Test) verwendet. Dieser Test wurde mit dem Programm SPSS für Windows 11.01 durchgeführt (Originaldaten hierzu finden sich im Anhang, siehe Kapitel 5.2.1).

Abb. 5) Messung der Fortsatzlänge nach Sholl (1953):

Der Zellkern einer zu messenden Zelle wurde in das Zentrum der Schablone gelegt und die von den Zellfortsätzen durchkreuzten Intersektionen bestimmt. Der Maßstab gibt den Radius der jeweiligen Messkreise an.



2.1.3.3 Immunozytochemie von kultivierten CSM14.1-Zellen

Die *in vitro* Differenzierung der CSM14.1-Zellen wurde mittels immunhistochemischer Markierung gegen Stammzellmarker und neuronale oder gliale Markerproteine untersucht.

Die Färbeprozedur für die speziellen Primär- und Sekundärantikörper verlief folgendermaßen: CSM14.1-Zellen, für zwei Tage unter permissiven Kulturbedingungen (33° C, 10% FKS) oder für 3, 7, 10 und 14 Tagen unter Differenzierungsbedingungen (39° C, 1% FKS) auf Poly-L-Lysin beschichteten Kulturobjektträgern kultiviert, wurden am Tage der Entnahme jeweils kurz mit 0,9% NaCl-Lösung gespült und mit 4% PFA (in PBS) für 1 h bei RT fixiert. Nach Waschen in 0,1M TRIS-Puffer (TRIS, 0,1M, pH 7,4, Serva) wurden die Präparate für 1 h bei RT in einer Lösung aus TRIS-Puffer, 3% Rinderserumalbumin (bovine serum albumine, BSA, Sigma), 5% normales Ziegeserum (normal goat serum, NGS, Gibco) und 0,05% Triton-X100 (Sigma), zum Neutralisieren unspezifischer Bindungsstellen, geblockt und anschliessend über Nacht bei 4° C in einem Inkubationsmedium (TRIS, 1% BSA und 0,025% Triton-X100) mit den entsprechenden Primärantikörpern (siehe unten) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden nichtgebundene Primärantikörper mit TRIS heruntergespült. Nach dreimaligem Waschen in TRIS erfolgte wiederum über Nacht bei 4° C die Inkubation mit Sekundärantikörpern, die gegen die jeweilige Primärantikörperspezies gerichtet waren (gelöst in TRIS, 1% BSA und 0,025% Triton-X100).

Bei fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern erfolgte dann für 5 min bei RT eine Markierung der Zellkerne mit dem blaufluoreszierenden Farbstoff Diamidino-Phenylindol (DAPI, 5×10^{-7} %ig in TRIS, Roth, Karlsruhe, Deutschland). Nach wiederholtem Spülen in TRIS wurden die Präparate mittels wässrigem Fluoreszenzeinbettmedium (MoBiTec, Göttingen, Deutschland) eingebettet.

Präparate für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden nach der Fixierung in 4% PFA kurz mit TRIS gewaschen, zur Blockung endogener Peroxidasen für 20 min bei RT in einer Lösung aus 3% H₂O₂ (in TRIS gelöst, Sigma) inkubiert und wiederum mit TRIS-Puffer gewaschen. Nach dem Abblocken, der Primär- und Sekundärantikörperinkubation (jeweils über Nacht bei 4° C) wurden die markierten Strukturen mittels eines ABC-Kits (Dianova, Hamburg, Deutschland) und dem bräunlichen Chromogen Diaminobenzidin (Sigma) nach der bekannten Avidin-Biotin-Methode visualisiert. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte die Einbettung in DePeX (Serva).

Eine Liste der verwendeten Antikörper und weitere Informationen diesbezüglich findet sich unter 2.4.

2.1.4 Untersuchungen von CSM14.1-Proteinlysaten

2.1.4.1 Western Blot

Um eine weitere Charakterisierung der differenzierenden CSM14.1-Zellen *in vitro* durchzuführen, wurden Proteinlysate bezüglich des Gehalts bestimmter Markerproteine mit Hilfe der Western Blot-Technik untersucht. Diese Methode ist sensitiver als die oben beschriebene Immunhistochemie an fixierten Zellen; zudem lässt sie semiquantitative Aussagen über den Gehalt von Proteinen zu, da vergleichende Mengen an Gesamtprotein untersucht werden können.

Gewinnung des Zelllysates: CSM14.1-Zellen, für zwei Tage unter permissiven Kulturbedingungen (33° C, 10% FKS) oder für 3, 7, 10 und 14 Tagen unter Differenzierungsbedingungen (39° C, 1% FKS) in Petrischalen (Greiner) kultiviert, wurden am Tage der Entnahme jeweils mit PBS gespült und durch Trypsinierung (Gibco) vom Boden der Petrischalen abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden 10 min bei 400 g zentrifugiert (Labofuge 200, Heraeus, Osterode, Deutschland), der Überstand abgenommen und die trypsinisierten Zellsuspensionen mit serumhaltigem Medium gewaschen. Nach diesem Schritt wurde die Anzahl vitaler Zellen mit Trypanblau ermittelt und es erfolgte wiederum eine Zentrifugation für 10 min bei 400 g, ein Abnehmen des Überstandes und schliesslich die Zugabe von 100 µl PBS auf 5×10^5 Zellen zu dem jeweiligen Zellpellet.

Gewinnung der Probenlösungen: Nach mehrmaligem Auftauen und Einfrieren der Suspensionen (-80° C) wurden diese einer Messung des Gesamtproteingehalts unterzogen. Für die Proteinmessung wurden ein BCA-Kit (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA) und ein Spektrophotometer (Model DU640, Beckman, Fullerton, CA, USA) nach den Herstellerangaben verwendet. Nach Ermitteln des Gesamtproteingehalts wurden jeweils vergleichbare Mengen an Gesamtprotein (500 µg) aus den Probenlösungen entnommen und mit SDS-Probenpuffer (Laemmli, 1970) auf 200 µl Volumen gebracht und anschließend für 5 min im Wasserbad bei 95° C denaturiert. Der Proben- bzw. Lysepuffer bestand aus folgenden Reagenzien: 52 ml Aqua dest., 1 g SDS (Serva), 5 g Glycin (Roth), 92,5 mg EDTA (Roth), 0,4 g TRIS (Serva), 10 mg Bromphenolblau (Roth), 2,5 ml β-Mercaptoethanol (Roth).

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE): 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. Jede Probentasche wurde mit 20 µl Lysepuffer (entsprechend 50 µg Gesamtprotein) der jeweiligen Probe gefüllt. Bei konstanten 170 V unter Verwendung einer Mini-Elektrophoresekammer (Criterion-Cell, Bio-Rad) dauerte die Gelelektrophorese ca. 1 h. Der Elektrodenpuffer bestand aus 3 g TRIS (Serva), 14,4 g Glycin (Roth), 1 g SDS (Serva) und einem Liter H₂O. Als Marker wurde ein Molekulargewichtsstandard von 6,5-175 kDa verwendet (Bio-Rad).

Western Blot und Immundetektion: Aus dem Polyacrylamidgel wurden die Proteine mittels „Semidry Blot“ auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) übertragen. Der Blotpuffer bestand aus 5,8 g TRIS (Serva), 2,9 g Glycin (Roth), 0,375 g SDS (Serva), 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, USA) angelegt. Die Spannungs- und Stromquelle für die Gelelektrophorese und den Semidry Blot lieferte ein Spannungsgeber (Modell 1500, Hoefer).

Nach der Proteinübertragung auf die Membran wurde diese in 0,1M PBS (PBS, siehe 2.1.3.1) gespült und die unspezifischen Bindungsstellen in einer Blocklösung aus PBS, 1% BSA (Sigma) und 0,1% Tween20 (Sigma) für eine Stunde geblockt. Die Primärantikörperinkubation (gelöst in Blocklösung) erfolgte bei 4° C über Nacht. Nach viermaligem Waschen in PBS und 0,1% Tween20 (PBST) wurden die Membranen mit Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern (ebenfalls in Blocklösung) für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach erfolgten vier Waschschrte in PBST. Die Membranen wurden daraufhin für 1 min mit einem ECL-Detektionskit (Amersham Biosciences) inkubiert und anschliessend die nach der Chemolumineszenz-Methode positiv markierten Banden unter Verwendung eines 100NIF-Röntgenfilms (Agfa, Mortsel, Belgien) detektiert.

Die verwendeten Antikörper und weitere Informationen dazu finden sich unter 2.4.

2.2 Läsions- und Transplantationsexperimente

2.2.1 Verwendete Tiere

Die Untersuchungen wurden an adulten, 300-450 g schweren, männlichen Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus*, Charles River WIGA, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Jeweils zwei Ratten wurden in einem Makrolonkäfig (720 cm² Fläche) bei einer Standardnahrung (Ssniff, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum* in einem künstlichen 12/12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei 22 ± 2° C im Tierstall des Instituts für Anatomie (Universität Rostock) gehalten. Insgesamt wurden 29 Tiere (Körpergewicht zu Beginn der Experimente ca. 300 g) unilateral mit 6-OHDA (Sigma) läsiert (siehe 2.2.2). Nach Ermittlung der erfolgreich durchgeführten Läsion (siehe 2.2.3) erhielten zwölf Tiere ein Zelltransplantat. Elf weitere Tiere erhielten anstelle des Transplantats nur das Nährmedium (DMEM), in dem die Zellen gelöst waren. Diese Tiere dienten als scheintransplantierte Kontrollen (siehe Tabelle 1, folgende Seite). Alle Experimente wurden nach den gültigen gesetzlichen Bestimmungen und mit der Erlaubnis der örtlichen Kontrollbehörden durchgeführt.

Tabelle 1) Auflistung der Versuchstiere und ihre Behandlung:

Aufgeführt sind die Nummern der Versuchstiere, deren Geburtsdatum, Zeitpunkt der Läsion mit 6-OHDA, die Art und der Zeitpunkt der Behandlung (Transplantat oder Scheintransplantat mit DMEM), sowie schließlich der Zeitpunkt der Gehirnentnahme

Versuchstier	Geburtsdatum	Läsionstag	Transplantat	Transplantation	Hirnentnahme
Zelltransplantate:					
L72	14.2.99	14.4.99	CSM14.1	27.4.99	21.7.99
L73	29.1.99	14.4.99	CSM14.1	27.4.99	21.7.99
L74	29.1.99	14.4.99	CSM14.1	27.4.99	21.7.99
L76	21.2.99	14.4.99	CSM14.1	27.4.99	21.7.99
L82	11.2.99	14.4.99	CSM14.1	27.4.99	21.7.99
L15	10.7.99	13.10.99	CSM14.1	25.10.99	19.1.00
L16	15.8.99	13.10.99	CSM14.1	25.10.99	19.1.00
L17	15.8.99	13.10.99	CSM14.1	25.10.99	19.1.00
L18	7.8.99	13.10.99	CSM14.1	25.10.99	19.1.00
L19	6.7.99	13.10.99	CSM14.1	25.10.99	19.1.00
L20	16.7.99	13.10.99	CSM14.1	25.10.99	19.1.00
L21	16.7.99	13.10.99	CSM14.1	25.10.99	19.1.00
Scheintransplantate:					
L87	17.2.99	5.5.99	DMEM	17.5.99	11.8.99
L91	5.3.99	5.5.99	DMEM	17.5.99	11.8.99
L92	3.3.99	5.5.99	DMEM	17.5.99	11.8.99
L96	6.3.99	5.5.99	DMEM	17.5.99	11.8.99
L98	14.3.99	16.6.99	DMEM	28.6.99	22.9.99
L4	29.3.99	16.6.99	DMEM	28.6.99	22.9.99
L10	13.4.99	16.6.99	DMEM	28.6.99	22.9.99
L11	7.8.99	13.10.99	DMEM	25.10.99	19.1.00
L12	27.7.99	13.10.99	DMEM	25.10.99	19.1.00
L13	6.7.99	13.10.99	DMEM	25.10.99	19.1.00
L14	6.7.99	13.10.99	DMEM	25.10.99	19.1.00

2.2.2 Einseitige dopaminerge Deafferentierung

Nach Narkotisierung der Versuchstiere durch die intraperitoneale Injektion von Pentobarbital- Na^+ (45 mg/kg Lebendgewicht, Serva) erhielten die Tiere eine weitere intraperitoneale Injektion mit dem Noradrenalin-Membrantransporter-Hemmer Desipramin (25 mg/kg Körpergewicht, Sigma) zur Protektion noradrenerger Nervenzellen. Diese gehören ebenfalls zu den katecholaminergen Nervenzellen und Desipramin verhindert bei diesen die Aufnahme

von 6-OHDA. Dann wurden die Tiere mit zwei Ohrstiften und einer Kieferklammer in einen stereotaktischen Apparat (Kopf, Tujunga, Ca, USA) so fixiert, daß sich die Schädeldecke der Ratte horizontal befand. Die Orientierungspunkte Bregma und Lambda befinden sich dann auf gleicher Höhe. Dadurch war sichergestellt, daß die Kopfhaltung mit der stereotaktischen Lage des Rattenkopfes gemäß des Atlas von Paxinos und Watson (1986) übereinstimmte ("flat skull position"). So konnten die stereotaktischen Koordinaten dieses Atlas für die Auffindung der rechten nigrostriatalen Faserbahn, des medialen Vorderhirnbündels (siehe Kapitel 1.5, Tiermodell des Morbus Parkinson) genutzt werden.

Die unilaterale Injektion des 6-Hydroxydopamins (6-OHDA) in die rechte Hemisphäre des Gehirns wurde folgendermaßen durchgeführt:

Mit einem Skalpell wurde in der Mitte der Kopfhaut ein ca. 2 cm großer Längsschnitt in rostro-caudaler Richtung durchgeführt und das darunterliegende Periost entfernt. Nach Ermittlung der Injektionskoordinaten anhand der stereotaktischen Bezugspunkte, erfolgte die kleinflächige (ca. 2 mm x 2 mm) Trepanation des nun freiliegenden Schädelknochens mittels eines Handstückbohrers (Reco Dental, Wiesbaden, Deutschland). Die Dura mater wurde mit einem feinen Skalpell eröffnet und die Wunde mit steriler Kochsalzlösung ausgespült. Eine 5 µl Hamilton-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) wurde mittels Halter in die zuvor bestimmte Tiefe eingeführt. Nach einer Minute Wartezeit wurden 4 µl der 6-OHDA-Lösung (26 µg 6-OHDA, Sigma), aus einer frisch angesetzten Lösung (760 µl 0,9%ige NaCl-Lösung, 760 µg L(+) Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 5 mg 6-OHDA) über einen Zeitraum von 4 min injiziert. Folgende Koordinaten in Bezug auf den Interauralpunkt sollten erreicht werden: AP + 6,7; ML -1,5; V +1,5 (Paxinos und Watson, 1986). Nach weiteren 5 min wurde die Injektionsnadel durch langsames Zurückziehen entfernt, die Kopfhaut vernäht und die Tiere, unter einer Wärmelampe, bis zum Aufwachen aus der Narkose weiterhin beobachtet.

2.2.3 Apomorphin-induzierte Rotationen

Um das Ausmass der dopaminergen Deafferentierung zu ermitteln, wurden bei den läsierten Versuchstieren Apomorphin-abhängige Rotationen untersucht (0,25 mg/kg Körpergewicht, Teclapharm, Lüneburg, Deutschland). Der nichtselektive D1/D2-Rezeptoragonist Apomorphin löst bei unilateral dopaminerg deafferentierten Ratten ein charakteristisches kontralaterales Drehverhalten aus (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970). Diese Rotationen können ausgewertet und mit der Menge abgestorbener dopaminergischer Nervenzellen der geschädigten Hemisphäre korreliert werden. Tiere, bei denen über 97% der nigrostriatalen

dopaminergen Neurone einer Hemisphäre abgestorben sind, rotieren im Durchschnitt mehr als vier mal pro min über einen Zeitraum von 40 min (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970). Die Tiere erhielten eine Woche nach Läsion eine subkutane Injektion mit Apomorphin (0,25 mg/kg Körpergewicht) in den Nacken, und die Rotationen wurden über 40 min mit Hilfe eines Rotometers, wie es auch in der Publikation von Ungerstedt und Arbuthnott (1970) zum Einsatz kam, ermittelt. Das verwendete Rotometer wurde nach Plänen gebaut, die uns freundlicherweise von Prof. G. Nikkhah (Klinik für Stereotaktische Neurochirurgie, Universität Freiburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt wurden.

Weitere apomorphinabhängige Rotationen wurden bei den Tieren 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 und 12 Wochen nach Transplantation, Scheintransplantation oder vergleichbaren Zeitpunkten (unbehandelte Tiere) ermittelt, um die therapeutische Wirksamkeit einer Behandlung (Transplantation) zu untersuchen.

2.2.4 Transplantation PKH26-markierter CSM14.1-Zellen

In die folgenden Studien gingen nur Tiere ein, die bei der vorhergehenden Untersuchung der apomorphininduzierten Rotationen eine Woche nach Läsion mehr als 4 Rotationen/min aufwiesen. Zwei Wochen nach erfolgreicher Läsion wurden die Tiere mit Pentobarbital- Na^+ (45 mg/kg Lebendgewicht, Serva) narkotisiert, in einen stereotaktischen Apparat positioniert (Kopf) und wiederum der Schädelknochen nach Freilegen mittels eines Handstückbohrers (Reco Dental) an der zuvor bestimmten Injektionsstelle trepaniert. Die Koordinaten für das bilaterale Zelltransplantat (bzw. einer DMEM-Lösung für Scheintransplantate) in das Caudatus-Putamen (CPu) wurde hierbei auf Bregma bezogen: AP +0,5, ML $\pm$ 3,5, V -5,5 (Paxinos und Watson, 1986). Die Tiere erhielten entweder ein bilaterales Transplantat mit ca. 100000 vitalen PKH26-markierten (Sigma) undifferenzierten CSM14.1-Zellen (1 μ l Zellsuspension, gelöst in DMEM, n = 12), ein bilaterales Scheintransplantat bestehend aus 1 μ l DMEM (Gibco, n = 11) oder es erfolgte keine weitere Behandlung (n = 6).

Die Markierung der CSM14.1-Zellen mit dem lipophilen fluoreszierenden Farbstoff PKH26 (Horan und Slezak, 1989) machte es möglich, die transplantierten Zellen in den später anzufertigenden Hirnschnitten wieder aufzufinden und mittels Immunhistochemie zu charakterisieren (Haas et al., 2000). Die Markierung der CSM14.1-Zellen mit PKH26 erfolgte nach den Herstellerangaben, bzw. nach dem Schema von Haas et al. (2000). Hierzu wurden undifferenzierte CSM14.1-Zellen, bei 33° C in 10% FKS-haltigem DMEM (Gibco) kultiviert, für 20 min trypsinisiert (Gibco) anschliessend bei 400 g zentrifugiert (Labofuge 200) und nach dem Abnehmen des Überstands wiederum in DMEM mit 10% FKS aufgenommen. Es folgten

drei Waschschritte in serumfreiem DMEM und die fünfminütige Inkubation in der PKH26/Diluent-C Markierungslösung (Sigma). Durch Zugabe von fötalem Kälberserum wurde die Markierungsreaktion beendet und die Zellen wiederum zentrifugiert (400 g), der Überstand abgenommen und die Zellen dreimal mit serumfreiem DMEM gewaschen. Vor der Transplantation erfolgte die Bestimmung der Anzahl lebender Zellen mit einem Hämatozytometer (Neubauer-Zählkammer) und Trypanblau (Sigma). Die Anzahl lebender Zellen wurde daraufhin auf ca. 100000/ μ l DMEM eingestellt, und die Zellen bei 4° C bis zur Transplantation gelagert. Erneute Auszählung am Ende eines jeweiligen Transplantationsexperiments (ca. 12 h nach Beendigung der Markierung) ergab immer noch eine Anzahl von über 90% vitaler Zellen. Die verbleibenden PKH26-markierten Zellen wurden am Ende der Zelltransplantation wiederum über Nacht bei 33° C im Inkubator kultiviert, um die Vitalität der Zellen zu demonstrieren.

2.2.5 Aufarbeitung der Gehirne

Zur Perfusion der Ratten wurden die Tiere 3 Monate nach intrazerebraler Transplantation mit einer intraperitonealen Gabe von 80 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital- Na^+ (Serva) 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. Zur Vorspülung wurden mit einem Flaschensystem, unter einem Druck von 100-110 mm Hg, die Blutgefäße mit 50 ml einer eiskalten 0,9%igen NaCl-Lösung gespült, danach wurden die Tiere mit 500 ml eiskaltem 4%igem PFA (in 0,1M PBS, pH 7,4) perfundiert. Um dem Gehirn möglichst grosse Mengen an Fixans zukommen zu lassen, wurde zusätzlich die Aorta abdominalis abgeklemmt. Nach der Entnahme der Gehirne wurden diese für 4 h bei RT in 4% PFA immersionsfixiert und anschliessend über Nacht bei 4° C in einer 20%igen Saccharoselösung (in 0,1M PBS, pH 7,4) entwässert und kryoprotektiert. Nachdem die Gehirne vollständig abgesunken waren, erfolgte das Einfrieren in -50° C kaltem Isopentan (Roth). Die Hirne wurden dann bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80° C gelagert.

2.2.6 Anfertigen von Gewebeschnitten und Vorbereitung für die Immunhistochemie und gleichzeitige Detektion der PKH26-markierten Zellen

Um Gewebsschnitte immunhistochemisch färben zu können ohne die lipophile Fluoreszenzmarkierung der transplantierten PKH26-markierten Zellen zu verlieren, war es notwendig, intrazelluläre Epitope ohne die Verwendung von Detergentien oder Alkoholen für

die Antikörper zugänglich zu machen (Horan und Slezak, 1989, Haas et al., 2000). Daher wurden die Hirnschnitte vor der Antikörperinkubation nach der „Freeze-Thaw-Methode“ behandelt (Huneau et al., 1988). In einem Kryostaten (Jung CM3000, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden 30 µm dicke Parallelschnitte der Gehirne angefertigt und mit einem Pinsel in eine 30%ige Saccharoselösung (in 0,1M PBS gelöst, pH 7,4) überführt. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4° C gelagert, am nächsten morgen in Aluminiumgefäße überführt und rasch, bevor die Schnitte austrockneten, 5x wiederholt über flüssigem Stickstoff gefroren und wieder aufgetaut. Durch einen derartigen Einfrieren-Auftauen-Zyklus wurden die Zellmembranen perforiert, so dass eine spätere immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte ohne Artefaktbildung und die Anwendung von sonst üblichen Detergentien (Haas et al., 2000) durchgeführt werden konnte.

Nach dem Einfrieren/Auftauen wurden die Hirnschnitte dreimal in TRIS (0,1M, pH 7,4) gewaschen und für eine Stunde in einer Lösung aus TRIS, 3% BSA (Sigma) und 5% NGS (Gibco) abgeblockt. Die Primärantikörperinkubation (in TRIS, 1% BSA) erfolgte über 48 h bei 4° C. Danach wurden die Präparate dreimal in TRIS gewaschen, und die Inkubation mit fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörpern erfolgte über Nacht bei 4° C. Am darauf folgenden Tag wurden die Gewebeschnitte dreimal mit TRIS gewaschen, auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen und mit einem wässrigen Fluoreszenzeinbettmedium (MoBiTec) eingebettet.

Einige Schnitte (aus dem Bereich des CPU und der Substantia nigra pars compacta) wurden auch einer lichtmikroskopischen Tyrosinhydroxylase-Darstellung mittels der bekannten ABC-Methode (Dianova) und dem Chromogen Diaminobenzidin unterzogen. Hierbei wurden die Präparate allerdings vor dem Blocken für 20 min bei RT in 3% H₂O₂ inkubiert, dreimal mit TRIS gewaschen und abgeblockt. Nach der Primär- und Sekundärantikörperinkubation erfolgte eine Inkubation im ABC-Komplex (45 min bei RT), wiederholtes Waschen in TRIS und die anschließende Fällung des Diaminobenzidins (0,02% in PBS gelöst, Sigma) für ca. 8 min bei RT. Nach dem Aufziehen der Schnitte auf gelatinisierte Objektträger und anschließender Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte eine Einbettung in DePeX (Serva).

Die Angaben über die verwendeten Antikörpern und deren Verdünnung finden sich unter 2.4.

2.3 Auswertung und Dokumentation der histologischen Präparate:

Die Untersuchung der Präparate erfolgte unter Verwendung eines Leitz Aristoplan-Forschungsmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland), das über einen Filterblocksatz für die

Fluoreszenzmikroskopie verfügt. Es konnten blau- (AMCA, maximale Absorbtion bei 350 nm und maximale Emission bei 450 nm, Ultraviolettfilter), grün- (CY2, maximale Absorbtion bei 492 nm und maximale Emission bei 510 nm, Fluoreszeinfilter) und rot- (PKH26, maximale Absorbtion bei 488 nm und maximale Emission bei 514 nm, Rhodaminfilter) emittierende Fluoreszenzen detektiert werden. Zudem verfügte es über einen Rhodamin- und Fluoreszeinkombinationsfilter. Die Präparate wurden mit einem Kameraaufsatz für Kleinbildfilme dokumentiert.

2.4 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Die hier vorliegende Arbeit basiert im wesentlichen auf dem Proteinnachweis mit Hilfe der Immunhistochemie, immunzytochemischer Verfahren oder der Western Blot-Methode, bei denen ausschliesslich Antikörper zur Detektion von Proteinen eingesetzt werden. Aus diesem Grund soll im Folgenden näher auf die verwendeten Antikörper und die von ihnen markierten Strukturen eingegangen werden.

Tabelle 2) Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper:

Primärantikörper (aus Spezies)	Charakteristisch für folgende Zelltypen	Verdünnung in der Immunzyto- u. Immunhistochemie	Verdünnung im Western Blot	Bezugsquelle
Anti-Nestin (Maus)	neurale Stammzellen	1:500	-	Becton- Dickinson
Anti-GFAP (Maus)	Gliazellen (Astrozyten)	1:400	1:800	Sigma
Anti-MAP5 (Maus)	Neurone	1:500	-	Sigma
Anti-NSE (Kaninchen)	Neurone	1:500	1:1000	Chemicon
Anti-NF200 (Kaninchen)	Neurone	1:100	-	Sigma
Anti-NeuN (Maus)	Neurone	1:1000	1:5000	Chemicon
Anti-Nurr1 (Maus)	dopaminerge Progenitoren	1:500	1:750	Becton- Dickinson
Anti-TH (Maus)	dopaminerge Neurone	1:500	1:3000	Sigma
Anti-ALDH-2 (Kaninchen)	dopaminerge Neurone	-	1:1000	Dr. J.J. Lipsky (Kathmann et al., 2000)
Anti-β-Aktin (Maus)	alle Zellen, interner Kontrollstandard	-	1:3000	Sigma
Anti-Large-T- Antigen (Maus)	immortalisierendes Onkogenprodukt	-	1:500	Becton- Dickinson
Anti-CNTF (Ziege)	Ciliary Neurotrophic Factor	1:100	1:1000	R&D Systems
Anti-GDNF (Ziege)	Glial Cell Line- Derived Neurotrophic Factor	1:100	1:1000	R&D Systems
Sekundärantikörper (aus Spezies)	Konjugat	Verdünnung in der Immunzyto- u. Immunhistochemie	Verdünnung im Western Blot	Bezugsquelle
Anti-Maus (Ziege)	CY2	1:400	-	Dianova
Anti-Kaninchen (Ziege)	AMCA	1:100	-	Dianova
Anti-Maus (Pferd)	Biotin	1:80	-	Dianova
Anti-Kaninchen (Pferd)	Biotin	1:80	-	Dianova
Anti-Ziege (Pferd)	Biotin	1:200		Dianova
Anti-Maus (Pferd)	Peroxidase	-	1:5000	Vector
Anti-Ziege (Pferd)	Peroxidase	-	1:10000	Vector
Anti-Kaninchen (Ziege)	Peroxidase	-	1:10000	Vector

2.4.1 Primärantikörper

Neurale Stamm- oder Progenitorzellen

Neurales Stammzellprotein (Nestin)

Anti-Nestin (Klon: Rat401, aus der Maus, monoklonal, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) erkennt das sogenannte neurale Stammzellprotein (**Neural Stem Cell Protein = Nestin**) in neuronalen Stamm- und Progenitorzellen der Ratte (Lendahl et al., 1990). Es handelt sich dabei um ein ca. 200 kDa schweres Intermediärfilament, welches im ZNS der Ratte um den 15. Embryonaltag (E15) in allen neuronalen Progenitorzellen nachweisbar ist (Frederiksen und McKay, 1988b; Lendahl et al., 1990). Im adulten intakten ZNS ist es nur in proliferativen Regionen nachweisbar (Cameron und McKay, 1998), ausdifferenzierende Neurone besitzen kein Nestin mehr (Svendsen et al., 2001). Eine positive Anfärbung stellt sich in einer intrazellulären filamentösen Markierung dar, der Kern bleibt ausgespart, um ihn herum befindet sich allerdings ein dichtes Faserwerk dieser Filamente.

Die Inkubation in der Immunhistochemie mit Anti-Nestin fand in einer Endverdünnung von 1:500 statt.

Gliamarker

Saures Gliafaserprotein (GFAP)

Anti-GFAP (**G**lial **F**ibrillary **A**cidic **P**rotein = **GFAP**, Klon: GA5, aus Maus, monoklonal, Sigma) bindet an ein Intermediärfilament von Astrozyten (Eng et al., 1971; Eng und Kosek, 1974; Debus et al., 1983; Franke et al., 1991). Das Molekulargewicht von GFAP aus dem ZNS der Ratte beträgt ca. 51 kDa (Eng, 1980). GFAP kann eng mit dem Intermediärfilament Vimentin kolokalisiert sein, welches nicht ausschliesslich in Astrozyten vorkommt. Jedoch kommt GFAP nie mit Neurofilamenten in einer Zelle vor (Eng, 1980), weshalb es der gebräuchlichste Marker für Astroglia ist. Eine positive Markierung von Zellen mit GFAP stellt das sternförmige filamentöse Zellgerüst der Astrozyten dar, wobei der Zellkern ausgespart bleibt.

Anti-GFAP wurde für die Immunhistochemie 1:400 verdünnt; im Western Blot 1:800.

Neuronenmarker

Im folgenden werden Marker für die allgemeine neuronale (1) und speziell für die dopaminerge (2) Differenzierung erläutert.

1) Allgemeine neuronale Differenzierung

a) Mikrotubulinassoziiertes Protein 5 (MAP5)

Anti-MAP5 (auch MAP1b genannt, Klon: AA6, aus Maus, monoklonal, Sigma) erkennt Bestandteile der Mikrotubuli von Nervenzellen. Diese ca. 320 kDa schweren Proteine finden sich in den Dendriten von Neuronen, wobei sie den grössten Teil der mikrotubulinassoziierten Proteine ausmachen. Im Laufe der weiteren Entwicklung findet sich MAP5 auch im Soma und dem Axon von Nervenzellen. Sein Vorkommen korreliert mit dem von MAP2, welches ebenso als Marker für eine neuronale Differenzierung dient (Palmer et al., 1997).

Für die immunhistochemischen und immunzytochemischen Präparate wurden MAP5-Antikörper 1:500 verdünnt.

b) Neuronales nukleäres Antigen (NeuN)

Anti-NeuN (**N**eural **N**uclei = **NeuN**, Maus, Klon A60, monoklonal, Chemicon, Hofheim/Ts, Deutschland) richtet sich gegen einen Kernbestandteil von Neuronen des zentralen sowie des peripheren Nervensystems von Wirbeltieren (Mullen et al., 1992). Der Antikörper reagiert nur mit postmitotischen Neuronen und bindet an ein Protein, welches 46-48 kDa schwer ist. Bislang ist die Funktion dieses Proteins noch nicht aufgeklärt. Aufgrund der Kernlokalisation und den DNA-bindenden Eigenschaften wird jedoch vermutet, dass es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt, der für die Ausbildung eines neuronalen Phänotyps verantwortlich ist (Mullen et al., 1992; Sarnat et al., 1998). Der Antikörper bindet an eine Vielzahl von unterschiedlichen Nervenzelltypen, jedoch erkennt er einige wenige Typen von Nervenzellen nicht (z. B. Purkinje-Zellen des Kleinhirns, Mitralzellen des Bulbus olfactorius) (Mullen et al., 1992). Aufgrund der intensiven Markierung der meisten postmitotischen ausdifferenzierten Neurone ist der monoklonale Antikörper NeuN ein Standardmarker für die Charakterisierung von Nervenzellen (Gage et al., 1995). Dieser Antikörper kam auch in einer Studie zur Anwendung, welche erstmals die adulte Neuroneogenese im Gehirn des Menschen beschrieb (Eriksson et al., 1998). Immunreaktive Strukturen sind vor allem der Zellkern von Nervenzellen, zudem wird auch deren Zytoplasma schwach angefärbt. Im Western Blot von Lysat aus Hirngewebe werden 2-3 Banden im Bereich von ca. 46-48 kDa gefunden. Eine weitere kann bei ca. 66 kDa vorkommen.

Für die Immunhistochemie und Immunzytochemie wurde Anti-NeuN 1:1000 verdünnt und in Western Blots kam der Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 zum Einsatz.

c) Neuronen Spezifische Enolase (NSE)

Anti-NSE (Neuronen Spezifische Enolase = NSE, aus Kaninchen, polyklonal, Chemicon) erkennt ein ca. 39 kDa schweres Enzym, welches mit Neuronen assoziiert werden kann (Grasso et al., 1977; Schmechel et al., 1978). NSE konnte allerdings inzwischen auch in nichtneuronalen Zellen, z. B. heranreifenden und ausdifferenzierten Oligodendrozyten, nachgewiesen werden (Sensenbrenner et al., 1997). Daher kann eine Charakterisierung von Progenitoren zu sich differenzierenden Neuronen aufgrund des Nachweis dieses Proteins alleine nicht vorgenommen werden, sondern muss mit weiteren zelltypspezifischen Markern belegt werden (Svendsen et al., 2001). Eine positive Anfärbung markiert das Zytoplasma von Zellen gleichmässig stark. Im Western Blot wird aufgereinigtes NSE bei einem Molekulargewicht von ca. 39 kDa detektiert. Lysat aus Hirngewebe der Ratte allerdings kann eine komplexe Serie von Banden aufweisen, die von ca. 78-80 kDa (NSE-Homodimer) bis zu ca. 20 kDa (Gamma-Enolase-Degradationsprodukt) reicht.

Für die Immunzyto- und die Immunhistochemie wurde der hier verwendete Antikörper gegen NSE 1:500 verdünnt. Im Western Blot betrug die Verdünnung 1:1000.

d) Neurofilament 200 kDa (NF200)

Der polyklonale Antikörper gegen das NF200 (aus Kaninchen, Sigma) richtet sich gegen ein Intermediärfilament, welches charakteristisch für Nervenzellen ist (Wood und Anderton, 1981). Die 200 kDa schweren Neurofilamente besitzen einen Durchmesser von ca. 8-10 nm und eine ungefähre Länge von 150 nm, sie bilden mitunter die Grundlage des neuronalen Zytoskeletts und sind in den Axonen der Neurone in hoher Konzentration nachweisbar (Shelanski, 1987; Svendsen et al., 2001). Der Antikörper zeigt keine Kreuzreaktion mit den leichteren Neurofilamenten von ca. 160 kDa und 68 kDa, welche auch spezifisch für Nervenzellen sind. Eine positive Reaktion in der Immunzyto- und Immunhistochemie stellt sich durch eine Faserdarstellung mit einem perinukleären Netz und Anfärbung des Axons dar. Für die Immunzyto- und Immunhistochemie wurde der Antikörper 1:100 verdünnt.

2) Für die dopaminerge Differenzierung

a) Nurr1

Anti-Nurr1 (Klon: 6, aus Maus, monoklonal, Becton Dickinson) erkennt den nukleären Retinsäurerezeptor 1 (**Nurr1** = **n**uclear **r**etinoic acid **r**eceptor **1**, Zetterström et al., 1997), dessen biologischer Ligand noch unbekannt ist (Wagner et al., 1999; Wang et al., 2003; Li et al., 2007). Die Expression von Nurr1 ist notwendig, damit mesenzephal Progenitoren vollständig in dopaminerge Neurone ausdifferenzieren können. Fehlt ihnen dieser Rezeptor,

wie in Knock-out Studien von Zetterström et al. (1997) gezeigt, können die angelegten mesenzephalen Progenitoren der Substantia nigra pars compacta nicht ausdifferenzieren und sterben ab, bevor sie einen dopaminergen Phänotyp ausbilden. Nurr1 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 72 kDa. Im Western Blot werden Nurr1-positive Proteinlysate mit einer Bande bei ca. 72 kDa dargestellt.

Der Antikörper wurde im Western Blot 1:750 verdünnt. Obwohl er nicht für die Immunzytochemie vorgesehen ist, wurden solche Experimente an CSM14.1-Zellkulturen in einer Verdünnung von 1:500 durchgeführt.

b) Tyrosinhydroxylase (TH)

Um die dopaminerge Differenzierung zu untersuchen, kann das Enzym Tyrosinhydroxylase (Tyrosinhydroxylase = TH) als Nachweis dienen, da es das Schrittmacherenzym für die Synthese von Dopamin ist. Es wandelt die Aminosäure Tyrosin durch Hydroxylierung in Dihydroxyphenylalanin, einer Vorstufe von Dopa und letztendlich des Dopamins selbst, um (Jatzkewitz, 1978). Der hier gegen TH verwendete Antikörper (Anti-TH, Klon: TH-2, aus der Maus, monoklonal, Sigma) erkennt ein ca. 60 kDa schweres N-terminales Epitop der Tyrosinhydroxylase von Nagern. TH-positive Zellen werden durch eine Anfärbung des gesamten Zytoplasmas bis in die Ausläufer dargestellt. Bis zu drei TH positive Banden von ca. 60-68 kDa können im Western Blot auftreten.

Anti-TH wurde für die Immunzyto- und die Immunhistochemie 1:500 verdünnt. Für Western Blots wurde Anti-TH 1:3000 verdünnt.

c) Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH2)

Die Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH2) gehört zu einer Klasse von relativ unspezifischen Enzymen, die in der Lage sind, verschiedene Retinaldehyde in Retinsäure umzuwandeln (Wallen et al., 1999). Das physiologische Substrat für ALDH2 in der Substantia nigra ist noch unbekannt (Wallen et al., 1999; Perrone-Capano und Di Porzio, 2000), jedoch sind derart metabolisierte Retinsäuren in der Lage an Nurr1 zu binden (Wagner et al., 1999), was zu einer weiteren Differenzierung dieser Progenitorzellen in dopaminerge Neurone, bzw. den Erhalt eines ausgereiften dopaminergen Phänotyps führen könnte. In neurobiologischen Studien dient das Enzym ALDH2 jedoch als weiteres Markerprotein für differenzierte mesenzephal dopaminerge Neurone, da diese ALDH2 besitzen (McCaffery und Dräger, 1994; Wagner et al., 1999; Perrone-Capano und Di Porzio, 2000). Der in dieser Studie verwendete polyklonale Antikörper gegen ALDH2 (aus Kaninchen, Kathmann et al., 2000) wurde uns

freundlicherweise von Dr. James Lipsky (Clinical Pharmacology Unit, Mayo Clinic and Foundation, Rochester, Minnesota, USA) zur Verfügung gestellt. ALDH2 kommt als tetramere Struktur mit einem Gewicht von ca. 200 kDa in verschiedenen Organen der Ratte vor (McCaffery und Dräger; 1994; Kathmann et al., 2000). Nach Denaturierung der Gewebekomponenten für den Western Blot zerfallen die einzelnen Anteile, und es wird eine Bande bei ca. 54 kDa als positive Markierung detektiert (Kathmann et al., 2000). Der Antikörper ist nicht für die Immunzyto- und Immunohistochemie geeignet. Im Western Blot wurde er 1:1000 verdünnt.

Sonstige Primärantikörper

a) beta-Aktin

Anti-beta-Aktin (Klon: AC-15, aus Maus, monoklonal, Sigma) bindet an das N-terminale Ende der beta-Form von Aktin (North et al., 1993). Beta-Aktin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und kommt ubiquitär in ähnlich hohen Mengen in sämtlichen Zellen vor. Für das Einbringen gleicher Proteinmengen nach der vorangegangenen Proteinbestimmung dient es als Nachweis in Western Blots.

Anti-beta-Aktin wurde in dieser Studie für den Western Blot 1:3000 verdünnt.

b) Large-T-Antigen

Anti-Simian-Virus40-Large-T-Antigen (Anti-SV40-Large T Antigen oder Large-T-Antigen, Klon: Pab101, aus Maus, monoklonal, Becton Dickinson) bindet an ein ca. 85 kDa schweres Phosphoprotein, das vom Simian-Virus (simian engl. = Affe) zur Replikation benötigt wird (Gurney et al., 1986). Da dieses temperatursensitive Protein die DNA-Replikation induziert, kann es dazu verwendet werden, um Progenitorzellen unter Verwendung kontrollierter permissiver Temperaturbedingungen von ca. 33° C zu immortalisieren (Frederiksen et al., 1988a; Redies et al., 1991). Bei nichtpermissiven Temperaturen um 39° C, die der Hirntemperatur von Nagetieren entspricht (Schröder, 1986; Gordon, 1990), wird dieses immortalisierende Onkogen nicht mehr exprimiert (Frederiksen et al., 1988a; Redies et al., 1991), und die SV40-transformierten Zellen stellen ihre Zellteilungen ein. In dieser Studie diente der Nachweis gegen das SV40-Large-T-Antigen als Marker für die Sicherheit der konditionalen Immortalisierung unter *in vitro*-Bedingungen und weiterhin als Indikator für eine Ausdifferenzierung von Progenitorzellen durch Proliferationsstopp.

Der Antikörper wurde für Western Blot Studien 1:500 verdünnt.

c) Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)

Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) ist ein Zytokinderivat und entfernter Verwandter der transforming growth factor β (TGF β)-Superfamilie, der aufgrund seiner neurotrophen Eigenschaften für dopaminerge Neurone des Mittelhirns gereinigt und kloniert wurde (Unsicker et al., 1998; Bohn, 1999). GDNF ist mitunter für die Ausbildung eines ausdifferenzierten dopaminergen Phänotyps notwendig (Unsicker et al., 1998; Bohn, 1999), zudem hat es eine chemotaktische Funktion, d.h. es bewirkt bei der axonalen Wegfindung der nigrostriatalen dopaminergen Neurone das Auswachsen im striatalen Terminationsgebiet (Strömberg et al., 1993; Rosenblad et al., 1998). Die Anzahl GDNF-haltiger Neurone in der Substantia nigra bei Patienten mit Morbus Parkinson ist deutlich verringert und wird als möglicher Grund für die Ausbildung dieser Krankheit angesehen (Chauhan et al., 2001). Wie eingangs erwähnt, hat sich die Gabe von GDNF in verschiedenen Läsionsmodellen des Morbus Parkinson als neuroprotektiv (Beck et al., 1995; Gash et al., 1996; Bilang-Bleuel et al., 1997) und neuroregenerativ (Rosenblad et al., 1998) erwiesen. Erfolgreiche klinische Studien wurden inzwischen auch an Patienten durchgeführt, denen GDNF intraparenchymal injiziert wurde (Gill et al., 2003). Insbesondere die Transplantation von Zellen, welche GDNF in hohen Mengen produzieren, könnte sich als aussichtsreiche Therapie bei Parkinsonpatienten herausstellen (Arenas, 2002; Rossi und Cattaneo, 2002). Als Positivkontrolle im Western Blot diente rekombinantes GDNF der Ratte (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), welches nach der Denaturierung als Monomer vorliegt und eine molekulare Masse von ca. 15 kDa besitzt. In der immunhistochemischen Darstellung sollte sich GDNF als zytosolische Struktur anfärben.

Der von der Firma R&D Systems bezogene Antikörper wurde aus Ziegen gewonnen und wurde für Western Blot-Studien 1:1000 und für die Immunzytochemie 1:100 verdünnt.

d) Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)

Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) erhielt seinen Namen aufgrund seiner neurotrophen Wirkung auf Nervenzellen des Ziliarganglions von Hühnerembryonen (*Gallus gallus*) (Sendtner et al., 1994). Es handelt sich dabei um ein ca. 20-24 kDa schweres Zytokinderivat, dessen neurotrophe Eigenschaften inzwischen auch für eine weitere Reihe von weiteren Neuronenpopulationen gezeigt werden konnte (Sendtner et al., 1994; Thoenen und Sendtner, 2002). CNTF hat sich vornehmlich für striatale Interneurone, die einer exzitotoxischen Läsion unterzogen wurden, als neuroprotektiv erwiesen. Die Anwendung von CNTF in diesem klassischen Tiermodell für den Morbus Huntington (DiFiglia, 1990) wurde von verschiedenen

Arbeitsgruppen aufgezeigt (Anderson et al., 1996; Regulier et al., 2002; Weinelt et al., 2003) und kam inzwischen auch in einer klinischen Studie zum Einsatz (Bachoud-Levi et al., 2000; Bloch et al., 2004). CNTF hat sich zudem *in vivo* als neuroprotektiv für dopaminerge Nervenzellen erwiesen (Hagg und Varon, 1993), und es wurde weiterhin gezeigt, dass auch die Anzahl CNTF-haltiger Zellen in der Substantia nigra bei Patienten mit Morbus Parkinson verringert ist (Chauhan et al., 2001).

Als Positivkontrolle im Western Blot diente rekombinantes CNTF der Ratte (R&D Systems, Wiesbaden), das eine molekulare Masse von ca. 22,8 kDa besitzt. Der polyklonale Antikörper stammte aus Ziegen und wurde für Western Blot-Studien 1:1000 und für die Immunzytochemie 1:100 verdünnt.

2.4.2 Sekundärantikörper

Alle für die Immunzyto- oder Immunhistochemie verwendeten Sekundärantikörper stammten von der Firma Dianova (Hamburg, Deutschland).

Fluoreszenzkonjugierte Sekundärantikörper

a) Die polyklonalen CY2-konjugierten (engl. **C**yanine-dye = Zyanin-Farbstoff, maximale Absorption bei 492 nm und maximale Emission bei 510 nm, Fluoreszeinfilter) Anti-Maus-Antikörper (aus Ziege) wurden 1:400 in der Inkubationslösung verdünnt.

b) Polyklonales Anti-Kaninchen, AMCA-konjugiert (engl. **A**minomethylcumarin**a**cetate = Aminomethylkumarinazetat, maximale Absorption bei 350 nm und maximale Emission bei 450 nm, Ultraviolettfilter), stammte ebenfalls aus der Ziege und wurde 1:100 verdünnt.

Biotinylierte Sekundärantikörper

Für die lichtmikroskopische Darstellung der immunreaktiven Strukturen wurden biotinylierte Sekundärantikörper eines Detektionskits verwendet und entsprechend der Herstellerangaben (Dianova) verdünnt. In allen Fällen wurde die DAB-Lösung mit 100 ml 0,1M TRIS, 5 mg DAB (Sigma) und 10 µl 3% H₂O₂ (Sigma) angesetzt.

a) Anti-Maus-Kit

Anti-Maus (aus Pferd, polyklonal) wurde 1:80 verdünnt, die Lösungen A und B für den ABC-Komplex ebenfalls je 1:80.

b) Anti-Kaninchen-Kit

Anti-Kaninchen (aus Pferd, polyklonal) wurde 1:80 verdünnt, die Lösungen A und B für den ABC-Komplex ebenfalls je 1:80.

c) Anti-Ziege-Kit

Anti-Ziege (aus Pferd, polyklonal) wurde 1:250 verdünnt, die Lösungen A und B für den ABC-Komplex je 1:200.

Sekundärantikörper für den Western Blot

Für die Detektion der auf den Membranen gebunden Primärantikörper wurden im Western Blot Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper der Firma Vector (Burlingame, Ca, USA) verwendet.

a) Anti-Maus

Der polyklonale Antikörper stammte von Pferden und wurde für den Western Blot 1:5000 verdünnt.

b) Anti-Kaninchen

Der aus Ziegen gewonnene polyklonale Antikörper wurde im Western Blot in einer Endkonzentration von 1:10000 verwendet.

c) Anti-Ziege

Der aus Pferden gewonnene polyklonale Antikörper wurde im Western Blot in einer Endkonzentration von 1:10000 verwendet.

2.5 Statistische Auswertung der Apomorphin-induzierten Rotationen

Zur Erfassung eines therapeutischen Effektes durch intrazerebrale Transplantationen wurden kontralaterale Apomorphin-induzierte Rotationen über einen Zeitraum von 40 min bei den verschiedenen Versuchsgruppen bestimmt. Die Rotationen wurden eine Woche nach Läsion, zur Ermittlung des gesetzten Schadens, sowie eine, zwei, drei, vier, fünf, sechs, acht, zehn und zwölf Wochen nach Transplantation erfasst (Originaldaten zu Rotationswerten siehe Kapitel 5.2.2 im Anhang). Die kontralateralen Netto-Rotationen eines jeden Tieres für den entsprechenden Zeitpunkt gingen in diese statistische Auswertung ein. Anschließend wurden dann die Werte der transplantierten (CSM14.1) und scheintransplantierten (DMEM) Tiere gemittelt und diese beiden Gruppen miteinander verglichen.

Bei den erhobenen Daten handelt es sich um quantitative Merkmale mit metrischem Messniveau. Da sich aufgrund der niedrigen Stichprobenumfänge keine Aussagen über die

Verteilung machen lassen, wurde ein nichtparametrischer U-Test verwendet, um die Unterschiedshypothese zwischen CSM14.1-Transplantat und Scheintransplantat zu prüfen. Dieser Test wurde mit dem Programm SPSS für Windows 11.01 durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 *In vitro* Differenzierung der CSM14.1-Zellen

3.1.1 Zellbiologie und morphologische Veränderungen

CSM14.1-Zellen, die unter permissiven Bedingungen von 33° C in 10% FKS-haltigem Medium kultiviert wurden, zeigten eine abgeflachte Gestalt, zudem ähnelten sie nach Erreichen der Konfluenz epithelialen Zellen. Diese Zellen bildeten nur plumpe kurze Ausläufer aus. Oftmals fanden sich bipolare und trigonale Zellen in den Kulturen (**Abb. 6a**). Der klar abgrenzbare Zellkern besaß mehrere Nukleoli, dies ist typisch für Rattenzellen. Vergleiche von Präparaten undifferenzierter Zellen unterschiedlicher Passagen innerhalb von vier Jahren liessen keine morphologischen Veränderungen der Zellen in diesem Zeitraum erkennen.

Temperatursensitiv immortalisierte CSM14.1-Zellen, die unter Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden (39° C, 1% FKS), wiesen hingegen während des Kultivierungszeitraumes von 14 Tagen eine Veränderung ihrer Morphologie auf (**Abb. 6b-f**). Nach drei Tagen bei 39° C besaßen die Zellen feine Ausläufer und einzelne Zellen bildeten nun einen multipolaren Phänotyp aus (**Abb. 6b**). Bei siebentägiger Kultivierung unter den nichtpermissiven Bedingungen fanden sich viele multipolare Zellen mit klar abgrenzbaren feinen Ausläufern in den Zellkulturen. Diese Zellen erinnerten stark an kultivierte Nervenzellen (**Abb. 6c, d**). Nach weiteren Kultivierungszeiten traten die morphologischen Veränderungen noch deutlicher hervor (**Abb. 6e, f**). Es fanden sich fast ausschliesslich multipolare Zellen mit langen Ausläufern in der Zellkultur. Zu diesen Zeitpunkten bildeten sich netzwerkartige Strukturen aus. Ein Großteil der Zellen erzielte gegenüber CSM14.1-Zellen, die bei 33° C kultiviert wurden, eine deutliche Größenzunahme der Perikarya (**Abb. 6a, f**).

Aufgrund der Erfassung der Fortsatzlänge nach der Methode von Sholl (1953) konnten die oben aufgeführten Beobachtungen, vermehrte Ausbildung von Zellausläufern und Fortsätzen, quantifiziert werden (**Diagramm 1**). Es zeigte sich hierbei, daß die durchschnittliche Fortsatzlänge bei undifferenzierten Zellen 88,67 µm (±7,61) betrug. Zellen hingegen, die für 7 d bei 39° C in Medium mit 1% FKS kultiviert wurden, erreichten eine durchschnittliche Fortsatzlänge von 217,08 µm (±34,82) und unterschieden sich signifikant ($p < 0,01$) von undifferenzierten CSM14.1-Zellen. Bei CSM14.1-Zellen, die über einen Zeitraum von 14 d unter Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden, kam es zu einer weiteren Zunahme der Fortsatzlänge auf 344,17 µm (±14,83). Diese Zunahme war ebenfalls gegenüber undifferenzierten (33° C/10% FKS) CSM14.1-Zellen signifikant ($p < 0,01$), und weiterhin auch signifikant gegenüber CSM14.1-Zellen, die für 7 d unter Differenzierungsbedingungen

kultiviert wurden ($p < 0,01$). Es lassen sich also unter Differenzierungsbedingungen bei den CSM14.1-Zellen Veränderungen der Morphologie (**Abb. 6**) und damit einhergehend auch signifikante Zunahmen der Fortsatzlänge (**Diagramm 1**) beobachten.

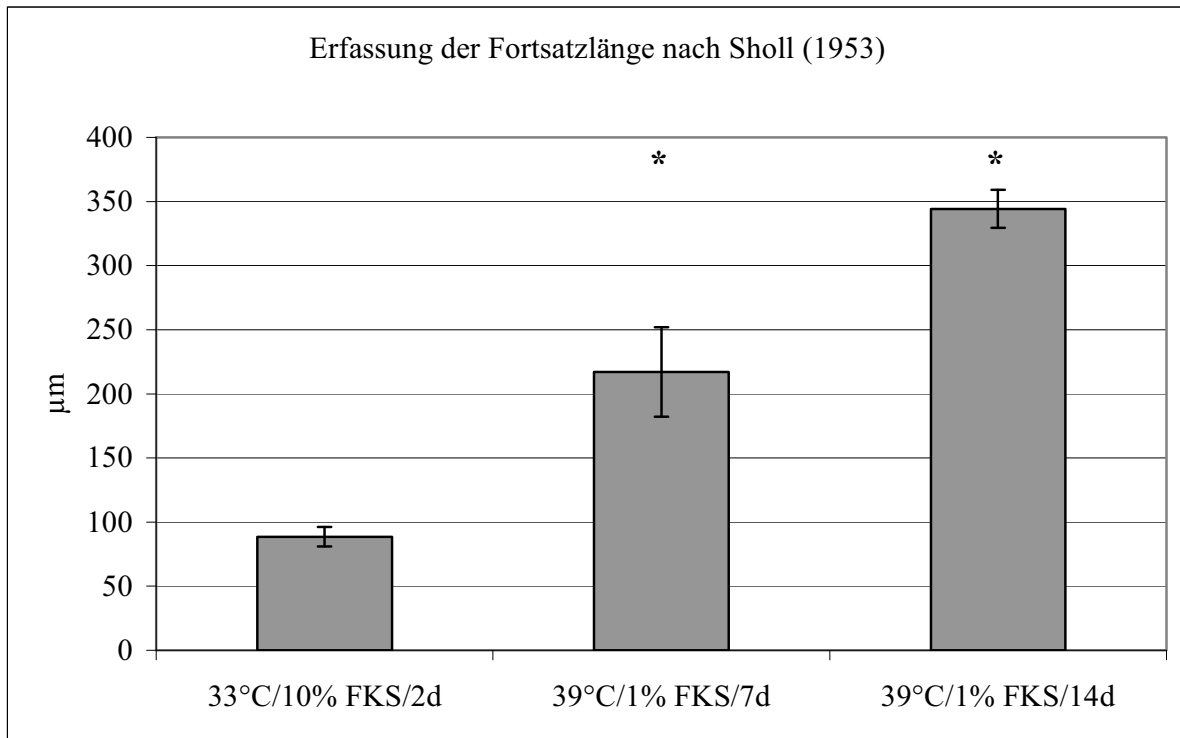


Diagramm 1) Erfassung der Fortsatzlänge bei undifferenzierten und differenzierenden CSM14.1-Zellen:

Es sind die durchschnittlichen Fortsatzlängen (in µm) undifferenzierter CSM14.1-Zellen (33° C, 10% FKS, 2 d) und von CSM14.1-Zellen die für 7 d und 14 d unter Differenzierungsbedingungen (39° C, 1% FKS) kultiviert wurden angegeben. CSM14.1-Zellen die eine Woche unter Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden besitzen signifikant längere Ausläufer als undifferenzierte CSM14.1-Zellen ($p < 0,01$), jedoch signifikant kürzere Fortsätze als CSM14.1-Zellen die für 14 d unter Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden ($p < 0,01$). CSM14.1-Zellen die für 14 d bei 39° C und 1% FKS kultiviert wurden besaßen signifikant längere Ausläufer als undifferenzierte CSM14.1-Zellen ($p < 0,01$) und CSM14.1-Zellen die 7 d unter Differenzierungsbedingungen kultiviert wurden ($p < 0,01$). Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

CSM14.1-Zellen, die bei 33° C kultiviert wurden, führten ca. alle 18 Stunden eine Zellteilung durch. Dies machte alle drei Tage eine Passage und eine Übertragung auf eine neue Petrischale notwendig. Unter diesen Bedingungen befanden sich fast keine toten oder absterbenden Zellen in den Kulturen. In den differenzierenden Zellen hingegen fanden sich absterbende, bzw. tote Zellen, wie anhand von DAPI-Färbungen der pyknotischen Zellkerne oder Trypanblau-Vitalitätstests aufgezeigt werden konnte. Der Verlauf der Gesamtzellzahl während der Differenzierungsexperimente war folgender: Nach einem Anstieg der Zellzahl in den ersten drei Tage unter nichtpermissiven Kulturbedingungen (39° C, 1% FKS) kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme vitaler Zellen in den Zellkulturen (**Diagramm 2**). Der Nachweis des immortalisierenden Large-T-Antigens mittels Western Blot (**Abb.7**) zeigte nur bei Zellen, die unter der permissiven Temperatur (33° C) kultiviert wurden, eine positive

Markierung. Zu weiteren Zeitpunkten (3-14 d) unter der nichtpermissiven Temperatur von 39° C war dieses Protein nach drei Tagen nicht mehr nachweisbar (Abb. 7).

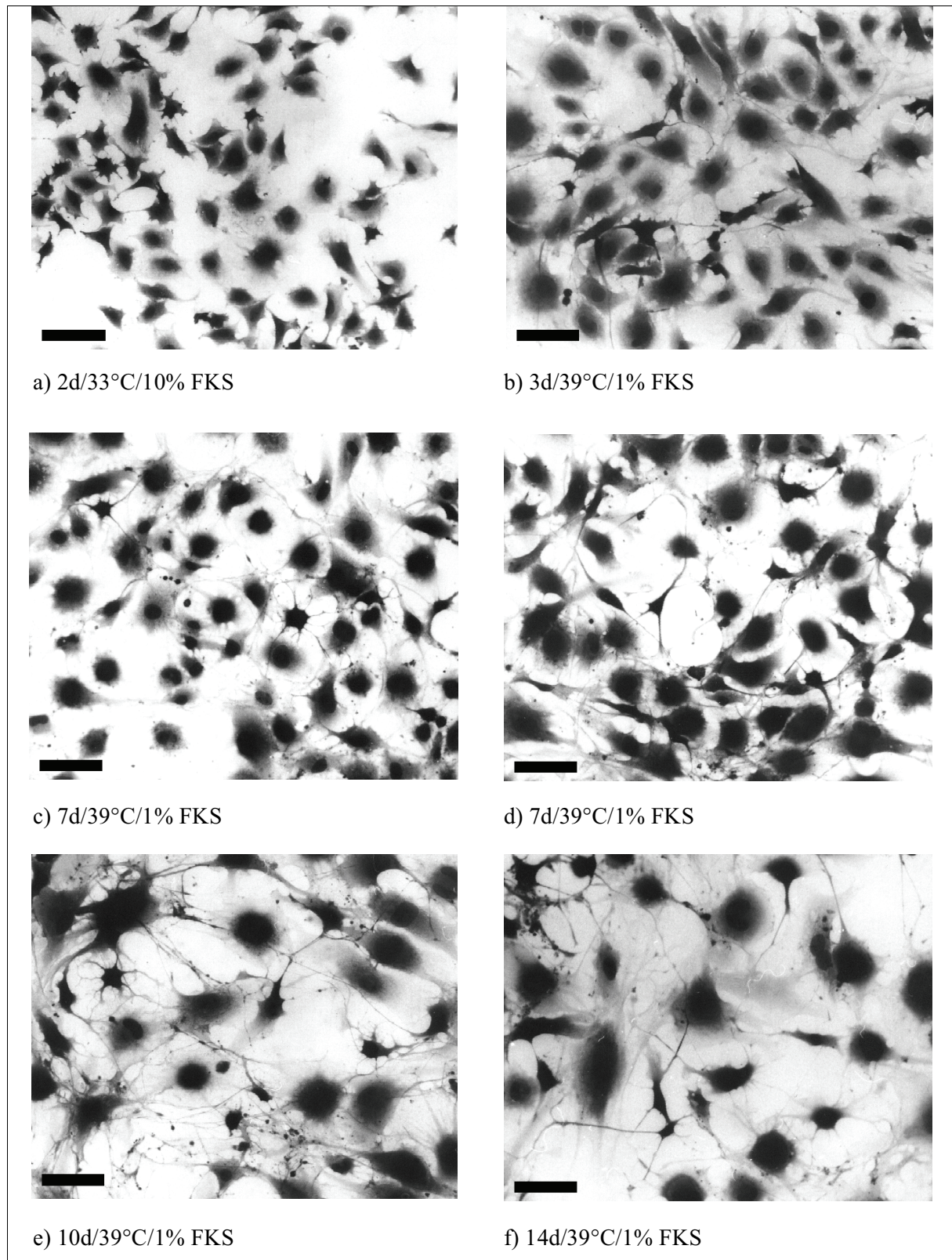


Abb. 6) Morphologische Veränderungen der CSM14.1-Zellen unter Differenzierungsbedingungen: Dargestellt sind Nissl-gefärbte Präparate von CSM14.1-Zellen, die zwei Tage bei 33° C, 10% FKS (Abb. 5a) oder für 3-14 Tage bei 39° C, 1% FKS kultiviert wurden (Abb. 5b-f). Die Größenzunahme der Zellen und ihrer Ausläufer in den differenzierenden Zellen ist erkennbar. Der Maßstab entspricht jeweils 75 µm.

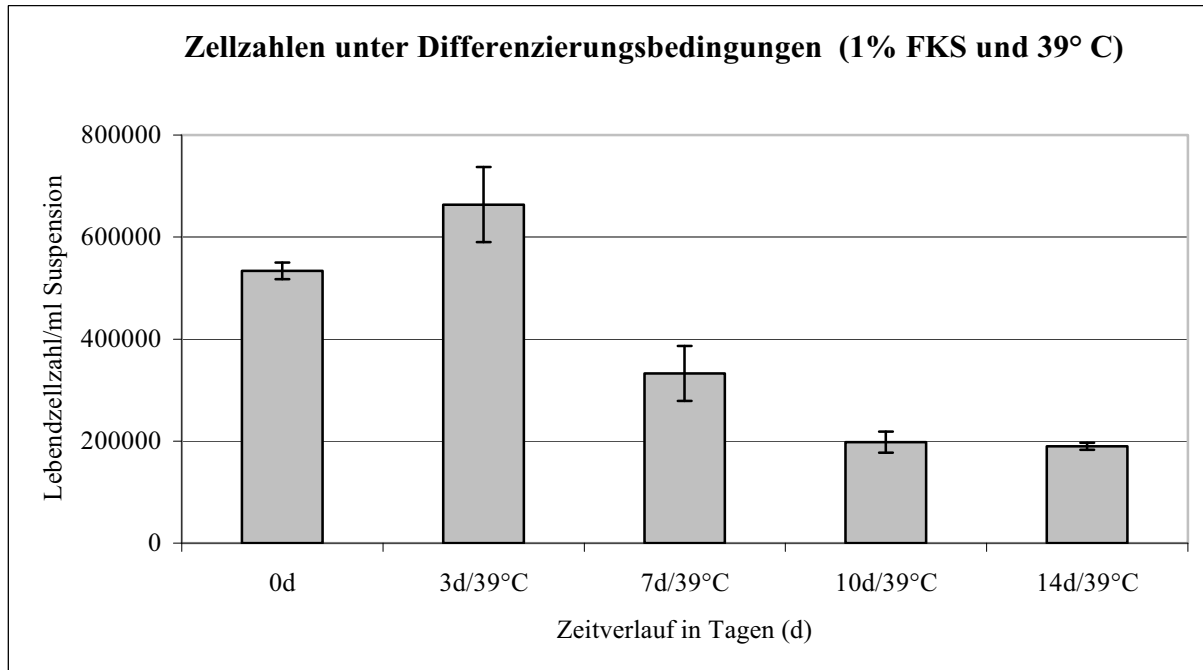


Diagramm 2) Veränderungen der Anzahl vitaler CSM14.1-Zellen unter Differenzierungsbedingungen:

Angegeben sind die Mittelwerte der Anzahl vitaler Zellen ($\pm$ Standardabweichung), die mittels Trypanblau-Färbungen an Zellsuspensionen von Parallelkulturen ($n = 4$) anhand vergleichbarer Volumina ermittelt wurden. Als Ausgangswert (0 d) wurde die Zellanzahl von Parallelkulturen direkt vor der Temperaturerhöhung und Serumreduktion herangezogen. Innerhalb der ersten drei Tage bei 39° C (3 d, 39° C) war eine Zunahme in der Anzahl vitaler Zellen zu beobachten. Nach diesem Zeitpunkt (7-14 d, 39° C) kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme vitaler Zellen in den Kulturen. Originaldaten zur Erstellung des Diagramms sind im Tabellenanhang unter Kapitel 5.2.2 aufgeführt.

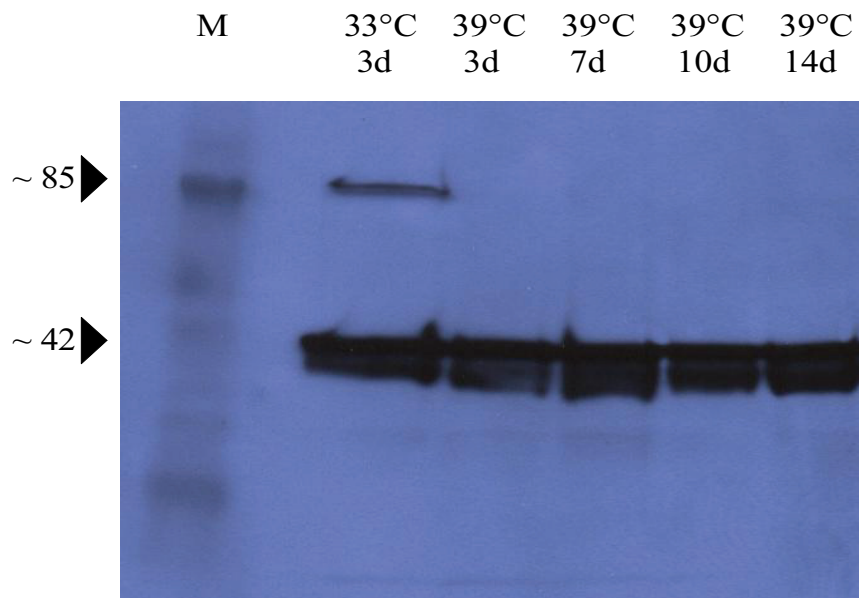


Abb. 7) Western Blot-Nachweis für das Large-T-Antigen mit Proteinlysaten von CSM14.1-Zellen:

Pro Probenflasche wurde jeweils das Proteinlysate von ca. 50000 vitalen Zellen aufgetragen, weiterhin wurde auch ein Gewichtsstandard aufgetragen (M). Es wurden Zellen, die drei Tage bei 33° C, 10% FKS kultiviert wurden, mit Zellen, die für 3-14 Tage bei 39° C, 1% FKS kultiviert wurden, verglichen. Das temperatursensitiv exprimierte immortalisierende Genprodukt (positive Bande bei ca. 85 kDa) konnte nur bei 33° C-Zellen nachgewiesen werden. Als interne Kontrolle wurde das Protein beta-Aktin (ca. 42 kDa) nachgewiesen.

3.1.2 Neuronale Differenzierung

Die *in vitro* Differenzierung der CSM14.1-Zellen wurde weiterhin mittels Immunzytochemie und Western Blot untersucht.

Zunächst wurde der Progenitor- und Stammzellmarker Nestin in undifferenzierten CSM14.1-Zellen nachgewiesen (**Abb. 8a**). Das Intermediärfilament Nestin stellte sich in den Zellen durch eine filamentöse, perinukleäre Markierung dar. Zellen, die bei 33° C, 10% FKS kultiviert wurden, waren intensiv angefärbt, unter diesen Bedingungen kamen auch einige Nestin-negative Zellen in den Kulturen vor (**Abb. 8a**). Wurden die CSM14.1-Zellen jedoch durch die Temperaturerhöhung und Serumreduktion zur Differenzierung angeregt, so nahmen während des untersuchten Versuchszeitraumes die Nestin-positiven Zellen kontinuierlich ab (**Abb. 8a-e**). Zudem waren die noch verbleibenden positiven Zellen weniger intensiv markiert (**Abb. 8b-d**). Zellen, die 7-14 Tage bei 39° C, 1% FKS kultiviert wurden, ließen sich kaum von einer ebenso durchgeführten Negativkontrolle (keine Primärantikörperinkubation) unterscheiden (**Abb. 8c-f**).

Eine immunzytochemische Anfärbung der CSM14.1-Zellen mit dem Gliamarker GFAP in den Zellkulturen war immer negativ. Als Positivkontrollen wurden Hirnschnitte von Ratten gefärbt, aber im Gegensatz zu diesen waren CSM14.1-Zellen nie immunreaktiv für GFAP (nicht dokumentiert). Es stellte sich während der Studien heraus, daß der Antikörper in Western Blots nie eine positive Markierung (auch nicht in Positivkontrollen) hervorrief (nicht dokumentiert) und er daher nicht für Untersuchungen mittels Western-Blot geeignet war.

Im Gegensatz zum verminderten Progenitor- oder Stammzellmarker Nestin kam es zu einer Zunahme neuronaler Markerproteine in differenzierenden CSM14.1-Zellen. Dies konnte für verschiedene Marker mittels Immunzytochemie oder Western Blot gezeigt werden.

Über den Kultivierungszeitraum von zwei Wochen bei 39° C, 1% FKS wurde z. B. das Neurofilament 200 vermehrt in den Zellen gebildet (nicht dokumentiert). Ein weiterer neuronaler Marker, das Mikrotubulinassoziierte Protein 5 (MAP5), wurde bei undifferenzierten Zellen (33° C, 10% FKS) nur schwach gebildet (**Abb. 9a**), wohingegen es in Kulturen mit sich differenzierenden Zellen (39° C, 1% FKS) zunahm (**Abb. 9b-e**). Es fand sich zunächst in dendritenähnlichen Strukturen an den Zellrändern (**Abb. 9b-c**), und erst nach sieben Tagen *in vitro* waren das Zytoplasma von CSM14.1-Zellen und Zellfortsätze, die Axonen ähnelten, intensiv angefärbt (**Abb. 9d-e**).

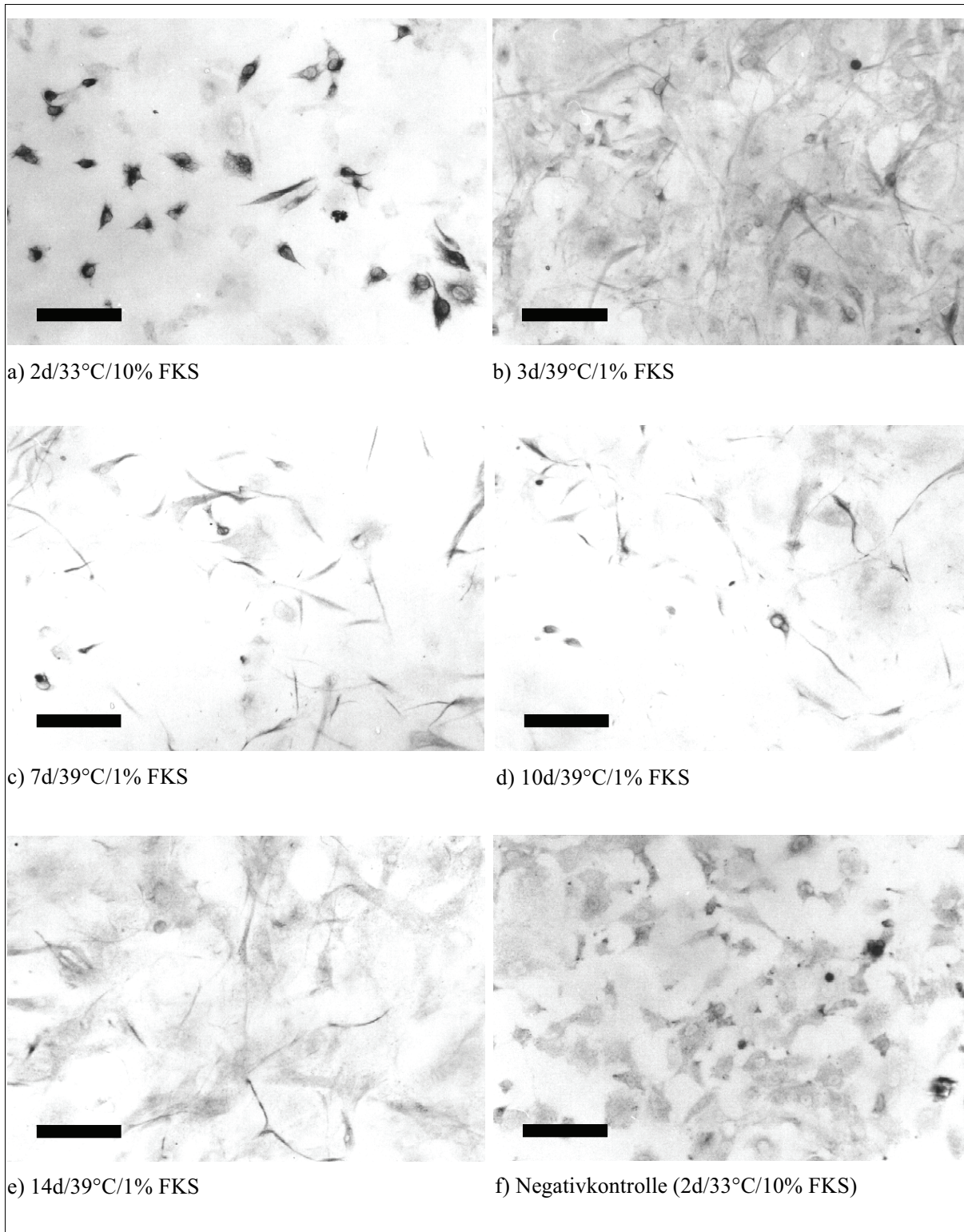


Abb. 8) Nestin-Immunzytochemie an CSM14.1-Zellen:

Auf der Abbildung ist die Intensität der Nestin-Anfärbung von CSM14.1-Zellen, die bei 33° C, 10% FKS (a) und differenzierenden CSM14.1-Zellen, die für 3-14 Tagen bei 39° C, 1% FKS kultiviert wurden (b-e), dargestellt. Eine positive Nestin-Markierung ist durch eine schwarze, filamentöse und perinukleäre Anfärbung erkennbar. Eine deutliche Abnahme des Progenitor- oder Stammzellmarkers Nestin über die Zeit ist erkennbar. Nach ca. 7 Tagen bei 39° C, 1% FKS ist Nestin nahezu abgebaut (c-e) und lässt sich kaum von einer Negativkontrolle unterscheiden (f). Die Präparate wurden alle mit denselben Inkubationslösungen behandelt und zeitgleich gefärbt. Der Maßstab entspricht jeweils 75 µm.

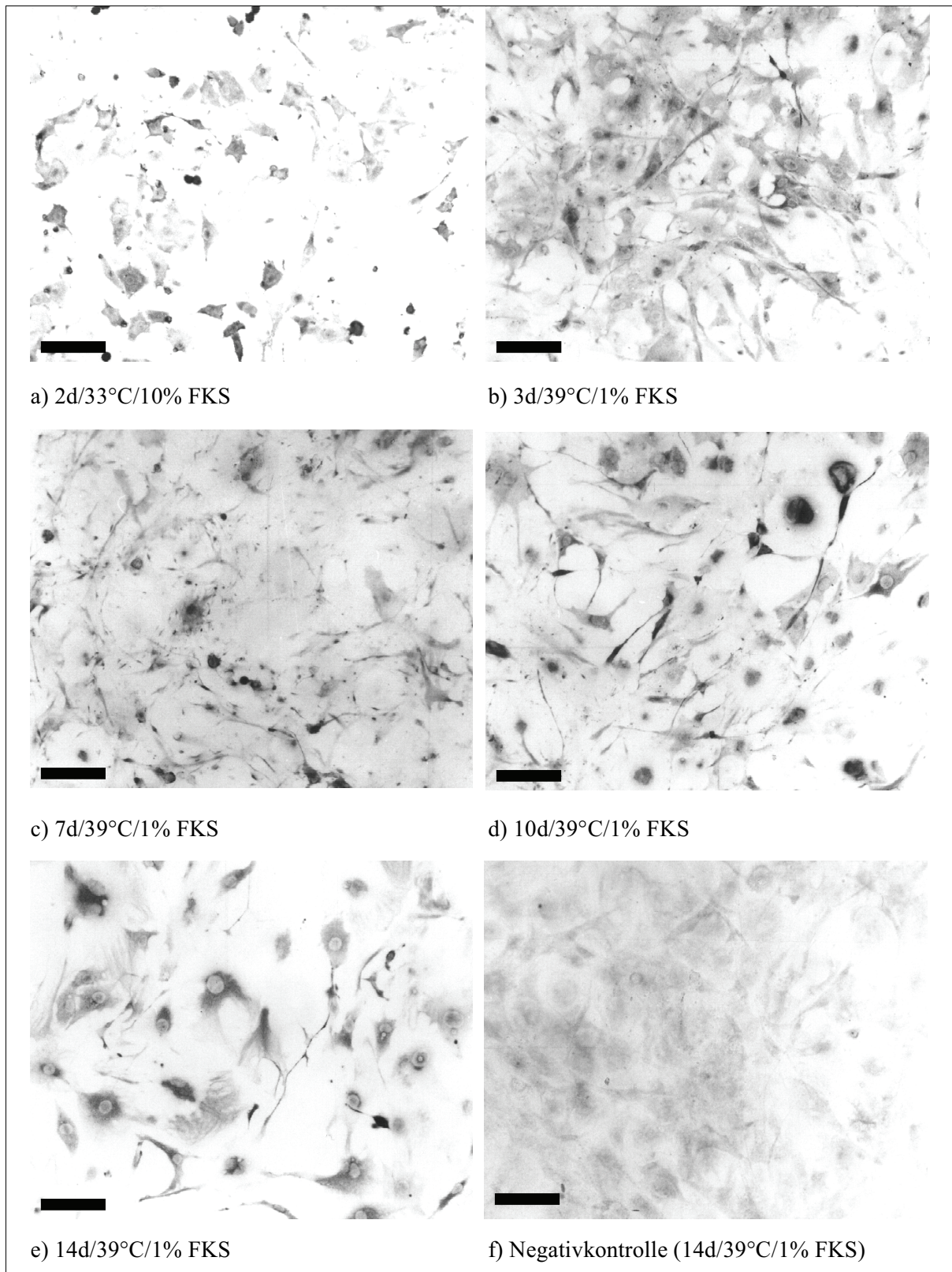


Abb. 9) MAP5-Immunreaktivität von CSM14.1-Zellen unter Differenzierungsbedingungen:

Auf der Abbildung ist die Intensität der MAP5-Anfärbung von CSM14.1-Zellen, die bei 33° C, 10% FKS (a), bzw. für 3-14 Tage bei 39° C, 1% FKS kultiviert wurden (b-e), dargestellt. Undifferenzierte Zellen exprimieren MAP5 schwach (a), jedoch ist eine deutliche Zunahme von MAP5 über die Kultivierungszeit erkennbar (b-e). Nach ca. 10 Tagen bei 39° C, 1% FKS ist MAP5 im Zytoplasma und in axonähnlichen Strukturen nachweisbar (d, e). Die Grössenzunahme der Zellen während der Differenzierung wird ebenfalls deutlich (a-e). Der Maßstab entspricht jeweils 75 µm.

Um semiquantitative Aussagen bezüglich des Gehaltes eines Markerproteins für neuronale oder gliale Differenzierung im Western Blot machen zu können, wurde der Gesamtproteingehalt je Probentasche auf ca. 50 µg eingestellt. Eine anschließende Detektion des Zytoskelettproteins beta-Aktin wies für alle untersuchten Zeitpunkte (3 d, 33° C und 3-14 d, 39° C) eine ähnlich intensive Bande bei ca. 42 kDa auf (**Abb. 10**). Mit dem Nachweis einer gleichmässig starken Expression dieses „internen Standards“ nach dem Eintrag gleicher Gesamtproteinmengen aus den CSM14.1-Zellysaten unterschiedlicher Differenzierungsstadien konnten weitere Untersuchungen bezüglich des Gehalts von Proteinen anhand von Western Blots erfolgen.

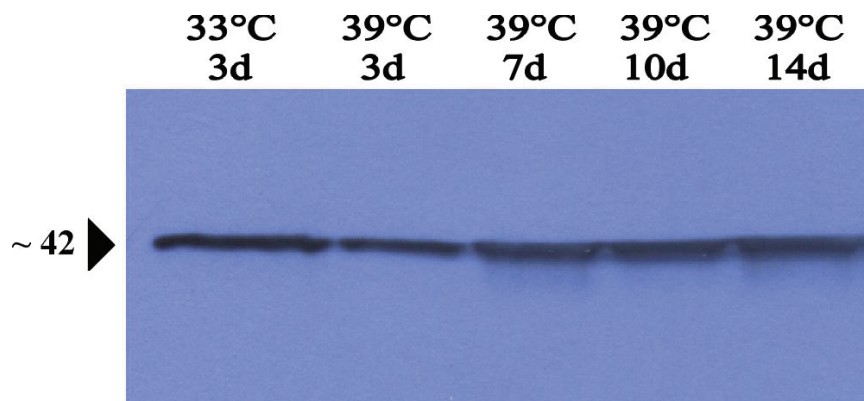


Abb. 10) Western Blot gegen beta-Aktin:

Jeweils 50 µg Gesamtprotein von Lysat aus CSM14.1-Zellkulturen, für 3 d bei 33° C oder 3-14 d bei 39° C kultiviert, wurden pro Probentasche aufgetragen und auf ihren beta-Aktin Gehalt hin untersucht. Alle 50 µg enthaltende Proben besitzen einen ähnlichen Gehalt des „internen Standards“ beta-Aktin (Bande bei ca. 42 kDa).

Das Enzym Neuronen-spezifische Enolase (NSE) konnte in den CSM14.1-Zellen mittels Western Blot und Immunzytochemie untersucht werden. In den CSM14.1-Zellen war, ebenso wie in der MAP5-Immunzytochemie, eine Zunahme von NSE mit Hilfe der Immunzytochemie über den Kultivierungszeitraum von zwei Wochen bei 39° C, 1% FKS erkennbar (nicht dokumentiert). Im Western Blot (**Abb. 11**) wurde gezeigt, daß die undifferenzierten CSM14.1-Zellen einen geringen Gehalt an NSE besitzen, jedoch schon nach drei Tagen bei 39° C, 1% FKS der Gehalt an NSE stark zunimmt und nach insgesamt 7 d bei 39° C die höchste NSE-Konzentration nachweisbar ist. Danach sinkt die Gesamtkonzentration an NSE (10 und 14 d, 39° C in **Abb. 11**). Sie bleibt aber intensiver als bei den undifferenzierten CSM14.1-Zellen (**Abb. 11**).

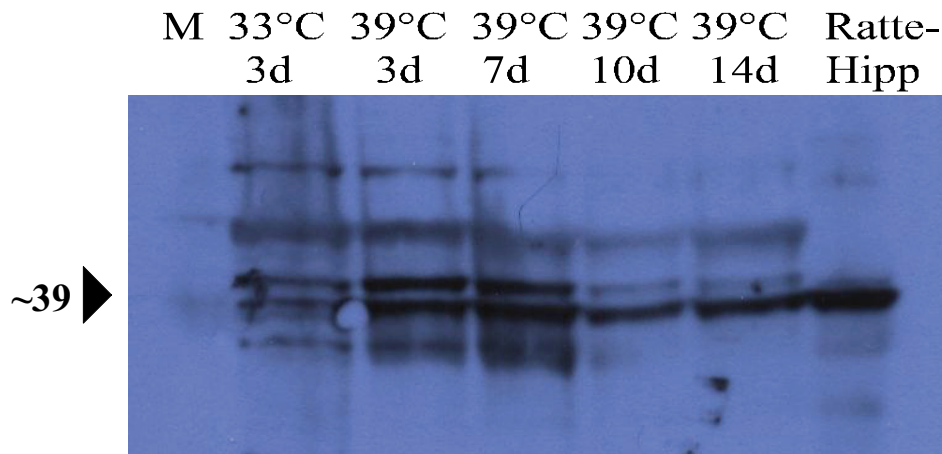


Abb. 11) NSE-Expression in CSM14.1-Zellen:

Es wurden je 50 µg Gesamtprotein von CSM14.1-Zellysaten von 3 d, 33° C und 3-14 d bei 39° C kultivierten Zellen aufgetragen und verglichen. Als Positivkontrolle wurde Gewebekomogenat aus einem adulten Ratten-Hippokampus aufgetragen (Ratte-Hipp). Der Standardmarker ist mit M gekennzeichnet. NSE wird bei ca. 39 kDa detektiert (Ratte-Hipp). Undifferenzierte Zellen exprimieren NSE schwach, ein Anstieg dieses neuronalen Markerproteins nach drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen ist erkennbar. Ein Höhepunkt wird nach sieben Tagen unter Differenzierungsbedingungen erreicht.

Als weiterer neuronaler Marker wurde ein Kernprotein postmitotischer neuronaler Zellen untersucht (Neuronal Nuclei = NeuN). NeuN konnte in kultivierten CSM14.1-Zellen mittels Immunzytochemie nicht sicher nachgewiesen werden (nicht dokumentiert). CSM14.1-Zellysate hingegen waren in Western Blots jedoch positiv für diesen Marker (**Abb. 12**). Zellen, die bei 33° C kultiviert wurden, wiesen eine einzelne positive Bande bei ca. 48 kDa auf, wohingegen bei differenzierenden Zellen (39° C, 1% FKS) schon nach drei Tagen eine weitere spezifische, stark angefärbte Bande bei ca. 46 kDa hinzu kam (**Abb. 12**).

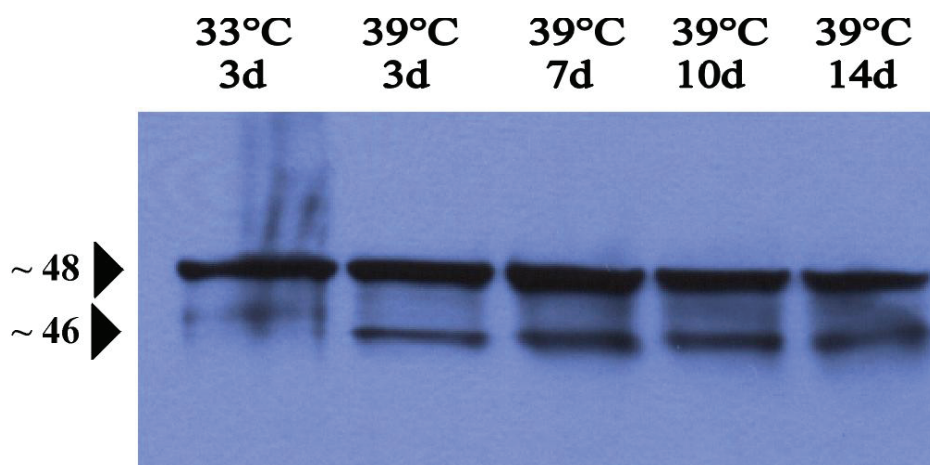


Abb. 12) NeuN-Gehalt von CSM14.1-Zellen im Western Blot-Nachweis:

50 µg Gesamtproteinlysat von undifferenzierten (33° C, 3 d) und differenzierenden (39° C, 3-14 d) CSM14.1-Zellen wurden auf ihren Gehalt des postmitotischen neuronalen Markers NeuN hin untersucht. Undifferenzierte Zellen weisen nur eine Markierung einer Bande bei ca. 48 kDa auf, differenzierende Zellen hingegen (3-14 d, 39° C) sind für eine weitere Bande bei ca. 46 kDa immunreaktiv. Die intensivste Anfärbung für beide Banden findet sich bei Zellen die für 7 d bei 39° C, 1% FKS kultiviert wurden.

3.1.3 Dopaminerge Differenzierung

Der nukleäre Retinsäurerezeptor Nurr1, der von Progenitoren des Mesenzephalons zur Ausbildung eines dopaminergen Phänotyps benötigt wird, konnte mittels Western Blot und Immunzytochemie in undifferenzierten CSM14.1-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 13**). Nach drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen (39° C, 1% FKS) kam es zu einem Anstieg von Nurr1. Im weiteren Verlauf (7-14 d) wurde die Konzentration von Nurr1 in differenzierenden CSM14.1-Zellen kontinuierlich geringer (**Abb. 13a**). Der Nurr1-Gehalt in differenzierenden Zellen (39° C, 1% FKS) lag ab dem zehnten Tag unter dem von undifferenzierten Zellen. Die Spezifität des Antikörpers für Nurr1 im Western Blot konnte durch eine, von der Firma Becton Dickinson mitgelieferten Positivkontrolle für den Western Blot (SW13-Zelllysate, humane Karzinomzelllinie aus der Nebennierenrinde) und das Auftragen von Gewebshomogenat aus dem Mittelhirn einer adulten Ratte nachgewiesen werden (**Abb. 13a**). In der Immunzytochemie konnte Nurr1 ebenfalls in den CSM14.1-Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 13a, b**). Mittels dieser Markierung trat deutlich die nukleäre Lokalisation dieses Rezeptors hervor. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Nurr1 homogen in allen Zellen auffindbar war (**Abb. 13a-b**). Eine Zu-, bzw. Abnahme der Immunreaktivität unter Differenzierungsbedingungen konnte mittels Immunzytochemie jedoch nicht beobachtet werden und daher wurden nur undifferenzierte Zellen dokumentiert (**Abb. 13a-b**).

Veränderungen im Gehalt des Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese, der Tyrosinhydroxylase (TH), konnten in den CSM14.1-Zellen mittels Immunzytochemie nicht nachgewiesen werden (nicht dokumentiert). In Western Blots für TH hingegen (**Abb. 14**) fanden sich deutliche Unterschiede. Undifferenzierte Zellen waren nur schwach positiv für eine TH-Bande bei ca. 68 kDa (**Abb. 14**). Allerdings kam es schon nach 3 Tagen unter Differenzierungsbedingungen zu einem deutlichen Anstieg des Enzyms TH (**Abb. 14**). Die vormals aufgefundene Bande bei ca. 68 kDa war nun über den gesamten Differenzierungszeitraum (3-14 d) intensiver, zudem kamen weitere für TH spezifische Banden von ca. 60-68 kDa hinzu (**Abb. 14**).

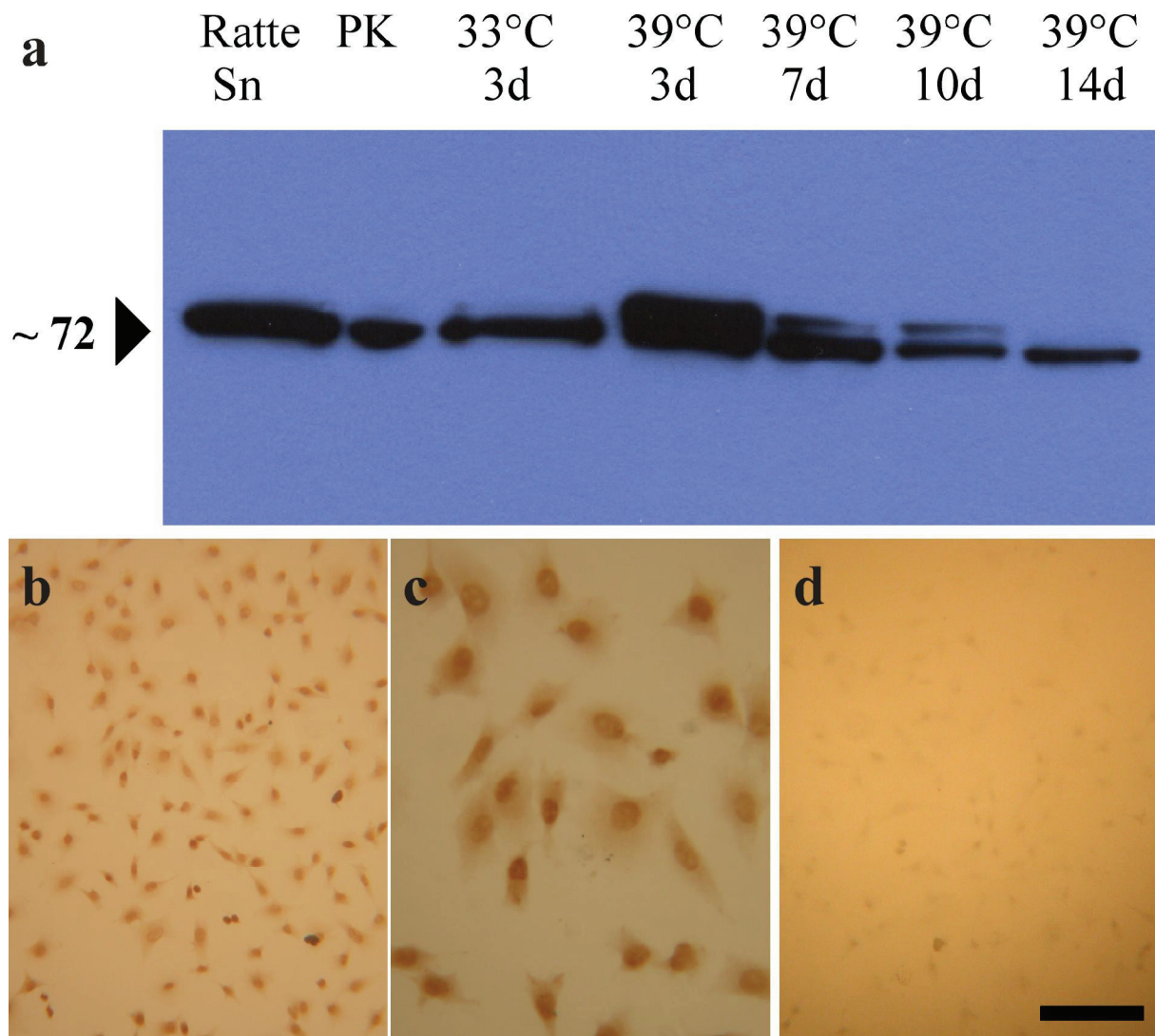


Abb. 13) Nurr1-Gehalt in CSM14.1-Zellen:

a) Nurr1-Nachweis im Western Blot: Aufgetragen wurden jeweils ca. 50 µg Gesamtproteinlysate von undifferenzierten CSM14.1-Zellen (33° C, 10% FKS) sowie von Zellen, die 3-14 d unter Differenzierungsbedingungen (39° C, 1% FKS) kultiviert wurden. Als Positivkontrollen wurden Proteinlysate aus dem die Substantia nigra (Sn) enthaltenden adulten Mesenzephalon der Ratte (Ratte Sn) und einer humanen Karzinomzelllinie (PK=SW13-Zelllysate) aufgetragen. CSM14.1-Zellen besitzen im undifferenzierten Zustand Nurr1 (Bande bei 72 kDa). Es kommt nach drei Tagen bei 39° C, 1% FKS zu einem Konzentrationsanstieg, der dann bei weiterer Kultivierung (7-14 d) kontinuierlich bis unter den Ausgangswert abnimmt.

b-d) Immunzytochemischer Nurr1-Nachweis: Es sind undifferenzierte CSM14.1-Zellen abgebildet. Eine homogene Verteilung des nukleären Retinsäurerezeptors Nurr1 in allen CSM14.1-Zellen ist aus der Teilabbildung b) ersichtlich. Alle Zellen exprimieren den Rezeptor. Die Kernlokalisation von Nurr1 tritt bei höherer Vergrößerung deutlich hervor (c). d) Aufnahme von einer Negativkontrolle, bei der die Primärantikörperlösung durch eine antikörperfreie Inkubationslösung ersetzt wurde.

Meßbalken: 140 µm (b + d), 50 µm (c).

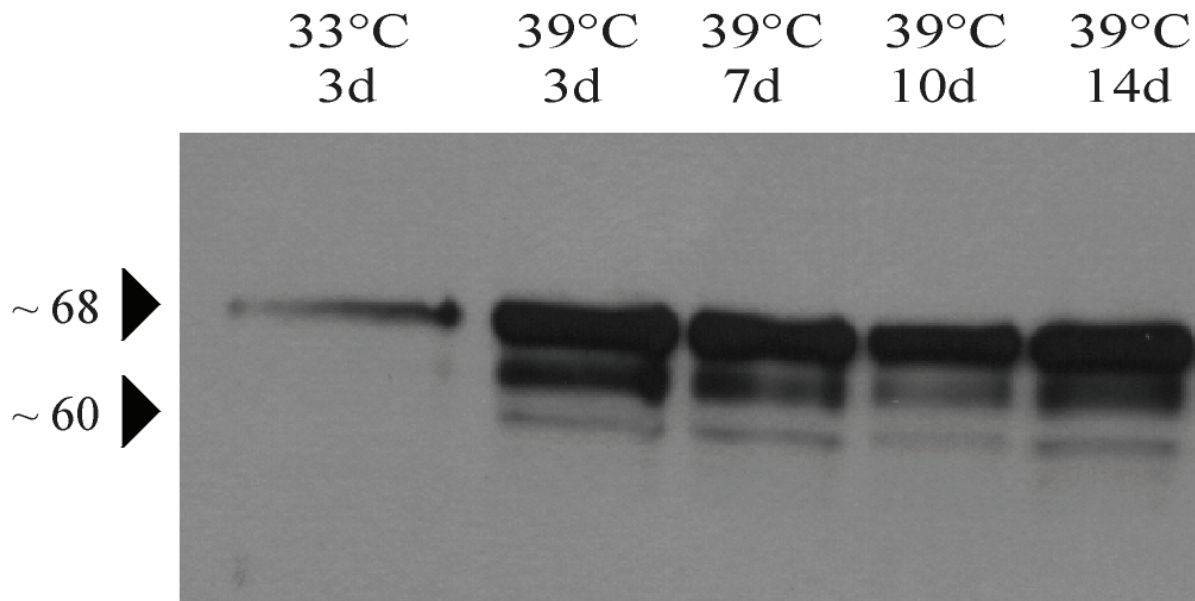


Abb. 14) TH-Gehalt von CSM14.1-Zellen im Western Blot:

Pro Probenflasche wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Lysate undifferenzierter CSM14.1-Zellen (33° C, 3 d) sind für TH nur schwach (Bande bei ca. 68 kDa) immunreaktiv. Differenzierende Zellen hingegen besitzen schon nach drei Tagen bei 39° C und für den weiteren Versuchszeitraum (3-14 d) einen hohen TH-Gehalt mit spezifischen Banden von 60-68 kDa.

Das unspezifische, Retinaldehyde konvertierende Enzym ALDH2 wurde in zuvor durchgeführten Western Blot-Experimenten bezüglich seiner Validität als Marker für ausdifferenzierte dopaminerge Zellen getestet (**Abb. 15a**). Es konnte gezeigt werden, daß in Proteinlysaten aus Hippocampusgewebe von Ratten nur sehr geringe Mengen an ALDH2 enthalten sind, da der Hippocampus keine dopaminergen Neurone besitzt. Gewebshomogenat aus dem Mesenzephalon adulter Ratten, das die dopaminerge Substantia nigra pars compacta enthält, war hingegen stark positiv für ALDH2 (**Abb. 15a**). Als Positivkontrolle können, nach Angaben von Kathmann et al. (2000), auch Proteinlysate aus der Leber adulter Ratten verwendet werden (**Abb. 15a-b**).

Die Proteinlysate aus undifferenzierten (3 d, 33° C) und differenzierenden (3-14 d, 39° C) CSM14.1-Zellen wurden nach diesen Vorversuchen ebenfalls auf ihren ALDH2-Gehalt hin untersucht (**Abb. 15b**). Als Positivkontrolle diente hierbei nun Proteinlysate aus der adulten Rattenleber (**Abb. 15b**). Undifferenzierte Zellen (3 d, 33° C) enthielten nachweislich kein ALDH2; nach drei Tagen unter Differenzierungsbedingungen (39° C) kam es zu einer schwachen positiven Bande bei 54 kDa. Diese wurde während der weiteren Kultivierungszeit immer intensiver. Zusammenfassend lässt sich sagen, daß der ALDH2-Gehalt in Proteinlysaten aus 50 µg Gesamtprotein von undifferenzierten CSM14.1-Zellen sich unterhalb der Nachweisgrenze befand, wohingegen er in differenzierenden Zellen zunahm (**Abb. 15b**).

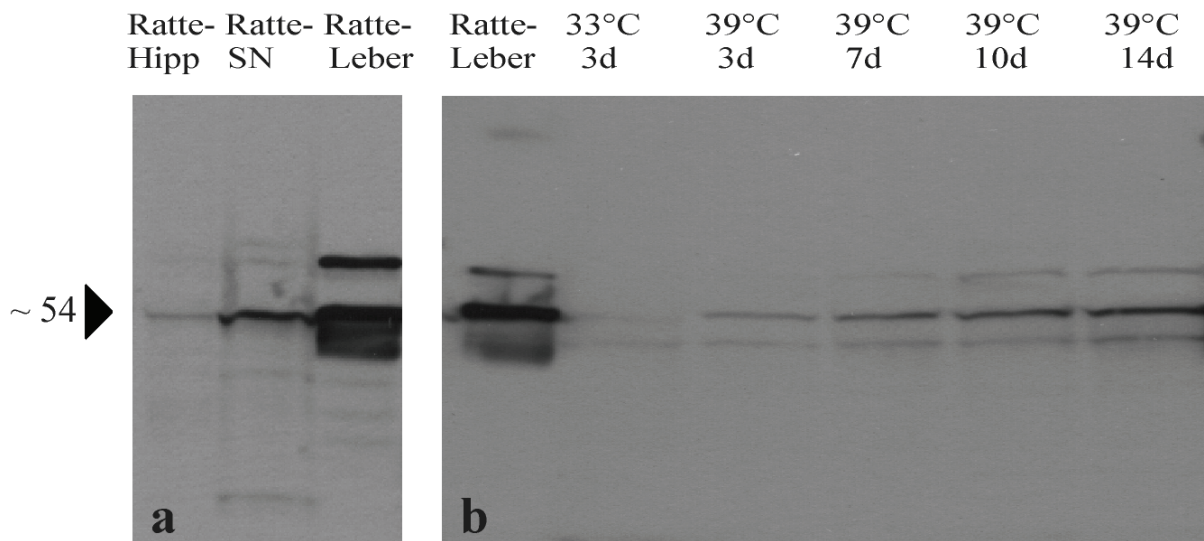


Abb. 15) ALDH2-Nachweis in CSM14.1-Zellen und Kontrollgeweben aus Proteinlysaten im Western Blot:

a) Untersuchung des ALDH2-Gehalts in Kontrollgeweben der Ratte. Proteinlysat aus dem Hippocampus der Ratte (Ratte-Hipp), der keine dopaminergen Perikarya enthält, ist nur schwach positiv für ALDH2. Proteinlysat aus dem die dopaminerge Substantia nigra pars compacta enthaltenden, Mesenzephalon der Ratte (Ratte-SN) und Proteinlysat aus der Leber (Ratte-Leber) sind stark positiv für ALDH2 (Banden jeweils bei ca. 54 kDa).

b) Proteinlysat der Leber als Positivkontrolle (Ratte-Leber), sowie vergleichbare Mengen an Gesamtprotein aus undifferenzierten (33° C, 3 d) und differenzierenden (39° C, 3-14 d) CSM14.1-Zellen wurden in einem Gel aufgetragen. Lebergewebe weist wiederum eine starke Immunreaktivität für ALDH2 auf (Bande bei 54 kDa), wohingegen es in undifferenzierten Zellen (33° C, 3 d) nicht nachweisbar ist. In differenzierenden CSM14.1-Zellen jedoch nimmt der ALDH2-Gehalt kontinuierlich zu (Banden bei ca. 54 kDa).

3.1.4 Expression neurotropher Faktoren

Zur Vervollständigung der zellbiologischen Charakterisierung der CSM14.1-Zellen sollte die Expression von ausgewählten neurotrophen Faktoren untersucht werden, da eine solche z. B. auch für andere temperatursensitiv immortalisierte Stammzelllinien bekannt ist (Cattaneo und Conti, 1998; Lu et al., 2003). Da in den folgenden Transplantationsstudien nur undifferenzierte (bei 33° C kultivierte) CSM14.1-Zellen zum Einsatz kamen, wurde der Gehalt von CNTF und GDNF nur an eben solchen Zellen untersucht.

Der CNTF-Nachweis erfolgte mittels Western Blot und Immunzytochemie (**Abb. 16**). In Proteinlysaten von CSM14.1-Zellen ließ sich im Western Blot kein CNTF nachweisen. Allerdings detektierte der Antikörper in Western Blots zusätzlich als Positivkontrolle aufgetragenes rekombinantes CNTF der Ratte schon bei geringer Konzentration, so dass die Spezifität des Antikörpers aufgezeigt wurde (**Abb. 16a**). In der Immunzytochemie konnte CNTF ebenfalls nicht nachgewiesen werden und unterschied sich nicht von den ebenfalls durchgeführten Negativkontrollen (**Abb. 16b-d**).

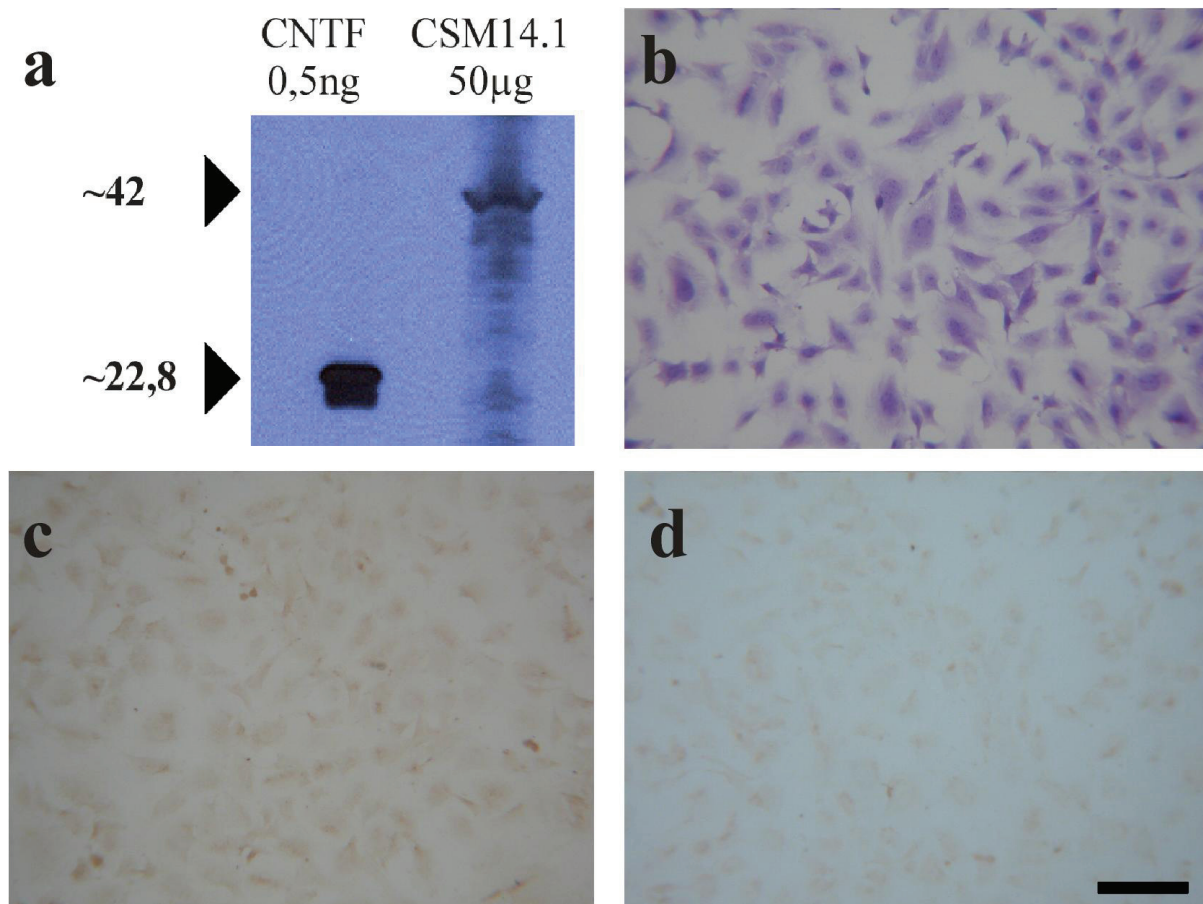


Abb. 16) CNTF-Nachweis in undifferenzierten CSM14.1-Zellen mittels Western Blot und Immunzytochemie:

a) Western Blot, bei dem 0,5 ng rekombinantes CNTF der Ratte und 50 µg Gesamtprotein enthaltendes Lysat von undifferenzierten CSM14.1-Zellen aufgetragen wurde. CSM14.1-Zellen enthalten kein CNTF, wohingegen bei der Kontrolle eine für CNTF spezifische Bande bei ca. 22,8 kDa deutlich erkennbar ist. Bei ca. 42 kDa ist die beta-Aktin Bande bei den CSM14.1-Zellen zu erkennen. Diese dient als Nachweis des Proteineintrags.

b-d) Immunzytochemischer CNTF-Nachweis in CSM14.1-Zellen. In Teilabbildung b) ist eine Parallelkultur zu den Abb. c) + d) in einer Nissl-Färbung dargestellt. Eine Markierung der CSM14.1-Zellen für CNTF ist nicht erkennbar (c) und unterscheidet sich nicht von einer Negativkontrolle (d). Maßstab = 100 µm (b-d).

GDNF, der Faktor mit dem derzeit bekannten besten neurotrophen Effekt auf dopaminerge Neurone, konnte in Proteinlysaten von CSM14.1-Zellen mittels Western Blots und zudem auch immunzytochemisch in diesen Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 17**). In Western Blots, bei denen CSM14.1-Zelllysate untersucht wurden, zeigte sich eine für GDNF spezifische Bande bei ca. 15 kDa; sie fand sich auch bei der jeweils durchgeführten Positivkontrolle, rekombinantem GDNF der Ratte (**Abb. 17a**). Der immunzytochemische Nachweis zeigte eine schwache zytoplasmatische Anfärbung, die auch die Ausläufer der Zellen markierte (**Abb. 17c**). Diese unterschied sich aber deutlich von der gänzlich unmarkierten Negativkontrolle (**Abb. 17d**), bei der die Primärantikörper durch eine antikörperfreie Inkubationslösung ersetzt wurden.

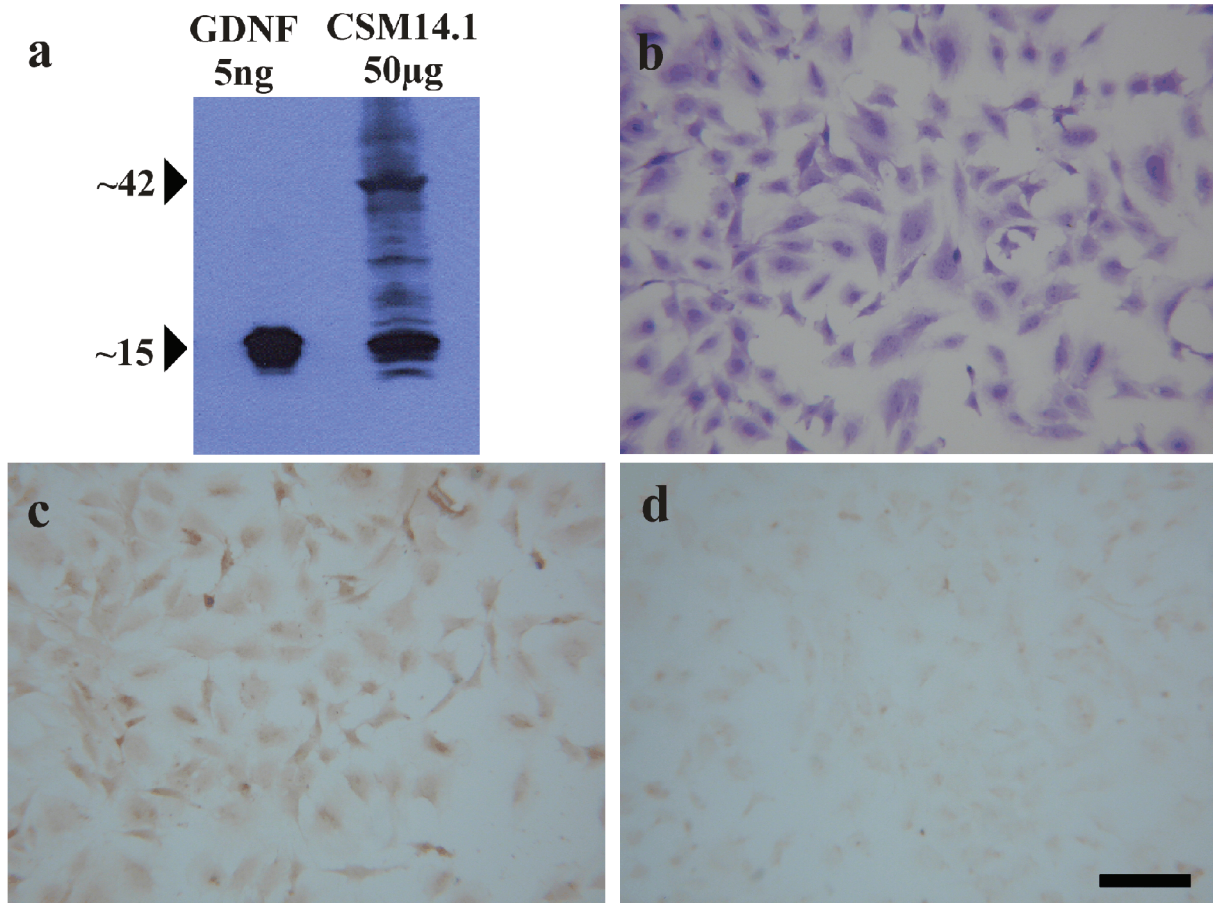


Abb. 17) GDNF-Nachweis in undifferenzierten CSM14.1-Zellen mittels Western Blot und Immunzytochemie:

a) 50 µg Gesamtprotein enthaltendes Zelllysat von CSM14.1-Zellen wurde im Western Blot auf seinen GDNF-Gehalt hin untersucht. Es findet sich eine für GDNF spezifische Bande bei ca. 15 kDa. Bei der Positivkontrolle, 5 ng rekombinantes GDNF der Ratte, zeigt sich diese Bande auf der gleichen Höhe. Bei den CSM14.1-Zellen findet sich bei ca. 42 kDa die Bande für den internen Standard beta-Aktin, der hier ebenfalls detektiert wurde.

b-d) Immunzytochemischer GDNF-Nachweis in undifferenzierten CSM14.1-Zellen. In Teilabbildung b) ist eine Parallelkultur zu den Abb. c) + d) in einer Nissl-Färbung dargestellt. Eine zytoplasmatische Markierung der CSM14.1-Zellen für GDNF ist, wenn auch nur schwach, erkennbar (c) und unterscheidet sich deutlich von der Negativkontrolle (d). Maßstab = 100 µm (b-d).

3.2 Läsions- und Transplantationsexperimente

3.2.1 Läsionsausmaß und Rotationsergebnisse

Aus der umfassenden Literatur zum unilateralen 6-OHDA-Läsionsmodell der Ratte ist bekannt, daß erfolgreich läsionierte Tiere nach Apomorphingabe (0,25 mg/kg Körpergewicht) über einen Zeitraum von 40 min mehr als vier kontralaterale Rotationen pro Minute ausführen und daß bei diesen Tieren ca. 97% der dopaminergen nigrostriatalen Neurone degeneriert sind (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970; Schwarting und Huston, 1996a, b; Beal, 2001). Da die immortalisierten Progenitorzellen der Zelllinie CSM14.1 in das akut dopaminerg deafferentierte Gehirn transplantiert werden sollten, gingen bei dieser Studie nur Versuchstiere ein, die bei der ersten Rotationsmessung eine Woche nach unilateraler 6-OHDA-Läsion mehr als 4 kontralaterale Rotationen pro Minute ausführten (siehe Tabelle 1, Seite 20).

Die Überprüfung dieser Aussagen aus der Literatur mittels immunhistochemisch behandelter Gehirnschnitte für den Nachweis gegen das Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese (TH) eines erfolgreich läsionierten Versuchstieres konnten bestätigt werden (**Abb. 18a-b**). Wie anhand einer TH-Färbung für dopaminerge Neurone nachgewiesen wurde, war die rechte Substantia nigra pars compacta (6-OHDA-Injektion) eine Woche nach erfolgreicher Läsion einseitig degeneriert. Bis auf vereinzelte Zellen waren keine TH-positiven Neurone nachweisbar. In Nissl-Färbungen und weiteren Neuronenfärbungen (NeuN-Immunhistochemie) waren zudem keine der sonst für die Substantia nigra pars compacta üblichen und durch grosse Perikarya gekennzeichneten dopaminergen Nervenzellen auffindbar. Die kontralaterale linke Seite hingegen war stark TH-immunreaktiv und somit intakt. Hier waren grosse TH-positive Zellen, wie sie für die Substantia nigra pars compacta üblich sind, detektierbar (**Abb. 18a**). NeuN- und Nissl-Färbungen von dieser nicht läsionierten Hemisphäre liessen sich nicht von denen gänzlich unbehandelter Kontrolltiere unterscheiden (nicht dokumentiert).

Erfolgreich unilateral dopaminerg deafferentierte Ratten wiesen im rechten Caudatus putamen (Striatum), dem Terminalgebiet der rechten Substantia nigra pars compacta, ebenfalls keine positive TH-Markierung auf, wohingegen die intakte kontralaterale linke Kontrollseite einen hohen TH-Gehalt aufwies (**Abb. 18b**).

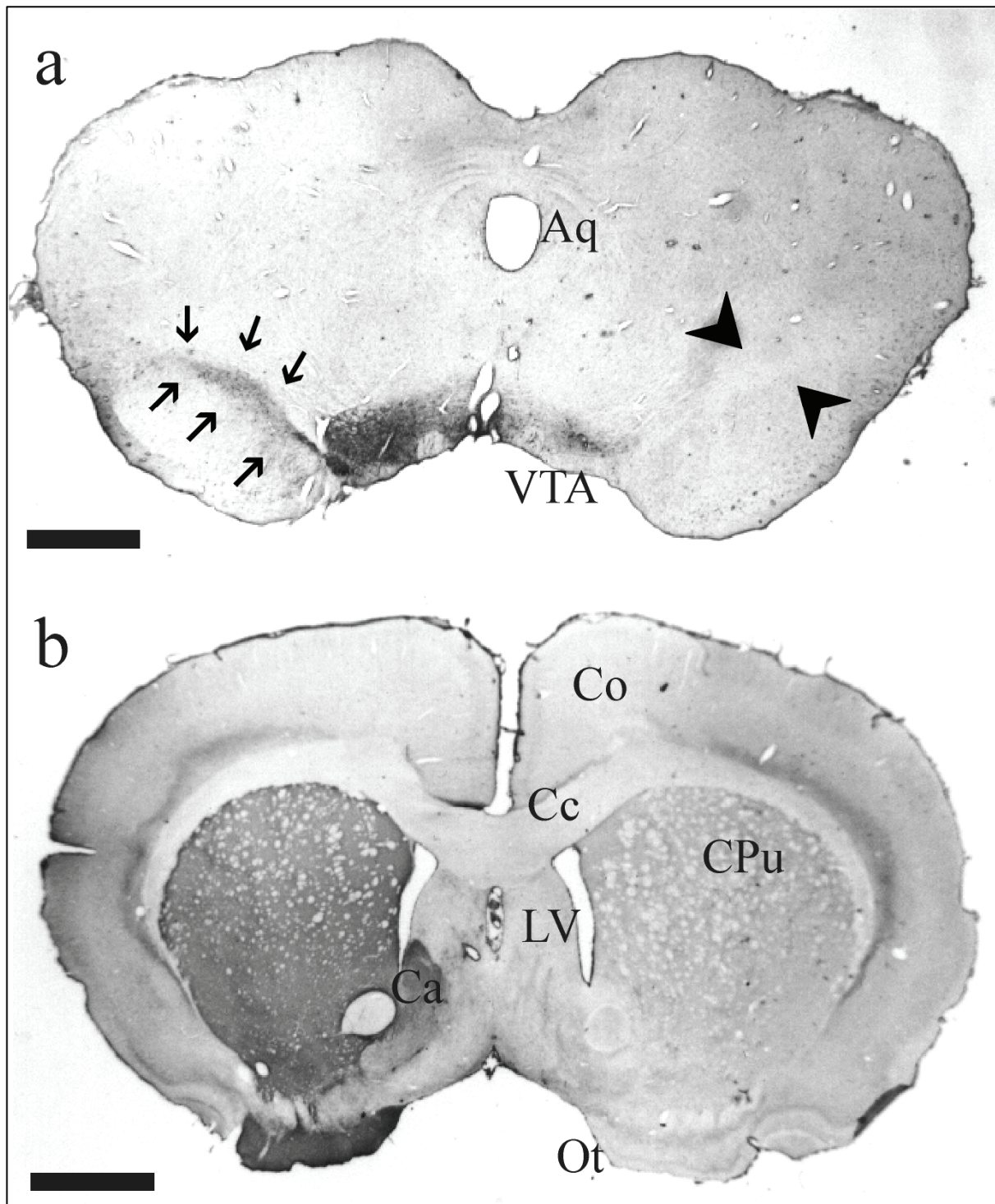


Abb. 18) TH-Nachweis in Frontalschnitten einer unilateral dopaminerg deafferentierten Ratte:

a) Frontalschnitt durch das Mesenzephalon auf Höhe der Substantia nigra pars compacta. In der linken Hemisphäre sind die TH-positiven Neurone der Substantia nigra pars compacta deutlich dunkel angefärbt (Pfeile). Auf der rechten, läsierten Seite hingegen fehlen diese TH-enthaltenden Neurone (Pfeilspitzen). Maßstab = ca. 1 mm.

b) Ein Frontalschnitt desselben Tiers durch das Vorderhirn auf Höhe des Caudatus putamen (CPu). Auf der linken Hemisphäre enthält das CPu deutliche Mengen an TH (dunkle Anfärbung). Dem kontralateralen, dopaminerg deafferentierten CPu hingegen fehlt diese positive Markierung völlig. Auch das Tuberculum olfactorium (Ot) dieser Seite ist dopaminerg deafferentiert. Maßstab = ca. 2 mm.

Legende: Aq: Aqueductus mesencephali, Ca: Commissura anterior, Cc: Corpus callosum, Co: Cortex, CPu: Caudatus putamen, LV: Ventriculus lateralis, Ot: Tuberculum olfactorium, VTA: Area tegmentalis ventralis.

Wie oben aufgeführt können Apomorphin-induzierte Rotationen zur Ermittlung einer einseitig gesetzten dopaminergen Deafferentierung, sowie auch zur Bestimmung eines therapeutischen Effekts nach einer Behandlung, z. B. Transplantation, herangezogen werden (Ungerstedt und Arbuthnott, 1970; Schwarting und Huston, 1996a, b; Beal, 2001). In **Diagramm 3** sind die Ergebnisse der Apomorphin-induzierten Rotationen der CSM14.1-transplantierten Tiere (CSM, gelbe Balken) und der scheintransplantierten Tiere (ST, blaue Balken) vor und nach der Transplantation aufgeführt. Die Beschreibung der Rotationen erfolgt anhand der Differenz zwischen dem Zeitpunkt, der eine Woche nach Läsion (R0) ermittelt wurde, und den Zeitpunkten, die eine bis 12 Wochen nach Transplantation (R1-R12) erfasst wurden. Ausgehend von dieser Zu- oder Abnahme der Rotationen ergaben sich die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse. In den Klammern ist jeweils der Standardfehler angegeben, und die Signifikanzen wurden mittels U-Test ermittelt (siehe Kap. 2.5, Seite 34).

Eine Woche nach Läsion wurde das Ausmaß der dopaminergen Deafferentierung bestimmt. Die Gruppe, die anschließend ein Zelltransplantat erhielt, führte im Mittel 10,7 ($\pm 1,15$) Rotationen pro Minute durch. Die Gruppe der Tiere, die später Scheintransplantate erhielt, rotierte im Mittel 7,9 ($\pm 0,8$) mal. Die beiden Werte unterschieden sich nicht signifikant.

Eine Woche nach Transplantation (R1), bzw. drei Wochen nach der Läsion kam es bei CSM-Tieren, zu einer Zunahme von 1,8 ($\pm 0,9$) Rotationen, wohingegen die ST-Tiere sich um 4,1 ($\pm 1,4$) Rotationen pro min steigerten. Bei R2 verringerte sich die Differenz bei CSM-Tieren um 1,4 ($\pm 0,7$), bei ST-Tieren betrug sie 4,2 ($\pm 1,3$). Die CSM-Tiere zeigten bei R3 eine weitere Reduktion der Rotationen und die Differenz betrug noch 0,5 ($\pm 0,7$), wohingegen diese Differenz bei der ST-Gruppe 4,0 ($\pm 1,5$) Rotationen/min betrug. Zu diesem Zeitpunkt unterschieden sich beide Gruppen signifikant ($p = 0,044$). Vier Wochen nach Transplantation (R4) zeigten die CSM-Tiere mit -0,7 ($\pm 0,9$) Rotationen/min eine Besserung gegenüber dem Ausgangszustand, wohingegen die ST-Gruppe 3,3 ($\pm 1,7$) Rotationen/min durchführte. Zu diesem Zeitpunkt fand sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p = 0,023$). Zum Zeitpunkt R5 jedoch betrug die Differenz bei den CSM-Tieren 1,2 ($\pm 1,4$), bei den ST-Tieren 3,4 ($\pm 2,1$). Sechs Wochen nach Behandlung (R6), kam es bei der CSM-Gruppe zu einer Differenz von 0,7 ($\pm 1,3$) Rotationen/min. Die ST-Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt eine Differenz von 3,3 ($\pm 2,1$). Die nachfolgenden Rotationen wurden nur noch alle zwei Wochen ermittelt. Acht Wochen nach der Behandlung (R8) zeigte sich bei den CSM-Tieren wiederum eine Besserung von -0,6 ($\pm 1,2$) Rotationen/min. Die ST-Tiere rotierten hier 1,8 ($\pm 1,8$) mal. Die CSM-Tiere zeigten, zum Zeitpunkt R10, eine Differenz von -1 ($\pm 1,2$) und die ST-Tiere eine Differenz von 0,7 ($\pm 1,8$). Drei Monate nach Transplantation (R12) reduzierten sich die

Rotationen bei der CSM-Gruppe weiter um $-1,2 (\pm 1,2)$ Rotationen/min und die ST-Gruppe zeigte hierbei eine Differenz vom R0-Wert die $0,8 (\pm 1,8)$ betrug.

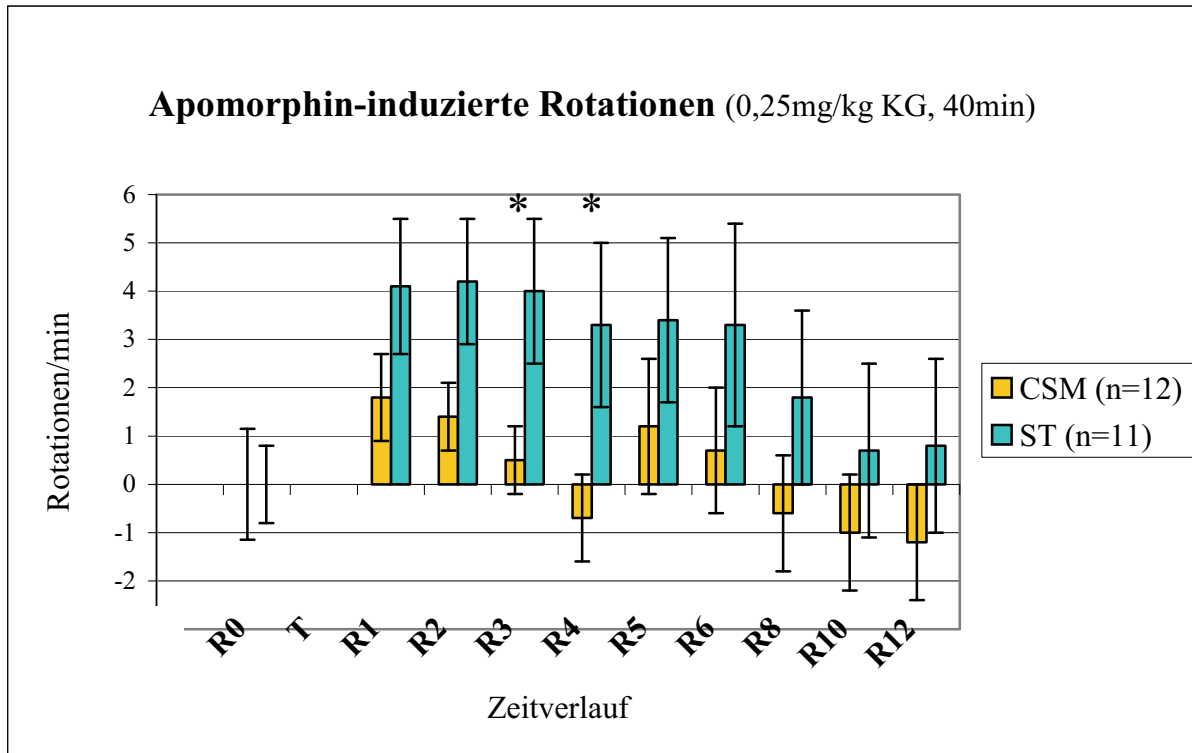


Diagramm 3) Darstellung der Apomorphin-induzierten Rotationen vor und nach Transplantation von CSM14.1-Zellen, bzw. Scheintransplantation mit DMEM in das Striatum von Hemiparkinson-Ratten:

Aufgeführt ist der Verlauf der Apomorphin-induzierten Rotationen eine Woche nach Läsion (R0), sowie eine Woche bis 12 Wochen nach Transplantation (R1-R12). Die gelben Balken stellen die Gruppe dar, die ein CSM14.1-Zelltransplantat erhielt (CSM), die blauen Balken stellen die Gruppe mit den Scheintransplantaten (ST) dar. Die Rotationswerte wurden zum Zeitpunkt R0 von den übrigen jeweils abgezogen, um die Differenzen der Zu- oder Abnahme der Rotationen pro min darzustellen. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ergaben sich bei R3 ($p = 0,044$) und R4 ($p = 0,023$) mittels U-Test. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

3.2.2 Vitalität der Zellen nach Markierung und Transplantation

Um CSM14.1-Zellen aus der Ratte im Wirtsgewebe wieder auffinden und immunhistochemisch charakterisieren zu können, war es notwendig, sie zuvor zu markieren. Hierbei wurde der lipophile rotfluoreszierende Farbstoff PKH26 (Sigma) verwendet. Wie in der **Abbildung 19** erkennbar, waren nach der Markierung alle Zellen mit dem Farbstoff beladen. Zellen, die während der Transplantationsprozedur für ca. 8-12 Stunden auf Eis gelagert wurden, erwiesen sich anschließend nach erneuter Zellzählung mit über 90% intakten Zellen als vital. Wurden solche Zellen wiederum über Nacht in Kultur genommen, bei 33° C in DMEM mit 10% FKS, so konnten sie nicht von CSM14.1-Zellen unterschieden werden, die nicht einer solchen Behandlung unterzogen wurden (**Abb. 19**). Die so kultivierten Zellen wurden adhärent, bildeten kurze plumpe Ausläufer aus, und es konnten auch Zellteilungen beobachtet werden (**Abb. 19**). Die Markierung und Lagerung bei 4° C auf Eis schien daher keine negativen Einflüsse auf die CSM14.1-Zellen auszuüben. Jedoch konnten diese Zellen im Fluoreszenzmikroskop, aufgrund ihrer PKH26-Markierung, von den übrigen CSM14.1-Zellen unterschieden werden (siehe unten) und waren dadurch, nach intrazerebraler Transplantation, auch im Wirtsgewebe detektierbar.

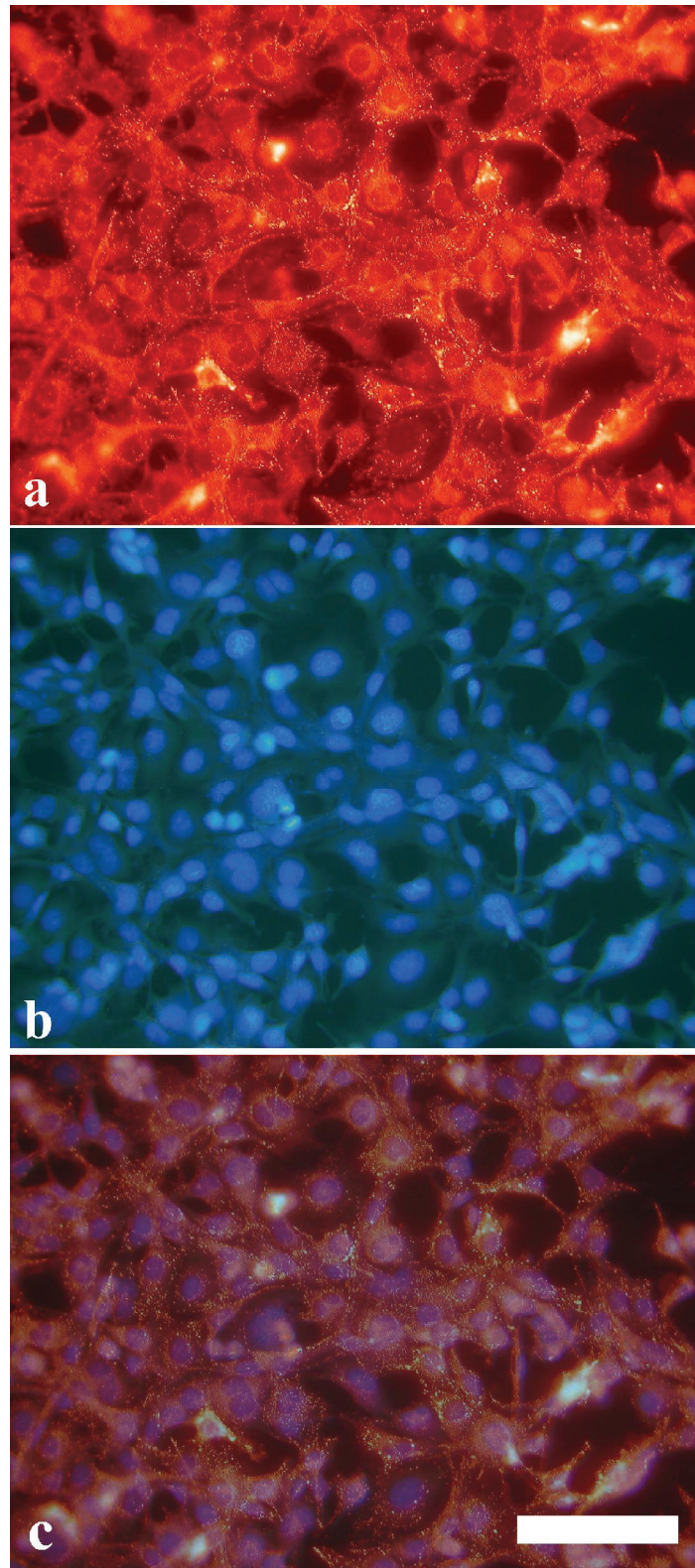


Abb. 19) PKH26-Markierung der CSM14.1-Zellen *in vitro*:

a) PKH26 markierte CSM14.1-Zellen (rote Fluoreszenz), die nach Markierung für 8 Stunden bei 4° C auf Eis gelagert, anschließend wiederum über Nacht bei 33° C kultiviert und schließlich mit 4% PFA fixiert wurden.

b) Gleicher Ausschnitt wie oben (**a**) in der Gegenfärbung mit DAPI (Kernfarbstoff, blau-weiße Fluoreszenz).

c) Wie anhand der Überlagerung von PKH26- und DAPI-Markierung erkennbar, waren alle Zellen mit PKH26 beladen. Die Zellen waren vital, adhärent, bildeten kurze plumpe Ausläufer aus, führten Zellteilungen durch und waren, bis auf ihre Fluoreszenz, von den üblichen undifferenzierten CSM14.1-Zellen nicht zu unterscheiden.

Maßstab = 200 µm (a-c).

3.2.3 Integration der CSM14.1-Zellen nach Transplantation in das ZNS

Wie in einer vorangegangenen Publikation beschrieben (Haas et al., 2000), konnten intrazerebral transplantierte Zellen aufgrund ihrer fluoreszierenden PKH26-Markierung im Wirtsgewebe detektiert und weiterhin immunhistochemisch charakterisiert werden. Diese Methode wurde auch hier verwendet, um die Integration, Migration und Differenzierung der transplantierten CSM14.1-Progenitorzellen im dopaminerg deafferentierten Striatum und der kontralateralen intakten Seite zu untersuchen (**Abb. 20, 21**).

Drei Monate nach Transplantation waren in allen transplantierten Versuchstieren PKH26-markierte Zellen bilateral im Striatum aufzufinden (**Abb. 20**). Die transplantierten Zellen migrierten ca. 300-400 µm weit aus dem Einstichkanal in das umgebende Wirtsgewebe. Auffällig viele Zellen lagen oftmals an den Rändern von Blutgefäßen (**Abb. 20, 21**). Eine Tumorbildung durch die temperatursensitiv immortalisierten Zellen konnte in keinem der untersuchten transplantierten Tiere nachgewiesen werden. Soweit es die fluoreszenzmikroskopische Beobachtung zuließ, erschienen die transplantierten PKH26-markierten Zellen vital (**Abb. 20, 21**). Unterschiede zwischen der läsionierten und der kontralateralen intakten Kontrollseite bezüglich der oben beschriebenen Punkte wurden nicht gefunden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Studie war es, die Differenzierung der undifferenzierten transplantierten Progenitoren in (dopaminerge) Neurone und Gliazellen zu untersuchen.

Die meisten der detektierten, PKH26-markierten CSM14.1-Zellen im Wirtsgewebe konnten bezüglich ihrer neuronalen oder glialen Differenzierung nicht charakterisiert werden, da sie mit keinem der auf dem jeweiligen Schnitt inkubierten Antikörper reagierten. Der überwiegende Anteil der charakterisierbaren Zellen war positiv für den Gliamarker GFAP (**Abb. 21a**). Die meisten Zellen lagen hierbei innerhalb des Injektionskanals. Dieser war aufgrund der, schon früher bekannten, Narbenbildung des Wirtsgewebes immer deutlich immunreaktiv für GFAP. Weitere GFAP-enthaltende, transplantierte Zellen lagen oftmals Blutgefäßen an (**Abb. 21a**).

Der einzige neuronale Marker, der in den CSM14.1-Zellen nach Transplantation mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte, war das Neurofilament 200 (NF200). Einige wenige transplantierte Zellen, die NF200-immunoreaktiv waren, fanden sich im Injektionskanal immunhistochemisch gefärbter Präparate aus dieser Region im Striatum (**Abb. 21b**).

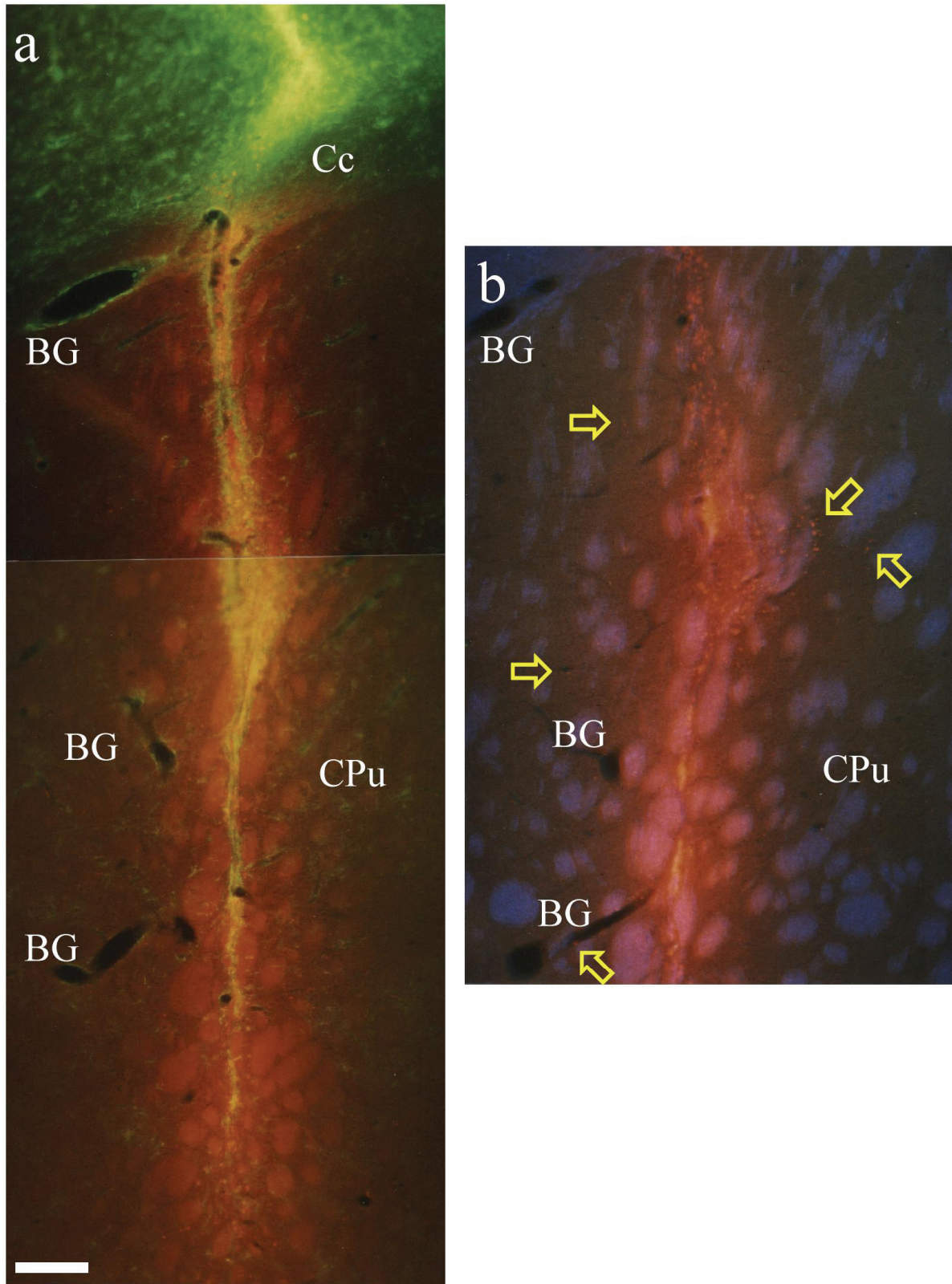


Abb. 20) Frontalschnittübersichten aus dem transplantierten Bereich eines dopaminerg deafferentierten CPu:

a) Anti-GFAP markierter Frontalschnitt (grüne Fluoreszenz) durch einen Injektionskanal, der transplantierte und PKH26-markierte CSM14.1-Zellen enthält (rote Fluoreszenz). Die durch die Injektion entstandene Glianarbe ist aufgrund ihrer grünen Fluoreszenz deutlich sichtbar. Der Cortex oberhalb des Corpus callosum (Cc) ist ebenfalls stark angefärbt. Maßstab = 200 µm (a, b).

b) NF200-gefärbter (blaue Fluoreszenz) Parallelschnitt der oberen Abbildung (erkennbar an den in beiden Aufnahmen gekennzeichneten Blutgefäßen, BG). Dargestellt sind transplantierte rotfluoreszierende Zellen, die ca. 200-400 µm aus dem Injektionskanal in das umgebende CPu migriert sind (Pfeile).

Alle weiteren hierbei untersuchten neuronalen Marker konnten nicht sicher den transplantierten CSM14.1-Zellen zugeordnet werden. Das Enzym Tyrosinhydroxylase (TH), konnte ebenfalls nicht in transplantierten CSM14.1-Zellen detektiert werden, wohingegen es aber in den gleichen Hirnschnitten in Kontrollregionen detektiert wurde, z. B. in TH-positiven Zellfortsätzen der nichtläsionierten Substantia nigra pars compacta im intakten Striatum und in dopaminergen Nervenzellen des Hypothalamus (nicht dokumentiert).

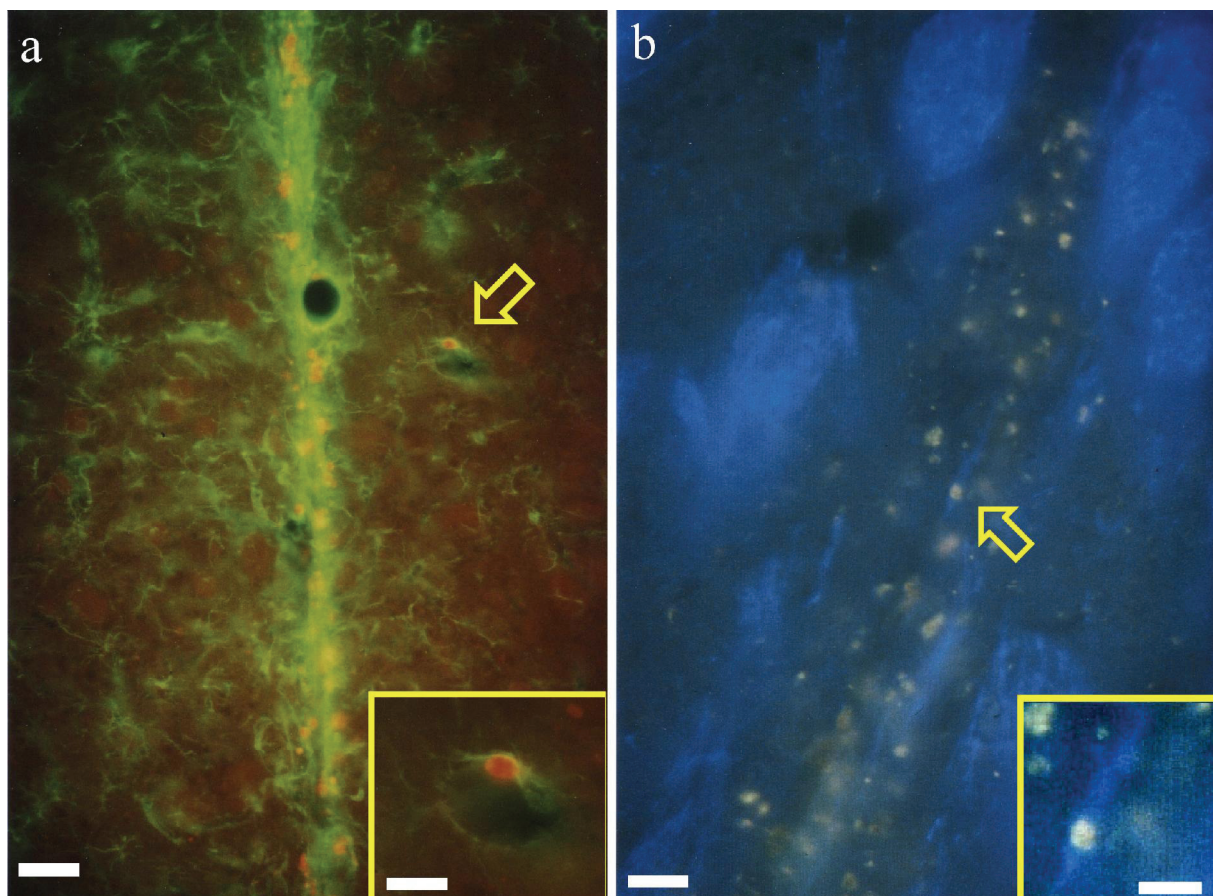


Abb. 21) Differenzierung der transplantierten CSM14.1-Zellen im dopaminerg deafferentierten CPu:

a) Frontalschnitt durch ein immunzytochemisch für GFAP (grüne Fluoreszenz) gefärbtes Zelltransplantat. PKH26-markierte transplantierte Zellen (rote Fluoreszenz) befinden sich größtenteils innerhalb des Injektionskanals, der aufgrund der Glianarbenbildung deutlich positiv für GFAP ist. Eine für GFAP und PKH26 doppelmarkierte Zelle, die an einem Blutgefäß liegt, ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Ausschnittsvergrößerung: Die in der Übersicht mit Pfeil gekennzeichnete in eine Gliazelle ausdifferenzierte CSM14.1-Zelle.

b) Immunzytochemisch für das Neurofilament 200 (NF200) gefärbter Frontalschnitt (blaue Fluoreszenz) durch das CPu im Bereich eines Zelltransplantats. Erkennbar sind PKH26-markierte transplantierte CSM14.1-Zellen (rote bis orangefarbene Fluoreszenz) im schräg verlaufenden Injektionskanal. Die Spezifität der NF200-Färbung ist anhand der deutlich angefärbten blaufluoreszierenden Axonbündel erkennbar. Eine transplantierte, für NF200 positive Zelle ist mit einem Pfeil markiert. Ausschnittsvergrößerung: Mit Pfeil markierte in neuronale Richtung differenzierte, für PKH26 (orangefarbene Fluoreszenz) und NF200 (blaue Fluoreszenz) positive transplantierte Zelle in höherer Vergrößerung.

Maßstäbe in den Abbildungen a) und b) entsprechen 60 µm. Maßstäbe in den Ausschnittsvergrößerungen entsprechen 20 µm.

4. Diskussion

Diese Arbeit beinhaltete zum einen die Charakterisierung temperatursensitiv immortalisierter Progenitorzellen der Zelllinie CSM14.1 unter definierten Kulturbedingungen *in vitro*. Nachweise wurden mittels Histologie, Immunzytochemie und Western Blot Techniken durchgeführt, um morphologische Veränderungen mit dem Gehalt von Markerproteinen zu korrelieren, die für ausdifferenzierende Nerven- oder Gliazellen charakteristisch sind. Das Hauptaugenmerk lag hauptsächlich auf Markern für eine dopaminerge Differenzierung.

Weitergehend wurden CSM14.1-Zellen *in vivo*, nach Transplantation in das Corpus striatum adulter Hemiparkinson-Ratten, bezüglich ihrer Differenzierung in (dopaminerge) Nerven- und Gliazellen hin untersucht. Um Fragen der dopaminergen Differenzierung zu beantworten, wurden undifferenzierte PKH26-markierte CSM14.1-Zellen durch eine stereotaktische Operation in das Corpus striatum von Hemiparkinson-Ratten eingebracht und nach drei Monaten Beobachtungszeit mittels Immunzytochemie charakterisiert. Über einen Zeitraum von 3 Monaten wurde zudem der Einfluß eines solchen Transplantats auf Apomorphin-induzierte Rotationen hin untersucht und mit dem Einfluß einer Scheintransplantation, der eine Kontrollkohorte unterzogen wurde, verglichen. Die hierbei erzielten Ergebnisse werden im Folgenden mit denen der Literatur verglichen.

4.1 Charakterisierung der CSM14.1-Zellen *in vitro*

Wie oben aufgeführt war es Ziel dieser Studie das *in vitro* Differenzierungspotential der CSM14.1-Zellen zu untersuchen, da derartige Fragestellungen und Untersuchungen in der Literatur noch unzureichend behandelt wurden. Hierbei wurde sich insbesondere auf die Differenzierung in dopaminerge Neurone konzentriert und dies mit Literaturbefunden der *in vivo* Differenzierung dopaminerger Neurone aus der Substantia nigra pars compacta verglichen.

4.1.1 Zellbiologie und morphologische Veränderungen

Die Zelltypen des adulten Säugergehirns stammen alle von proliferierenden neuronalen Stammzellen ab, die sich im embryonalen Gehirn in der Ventrikularzone befinden (Sauer, 1935; McKay, 1989; Gage et al., 1995). Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass sich solche Stammzellen auch aus adulten Gehirnen isolieren und *in vitro* unter Zugabe von mitogenen Substanzen expandieren lassen (Reynolds et al., 1992; Weiss et al., 1996; Palmer et al., 2001). Unter diesen Kultivierungsbedingungen behalten sie die Merkmale neuraler

Stammzellen, nämlich das Vorhandensein des neuralen Stammzellmarkers Nestin (Frederiksen und McKay, 1988; Lendahl et al., 1990), hohe Proliferationsraten und das Generieren von Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften und von solchen Zellen, die in neuronale oder gliale Richtung differenzieren (Gage et al., 1995; Svendsen und Rosser, 1995), bei.

Die hier verwendete klonale CSM14.1-Zelllinie stammt aus dem ventralen Mesenzephalon einer Ratte vom Embryonaltag 14 (E14) und wurde von Durand et al. generiert (1990). Bekannt war bislang nur, daß diese Zellen mittels retroviralem Gentransfer zur Überexpression des Onkogenproduktes Large-T-Antigen immortalisiert wurden, sie bei 33° C proliferieren und ihre Zellteilungen bei 39° C Umgebungstemperatur einstellen. Einhergehend mit dem Teilungsstopp veränderten die flachen neuroepithelialen Zellen ihre Morphologie, bildeten vermehrt Ausläufer aus und waren eine Woche nach Differenzierung immunreaktiv für TH und NSE (Durand et al., 1990). Das Fehlen einer TH-Immunreaktivität in undifferenzierten CSM14.1-Zellen wurde auch von der Arbeitsgruppe um Prof. D.E. Bredesen beschrieben (Anton et al., 1994). Mehr als die Angaben aus dem Abstrakt von Durand et al. (1990) und den Publikationsinhalt von Anton et al. (1994) über die Zellbiologie und die *in vitro* Differenzierung dieser Zellen war nicht bekannt. Die Ergebnisse dieser hier vorliegenden Arbeit bestätigten und vervollständigten daher die bislang erhobenen Befunde. Die in DMEM unter Zugabe von 10% FKS und unter permissiven Kulturbedingungen von 33° C kultivierten CSM14.1-Zellen zeigten weitere phänotypische, physiologische und morphologische Eigenschaften, die allgemein als typisch für neurale Stammzellen angenommen werden. Eine hohe Zellteilungsrate mit einer Teilung etwa alle 18 Stunden, die alle drei Tage eine erneute Passage notwendig machte, sowie die Morphologie von neuroepithelialen Zellen, die bei Konfluenz einem epithelialen Verband ähnelte und das erstmals dokumentierte Vorhandensein des neuralen Stammzellmarkers Nestin können hierzu herangezogen werden (Lendahl et al., 1990; Redies et al., 1991; Cattaneo und Conti, 1998). Da sich humane neurale Stammzellen in bisherigen Studien ähnlich verhielten (Pagano et al., 2000; Palmer et al., 2001; Andressen et al., 2003), ist deren unbegrenzte Vermehrung unter ethischen (Hildt, 2000) und praktischen (Björklund und Lindvall, 2000; Bauer et al., 2002) Gesichtspunkten von besonderem Interesse. Durch ihre Verwendung bei der klinischen Transplantation würde die Anzahl der hierfür verwendeten Embryonen oder Feten auf ein Minimum reduziert und es wäre sichergestellt, dass es beim Empfänger aufgrund nun möglicher vorheriger Test's des Spendermaterials nicht zu viralen oder bakteriellen Infektionen kommt.

Eine Erhöhung der Umgebungstemperatur auf 39° C, welche der Temperatur im Rattengehirn entspricht (Schröder, 1986; Gordon, 1990; Martinez-Serrano und Björklund, 1997) und routinemäßig in vorherigen Studien mit temperatursensitiv immortalisierten Zellen verwendet wurde (Frederiksen et al., 1986; Redies et al., 1986; Zhong et al., 1993; Snyder, 1994; Cattaneo und Conti, 1998), zusammen mit einer Reduktion von FKS auf 1% nach dem Protokoll von Winkler et al. (1998) führte zu einem Proliferationsstopp sowie weitgehenden phänotypischen und morphologischen Veränderungen. Der Nachweis für das immortalisierende Onkogenprotein Large-T-Antigen erfolgte im Western Blot. Bei undifferenzierten, stark proliferierenden Zellen fand sich ein hoher Gehalt dieses Proteins. Dieses war allerdings schon nach drei Tagen unter den oben beschriebenen Differenzierungsbedingungen und für den folgenden Zeitraum nicht mehr nachweisbar und erklärt auch die Abnahme vitaler Zellen über den weiteren Kultivierungszeitraum. Die Herunterregulation des immortalisierenden Onkogenproteins Large-T-Antigen und die damit einhergehende Sicherheit dieses Immortalisierungsverfahren wurde schon früher bei anderen verschiedenen neuronalen Stammzelllinien aufgezeigt (Frederiksen et al., 1988; Redies et al., 1991; Cattaneo und Conti, 1998) und konnte in dieser Studie für die CSM14.1-Zellen verifiziert werden. Die hier in der *in vitro* Situation erzielten Ergebnisse werden weiter unten bei der *in vivo* Charakterisierung dieser Zellen wieder aufgegriffen (Kap. 4.2).

Unter den Differenzierungsbedingungen kam es weiterhin zu einer generellen Größenzunahme sowie einer signifikanten Zunahme an Zellausläufern gegenüber undifferenzierten CSM14.1-Zellen. Viele der differenzierten Zellen besaßen die Morphologie unterschiedlichster Nervenzellen wie man sie auch in primären neuronalen Zellkulturen beobachten kann (Neale et al., 1978; Baughman et al., 1991; Goslin und Banker, 1991; Trenkner, 1991; Keefer et al., 2001). Ausdifferenzierende CSM14.1-Zellen ähnelten bipolaren und multipolaren Nervenzellen oder waren mit Pyramidenzellen vergleichbar. Nach einwöchiger Differenzierung bildeten deren Ausläufer „netzwerkähnliche“ Strukturen untereinander aus, die denen von Nervenzellen aus Primärkulturen ähnelten (Trenkner, 1991; Keefer et al., 2001).

4.1.2 Neuronale Differenzierung *in vitro*

Neben diesen phänotypischen Veränderungen kam es in den differenzierenden Zellen zu Veränderungen im Gehalt verschiedenster Markerproteine, die als morphologisches Korrelat für den Entwicklungszustand einer neuronalen Zelle herangezogen werden können (Svendsen et al., 2001). Undifferenzierte CSM14.1-Zellen wiesen einen hohen Gehalt des neuronalen

Stammzellmarkers Nestin auf, wohingegen dieser während der Differenzierung kontinuierlich abnahm. Es war schon seit längerem bekannt, daß Nestin in neuronalen Stamm- und Progenitorzellen der Ratte vorkommt (Frederiksen und McKay, 1988; Lendahl et al., 1990), im adulten Gehirn nur noch in Regionen mit proliferierenden Zellen nachgewiesen werden kann (Cameron und McKay, 1998; Filippov et al., 2003) und in ausdifferenzierenden postmitotischen Zellen nicht mehr nachweisbar ist (Svendsen et al., 2001). Eine solche Abnahme dieses Intermediärfilamentproteins unter Differenzierungsbedingungen *in vitro* ist für eine Reihe weiterer immortalisierter neuraler Stamm- oder Progenitorzelllinien beschrieben worden (Frederiksen et al., 1988; Redies et al., 1991; Snyder, 1994; Cattaneo und Conti, 1998). Im Gegensatz zur Abnahme von Nestin kam es während der Differenzierung zu einer Zunahme neuronaler Markerproteine in den CSM14.1-Zellen. Dies deutete auf eine generelle neuronale Differenzierung dieser Zellen *in vitro* hin. Für das Protein NSE war eine solche Zunahme, eine Woche nach Differenzierung, für diese Zellen schon vorher bekannt (Durand et al., 1990), jedoch konnte in dieser Studie eine deutliche Zunahme der NSE mittels Western Blot schon nach drei Tagen bei 39° C Umgebungstemperatur nachgewiesen werden. Der Gehalt dieses Proteins blieb dann über den weiteren Kultivierungszeitraum, gegenüber undifferenzierten CSM14.1-Zellen, erhöht und die Spezifität des Antikörpers wurde zusätzlich mit einer Positivkontrolle (Proteinlysate aus dem Hippocampus einer Ratte) aufgezeigt. Da NSE jedoch als alleiniger Marker für eine neuronale Differenzierung als problematisch anzusehen ist (Sensenbrenner et al., 1997; Svendsen et al., 2001), wurden die Zellen zusätzlich auf ihren NeuN-Gehalt hin untersucht. Dieser panneuronale Marker (Mullen et al., 1992), dessen Funktion noch nicht bekannt ist, markiert ausschließlich postmitotische Neurone (Mullen et al., 1992; Sarnat et al., 1998). In der Immunzytochemie waren CSM14.1-Zellen zu keinem Zeitpunkt eindeutig immunreaktiv für NeuN, wohingegen im Western Blot eine für NeuN spezifische Bande bei ca. 46 kDa bei differenzierenden Zellen schon nach drei Tagen und über den gesamten Differenzierungszeitraum nachweisbar war. Eine weitere, für NeuN spezifische Bande (ca. 48 kDa) war allerdings auch bei undifferenzierten CSM14.1-Zellen im gleichen Maße nachweisbar wie in Differenzierenden. Da über die Funktion von NeuN noch keine genauen Hinweise vorliegen, ausser der Annahme es könnte sich hierbei um einen Transkriptionsfaktor handeln, der an einer neuronalen Differenzierung beteiligt ist (McPhail et al., 2004), kann über die Bedeutung der Zunahme dieses Proteins bei den differenzierenden CSM14.1-Zellen *in vitro* nur spekuliert werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass ein bestimmter Bestandteil dieses Proteins nur während der Differenzierung von den Zellen gebildet wurde, was ebenfalls auf eine neuronale Differenzierung hinweist.

Eindeutiger fiel in dieser Studie der Nachweis für das neuronale Markerprotein MAP5 in differenzierenden CSM14.1-Zellen aus. Die hierbei detektierten Epitope, Mikrotubulibestandteile von Nervenzellen, charakterisieren ausdifferenzierte Nervenzellen (Matus, 1988). Diese waren mit immunzytochemischen Methoden in undifferenzierten CSM14.1-Zellen nur schwach detektierbar, aber in differenzierenden Zellen nahm der MAP5-Gehalt in allen Zellen stark zu und war in späten Stadien in dendritenähnlichen Strukturen, dem Zytoplasma und Ausläufern die Axonen ähnelten nachweisbar. Weitere mikrotubulinassoziierte Proteine vom Typ 2 (MAP2) dienen ebenfalls als Standardmarker für postmitotische ausdifferenzierte Nervenzellen *in vitro* (Palmer et al., 1997; Jung et al., 1998, Li et al., 1998, Svendsen et al., 2001) und *in vivo* (Lundberg et al., 1997; Catapano et al., 1999). Das Vorkommen von MAP2 korreliert wiederum sehr mit dem von MAP5, was die neuronale Differenzierung der CSM14.1-Zellen erhärtet (Palmer et al., 1997). Die Tendenz der CSM14.1-Zellen, unter diesen Differenzierungsbedingungen (39° C Umgebungstemperatur und Serumreduktion) in eine neuronale Richtung zu differenzieren, läßt sich somit aus den in dieser Arbeit erbrachten Befunden ableiten. Diese werden noch weiter dadurch bekräftigt, daß GFAP, das charakteristische Intermediärfilamentprotein von Astrozyten (Eng et al., 1971; Eng und Kosek, 1974; Debus et al., 1983; Franke et al., 1991), bei den CSM14.1-Zellen, mittels eines monoklonalen Antikörpers in dieser Studie zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnte. Dies ist ein Hinweis für die präferentielle neuronale Differenzierung unter den hier durchgeführten Kultivierungsbedingungen bei den CSM14.1-Zellen. Ein solches Differenzierungsverhalten, d. h. eine präferentielle Differenzierung in Nervenzellen *in vitro*, ist für weitere immortalisierte Zelllinien, z. B. RN33B- und ST14A-Zellen, ebenfalls beschrieben worden (Whittemore und White, 1993; Cattaneo und Conti, 1998) und wurde sogar bei primären neuroepithelialen Zellen beobachtet (Buc-Caron, 1995). Es fanden sich hierbei auch keine Unterschiede bezüglich der unterschiedlichen Regionen, aus welcher diese Zellen stammten. Ob diese präferentielle Differenzierung in neuronale Richtung alleine von den Kulturbedingungen, einem genetisch determinierten Programm oder von fehlenden, bzw. vorhandenen Umgebungsfaktoren (z. B. Molekülen der EZM = extrazelluläre Matrix) abhängig ist, konnte für neurale Stammzellen bislang nicht eindeutig geklärt werden. Man kann sicher davon ausgehen, daß eine Vielzahl von Faktoren hierauf Einfluss hat. Ein wichtiger Kandidat jedoch könnte das Zytokinderivat CNTF darstellen (Richardson, 1994; Lee et al., 2000; Haas et al., 2004). Von CNTF ist bekannt, dass es nach Zugabe zum Kulturmedium *in vitro* (Hughes et al., 1988; Sun et al., 2001; Hasling et al., 2003) oder nach Applikation *in vivo* in das Zentralnervensystem (Winter et al., 1995;

Clatterbuck et al., 1996; Kahn et al., 1996), die Differenzierung von neuronalen Progenitor- und Stammzellen in eine gliale Richtung induziert. Ähnliche Ergebnisse, nämlich eine Differenzierung in GFAP-immunreaktive Zellen nach CNTF-Applikation, wurden auch bei sogenannten ES-Zellen (Embryonale Stammzellen) gefunden, die durch selektive Kultivierungsbedingungen *in vitro* gezielt in unterschiedlichste Zellpopulationen des Zentralnervensystem differenzieren konnten (Barberi et al., 2003). Wie in der hier durchgeführten Arbeit mittels Western Blot und immunzytochemischem Nachweis gezeigt werden konnte bildeten die undifferenzierten CSM14.1-Zellen selbst kein oder nur geringste Mengen des Zytokinderivats CNTF. Dies wäre daher eine mögliche Erklärung für ein Ausbleiben der glialen Differenzierung in den CSM14.1-Zellen unter serumreduzierten Bedingungen. Interessanterweise bildeten naive ST14A-Zellen, eine Zelllinie, mit deren intrazerebralen Transplantation (Haas et al., 1999; Weinelt et al., 2003) und *in vitro* Charakterisierung (Wree et al., 2002; Hovakimyan et al., 2008a) sich unsere Arbeitsgruppe ebenfalls beschäftigt, im Vergleich zu anderen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, selbst nur geringste Mengen an CNTF-mRNA (Cattaneo und Conti, 1998), und desweiteren war das CNTF-Protein in diesen Zellen ebenfalls nicht nachweisbar (Weinelt et al., 2003). Inzwischen wurden diese naiven ST14A-Zellen in der Arbeitsgruppe um Prof. Rolfs (Klinik für Neurologie, Universität Rostock) mittels retroviralem Gentransfer so verändert, daß sie endogen CNTF überexprimierten (Weinelt et al., 2003). In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe (Böttcher et al., 2003) wurde das mRNA-Expressionsprofil der unveränderten ST14A-Zellen mit dem der CNTF-überexprimierenden ST14A-Zellen während einer kurzen Differenzierungsphase verglichen. Es wurde hierbei die Affymetrix-Micoarray-Methode[®] angewandt und diese ermöglichte es ca. 7900 bislang bekannte Gene zu untersuchen (Böttcher et al., 2003). Böttcher et al. fanden hierbei keine Hinweise für eine präferentielle Differenzierung der CNTF-überexprimierenden ST14A-Zellen in Astrozyten. Jedoch erfolgte in dieser Studie, verglichen mit der Arbeit von Cattaneo und Conti (1998), kein Serumentzug, sondern lediglich eine Temperaturerhöhung auf 39° C (bei 10% FKS-Supplementierung) und der längste untersuchte Zeitraum betrug nur 24 Stunden (Böttcher et al., 2003). Weiterhin wurden diese Zellen ohne Tetrazyklingabe kultiviert (Böttcher et al., 2003), obwohl das eingebrachte CNTF-überexprimierende Gen unter einem Tetrazyklin-abhängigen Promotor stehen sollte (Weinelt et al., 2003). CNTF sollte also in diesen Zellen, nach dem sogenannten Tet-on-Prinzip (Kistner et al., 1996; Mansuy et al., 1998), nur bei Kultivierung mit dem Antibiotikum Tetrazyklin oder seinen Derivaten von den Zellen produziert werden. Es wäre sicher eine interessante Fragestellung zu untersuchen, wie sich diese CNTF-

überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den naiven ST14A-Zellen bezüglich ihrer glialen Differenzierung über einen deutlich längeren Zeitraum unter Serum-freien oder -reduzierten Differenzierungsbedingungen bei 39° C und zusätzlicher Tetrazyklingabe verhalten, da anzunehmen ist, daß der untersuchte Zeitraum zu kurz gewesen sein könnte und die Zugabe von Tetrazyklin die CNTF-Produktion dieser Zellen doch deutlich erhöhen müsste. Von den oben aufgeführten RN33B-Zellen (Whittemore und White, 1993), sowie auch von den ST14A-Zellen (Cattaneo und Conti, 1998), weiß man inzwischen, daß sie nach Transplantation in das adulte Rattengehirn vermehrt in GFAP-immunreaktive Zellen, also in Astrozyten, differenzieren (Lundberg et al., 1996, 1997, 2002). Dies ist auch für aus Primärkulturen gewonnene neurale Stammzellen, die anschließend intrazerebral transplantiert wurden, gezeigt worden (Englund et al., 2002a, b). Diese neuroepithelialen Zellen besitzen also das Potential in verschiedene Zelltypen des ZNS zu differenzieren, obwohl *in vitro* vornehmlich die neuronale Richtung eingeschlagen wird. Diese neuronale Differenzierung *in vitro* ließe sich durch den geringen endogenen CNTF-Gehalt möglicherweise erklären. In einer kürzlich von einer anderen Arbeitsgruppe publizierten Studie (Vernon und Griffin, 2005) wurde ebenfalls die neuronale Differenzierung von CSM14.1-Zellen *in vitro* untersucht. Hierbei wurde das von Haas und Wree (2002) beschriebene Differenzierungsprotokoll angewandt. Die differenzierenden CSM14.1-Zellen wurden hierbei jedoch für einen Zeitraum von bis zu sechs Wochen kultiviert. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die in dieser Dissertation vorliegenden Befunde bezüglich der Differenzierung in neuronale Zellen von Vernon und Griffin (2005) bestätigt wurden. Jedoch konnten Vernon und Griffin den Astrozytenmarker GFAP in undifferenzierten CSM14.1-Zellen mittels eines polyklonalen Antikörpers der Firma Chemicon nachweisen. Unter Differenzierungsbedingungen nahm der GFAP-Gehalt in diesen Zellen dann kontinuierlich ab (Vernon und Griffin, 2005). Die beiden Autoren schlossen daraus, wie es meine Befunde ebenso aufzeigten, dass CSM14.1-Zellen *in vitro* eine präferentielle Differenzierung in Nervenzellen durchlaufen. Vernon und Griffin diskutierten zudem die Anwendung von Anti-GFAP als Astrozytenmarker als sehr kritisch, da Zellen, die nicht zum ZNS gehören, ebenfalls GFAP enthalten können (Vernon und Griffin, 2005). Zudem gilt die Anwendung polyklonaler Antikörper *in vivo* und vor allem *in vitro* aufgrund unspezifischer Kreuzreaktivitäten des von immunisierten Tieren entnommenen Serums als ohnehin problematisch (Polak und van Noorden, 1992). Eine positive Markierung undifferenzierter und differenzierender CSM14.1-Zellen *in vitro* unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers konnte in der hier vorliegenden Dissertation nicht beobachtet werden, obwohl

dieser verwendete Antikörper *in vivo* deutliche positive Markierungen erzielte. Diese Ergebnisse und die gliale Differenzierung bei den CSM14.1-Zellen *in vivo* wird in Kapitel 4.2 weiter besprochen.

4.1.3 Dopaminerge Differenzierung *in vitro*

Nachdem auf die neuronale Differenzierung und das Fehlen einer glialen Differenzierung bei den CSM14.1-Zellen eingegangen wurde, wird im folgenden die spezielle Differenzierung in dopaminerge Nervenzellen diskutiert und mit der von dopaminergen nigrostriatal projizierenden Neuronen *in vivo* verglichen.

In Gehirnen von Säugetieren ist die Anzahl dopaminerger Nervenzellen, im Vergleich zur gesamten Anzahl von Neuronen, sehr gering (German und Manaye, 1993). Im Mittelhirn sind diese dopaminergen Neurone zudem auf wenige Kerngebiete beschränkt und befinden sich in der Area 8 (A8, Nucleus retrorubralis), Area 9 (A9, Substantia nigra pars compacta) und Area 10 (A10, Area tegmentalis ventralis) (Björklund und Lindvall, 1984; Nelson et al., 1996). Wie Eingangs erwähnt, beruhen die klinischen Symptome des Morbus Parkinson auf einen Mangel an Dopamin in den Basalganglien, ausgelöst durch das Absterben dopaminerger Nervenzellen im Mesenzephalon (Parkinson, 1817; Tretiakoff, 1919; Marsden, 1992). Hierbei sind es besonders die nigrostriatal projizierenden Neurone, der Substantia nigra pars compacta von A9, welche durch ihr Absterben zu den Bewegungsstörungen beim Morbus Parkinson führen und nicht die der Region A10, die zudem in geringerem Maße neurodegenerativen Veränderungen unterliegen (Iacopino und Christakos, 1990; Yamada et al., 1990; Gibb, 1992; Ito et al., 1992). Diese A9-Neurone unterscheiden sich bezüglich ihrer Entwicklung, ihrer Eigenschaften und ihres Gehaltes an spezifischen Markerproteinen von den übrigen dopaminergen Nervenzellen des Mittelhirns und dem weiterer Hirngebiete (Liang et al., 1996; Alfahel-Kakunda und Silverman, 1997). Im Hinblick auf die Substitutierung dopaminerger Neurone in den Basalganglien durch die Zelltransplantation liegt es daher nahe, Zellen zu verwenden, die denen aus der Area 9 am weitestgehenden entsprechen (Björklund und Isacson, 2002).

Die „Geburt“ und der Ablauf der Ausdifferenzierung dopaminerger Neurone der Area 9 von Nagetieren, insbesondere bei Labormäusen, ist schon weitgehend untersucht und beschrieben (Perrone-Capano et al., 1999; Perrone-Capano und Di Porzio, 2000). Bei Mäusen liegt der Entstehungsort dieser Neurone an der ventrikulären Zone in der Grenzregion zwischen Mesenzephalon und Metenzephalon (Voorn et al., 1988), wobei die ersten Zellen um den Embryonaltag 8,5 (E8,5) entstehen (Di Porzio et al., 1990). Die Entwicklung der

dopaminergen Neurone basiert auf einer Reaktion auf Moleküle, die von sogenannten Signalzentren entlang der dorso-ventralen und antero-posterioren Achse sezerniert werden. Zwei Signalmoleküle, nämlich Sonic hedgehog (Shh) und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor 8 (bFGF8), üben hierbei eine wichtige Funktion aus. Im ventralen Mesenzephalon wirken Shh und bFGF8 auf mitotisch aktive neuronale Vorläuferzellen, um eine ventrale und anterior-posteriore Position zu bestimmen und um eine Kaskade von Genexpressionen in Gang zu setzen, die letztendlich zu einem dopaminergen Phänotyp führen (Hynes et al., 1995; Ye et al., 1998; Hynes und Rosenthal, 1999). Es wurden eine Reihe von Genen, die an diesem Prozess teilnehmen, identifiziert, darunter die Homeobox Gene *Lmx1b*, *Ptx3*, *Engrailed 1 und 2 (En1, En2)*. Das erste bislang bekannte Gen, das speziell von proliferierenden dopaminergen Vorläuferzellen exprimiert wird, ist *Lmx1b* (Smidt et al., 2000), gefolgt von *En1* und *En2* um E9 (Simon et al., 2001; Simon et al., 2003). Am Tag E10,5 werden die dopaminergen Vorläuferzellen postmitotisch und beginnen allgemeine neuronale Marker zu exprimieren (Wallen et al., 1999). Zu diesem Zeitpunkt wird erstmals die mRNA des nukleären Retinsäurerezeptors *Nurr1* exprimiert, unmittelbar von *Ptx3* am Tag E11,5 gefolgt (Wallen et al., 1999; Smidt et al., 2000). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen diesen oben aufgeführten Genen ist bislang noch nicht bekannt, jedoch weiß man inzwischen, daß *Nurr1* für die Generierung des Enzyms TH, welches ab dem Tag E11,5 nachweisbar ist, essentiell ist (Specht et al., 1981; Berger et al., 1982; Zetterström et al., 1997; Saucedo-Cardenas et al., 1998; Bäckmann et al., 1999; Perrone-Capano et al., 1999; Wallen et al., 1999; Cazorla et al., 2000; Smidt et al., 2000; Eells et al., 2001). Auf die *Nurr1*-Expression folgt das Enzym Aldehyddehydrogenase-2 (ALDH2), das an der Synthese von Retinsäure aus Vitamin A beteiligt ist und zudem als weiterer Indikator für einen ausgereiften dopaminergen Phänotyp der Zellen in Area 9 herangezogen wird (McCaffery und Dräger, 1994; Haque et al., 1997; Wagner et al., 1999; Wallen et al., 1999). Später werden in den dopaminergen Vorläuferzellen Gene exprimiert, die für die weitere Synthese und den Metabolismus von Dopamin nötig sind, darunter Dihydroxy-L-Phenylalanin-Decarboxylase (DDC), der vesikuläre Monoamintransporter 2 (VMAT2), der Dopamintransporter (DAT), sowie andere für Dopamin spezifische Gene oder Proteine, unter anderem c-ret und ein Rezeptorkomplex (GDNFR α 1) für den neurotrophen Faktor GDNF (Perrone-Capano et al., 1999). Es sind inzwischen Knock-out Mäuse für die meisten der oben aufgeführten Gene oder Transkriptionsfaktoren, darunter *En1* und *En2*, *Lmx1b* und *Nurr1*, generiert worden, und ihre kritische Funktion für die Differenzierung und Entwicklung mesenzephaler dopaminergener Neurone wurde nachgewiesen (Eells, 2003).

Die Abfolge dieser Entwicklungsschritte bei der dopaminergen Differenzierung, wie sie oben für Mäuse beschrieben wurde, ist in ähnlicher Art und Weise auch beim Menschen vorhanden (Freeman et al., 1991; Perrone-Capano et al., 1999). Aufgrund der menschlichen Entwicklungszeiten erfordern diese Schritte allerdings deutliche längere Zeiträume. Die ersten TH-immunreaktiven Zellen entlang der ventrikulären Zone im ventralen Mesenzephalon des Menschen sind nach 6,5 Wochen der Schwangerschaft auffindbar und erst nach weiteren 3,5 Wochen sind Ihre Ausläufer erstmals in den Terminalgebieten, z. B. dem Putamen, auffindbar. Ab der 10. Woche befinden sich dann nahezu keine neu entstehenden Zellen mehr entlang der ventrikulären Zone (Freeman et al., 1991). In der 7. – 12. Woche wurde bislang auch die Entnahme humaner Feten für klinische Transplantationsstudien vorgenommen (Hagell und Brundin, 2001; Bauer et al., 2002).

Wie Eingangs erwähnt, war eine der zentralen Fragestellungen dieser Arbeit die Untersuchung der dopaminergen Differenzierung der CSM14.1-Zellen unter definierten Kulturbedingungen *in vitro*. Über diese war bislang nur bekannt, dass undifferenzierte CSM14.1-Zellen die mRNA für das Enzym TH exprimierten (Zhong et al., 1993; Anton et al., 1994, 1995). Das Protein jedoch selbst konnte mittels Immunzytochemie in undifferenzierten Zellen nicht nachgewiesen werden (Anton et al., 1994) und soll laut Durand et al. (1990) erst nach einer Woche unter Differenzierungsbedingungen und der Zugabe von Retinsäure von den Zellen in nachweisbaren Mengen für immunzytochemische Verfahren gebildet worden sein. Weiterhin war bislang von den CSM14.1-Zellen nur bekannt, dass sie aus dem ventralen Mesenzephalon einer Ratte vom Tag E14 stammen. Aus diesem Grunde und der Tatsache, dass undifferenzierte CSM14.1-Zellen in eigenen immunzytochemischen Vorexperimenten, ebenfalls keine positiven TH-Markierungen aufwiesen, untersuchte ich diese zunächst auf ihren Nurr1-Gehalt, da die Nurr1-Expression im Rahmen der dopaminergen Differenzierung der von TH direkt vorangestellt ist. Zudem ist das Vorhandensein von Nurr1 essentiell für die Generierung des Enzyms TH in dopaminergen Nervenzellen von A9 (Zetterström et al., 1997; Saucedo-Cardenas et al., 1998; Cazorla et al., 2000; Eells et al., 2001). Homozygote Nurr1-Knock-out Mäuse bilden keine dopaminergen Neurone in der Substantia nigra pars compacta aus und sterben innerhalb der ersten Tage nach der Geburt, da sie aufgrund von motorischen Störungen nicht in der Lage sind Nahrung aufzunehmen (Zetterström et al., 1997). Bei diesen Tieren sind jedoch die übrigen dopaminergen Nervenzellpopulationen, z. B. im Hypothalamus und dem Bulbus olfactorius, scheinbar normal angelegt (Zetterström et al., 1997; Saucedo-Cardenas et al., 1998). Wie sich mittels Immunzytochemie zeigte, besitzen alle undifferenzierten CSM14.1-Zellen (33° C, 10% FKS) den Rezeptor Nurr1, und im

Western Blot konnte seine anfängliche Zunahme innerhalb der ersten drei Tage der Differenzierung dokumentiert werden. Anschließend kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme unter den Ausgangswert, die aber immer noch deutlich detektierbar war. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für das Enzym TH in den undifferenzierten CSM14.1-Zellen nur eine schwache immunreaktive spezifische Bande bei 68 kDa, wohingegen schon nach drei Tagen der Differenzierung diese Bande deutlich an Immunreaktivität zunahm, zudem weitere für dieses Protein spezifische Banden hinzukamen und diese Banden über den gesamten weiteren Kultivierungszeitraum konstant blieben. Ähnlich verhielten sich die CSM14.1-Zellen bezüglich der Veränderungen ihres ALDH2-Gehaltes, nämlich nicht nachweisbare Mengen im undifferenzierten Zustand und eine kontinuierliche Zunahme über den gesamten Differenzierungszeitraum. Diese Veränderungen lassen sich folgendermaßen interpretieren:

Nestin-immunreaktive undifferenzierte CSM14.1-Zellen werden durch die veränderten Kulturbedingungen zur Differenzierung angeregt und Nurr1, dessen biologischer Ligand übrigens noch nicht bekannt ist, steigt in seinem Gehalt in diesen Zellen an, da er benötigt wird, um nun verstärkt den TH-Promotor zu aktivieren (Cazorla et al., 2000; Eells et al., 2001). Nach der Initialisierung der Differenzierung innerhalb der ersten drei Tage kommt es dann zur kontinuierlichen Abnahme von Nurr1, wobei es aber immer noch in Proteinlysaten aus diesen Zellen nachweisbar bleibt, wie es auch für dopaminerge Neurone *in vivo* beschrieben wurde (Bäckman et al., 1999). Analog zu der *in vivo* Differenzierung nigrostriataler dopaminerge Neurone von A9 konnte in den CSM14.1-Zellen ebenso, *in vitro*, eine zeitliche Abfolge der Expression der Markerproteine für eine dopaminerge Differenzierung nämlich Nurr1, TH und schließlich ALDH2 beobachtet werden.

Diese Beobachtungen sind im Vergleich zu einer Publikation von Wagner et al. (1999) von besonderem Interesse. In deren Studie wurden immortalisierte zerebelläre Stammzellen der Zelllinie C17.2 mittels gentechnischer Methoden so verändert, dass sie endogen Nurr1 produzierten. Gewöhnliche Nestin-immunreaktive C17.2-Zellen enthalten kein Nurr1. Unter, den sonst für C17.2-Zellen gebräuchlichen Differenzierungsbedingungen differenzierten diese zunächst nicht in TH- und ALDH2-immunreaktive Zellen. Erst nach Kultivierung mit Astrozyten, gewonnen aus dem ventralen Mesenzephalon von Mausembryonen (E16), konnte in diesen zerebellären Stammzellen TH und nachfolgend ALDH2 nachgewiesen werden (Wagner et al., 1999). Die Autoren folgerten daraus, dass unbekannte von den Astrozyten sezernierte Faktoren an Nurr1 gebunden und so den dopaminergen Phänotyp in diesen, ursprünglich zerebellären, Stammzellen hervorgerufen haben. Wurden jedoch solche Zellen in das Striatum adulter Mäuse transplantiert, verloren sie ihre TH-Immunreaktivität, wobei keine

weiteren Aussagen bezüglich Überleben, Integration oder weiterer Differenzierung dieser Zellen erfolgten (Wagner et al., 1999). In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmals aufgezeigt werden, dass CSM14.1-Zellen Nurr1-immunreaktiv sind und sie während der Differenzierung, ohne die Ko-Kultivierung mit embryonalen mesenzephalen Astrozyten, in der Lage sind, die dopaminergen Markerproteine TH und ALDH2 zu bilden. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Nestin-immunreaktive mesenzepitale Stammzellen eher in der Lage sind einen maturen dopaminergen Phänotyp auszubilden als z. B. die oben aufgeführten zerebellären Stammzellen der Linie C17.2.

Ein kritischer Punkt bei der Dokumentation der Abfolge neuronaler und dopaminergen Marker während der CSM14.1-Differenzierung in der hier vorliegenden Arbeit ist die Tatsache, dass die Zunahme von NeuN und TH nur mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte. In der Immunzytochemie waren solche Zunahmen, ausgehend von undifferenzierten CSM14.1-Zellen, nicht oder kaum erfassbar. Aufgrund eigener weiterer *in vivo* Untersuchungen war die Spezifität der verwendeten Antikörper gegen NeuN und TH sichergestellt (Haas et al., 2007, 2008). Daher war diese nicht erfassbare NeuN- und TH-Zunahme in den Zellkulturen mittels Immunzytochemie durch verschiedene andere Ursachen bedingt, z. B. könnte der NeuN und TH-Gehalt in den differenzierenden Zellen zu gering für eine immunzytochemische Detektion gewesen sein. Ein weiterer Grund hierfür wäre das Ablösen von ausdifferenzierten viel NeuN oder TH-bildender Zellen wegen der zahlreichen Wasch- und Inkubationsschritte. Diese sind für das immunzytochemische Markierungsverfahren unbedingt notwendig und hierbei werden die Zellkulturen über einen Zeitraum von 24 – 72 Stunden auf einem Schüttler bewegt. Die empfindlichen ausdifferenzierten Zellen haften nur noch mit ihren feinen Ausläufern auf der Unterlage und lösen sich dann, durch Schüttelbewegungen und Verwendung von Detergentien, leicht von der Unterlage ab. Diese Prozedur wird beim Western Blot-Verfahren umgangen, denn dort wird der gesamte Zellrasen nach dem einmaligen Abspülen toter Zellen abgenommen und das Proteinlysate aller verbliebenen Zellen untersucht.

In weiteren Studien wäre es zudem interessant frühere Zeitpunkte während der Differenzierung zu untersuchen. Viele Markerproteine, NSE, NeuN, Nurr1 und TH zeigten innerhalb der ersten drei Tage eine deutliche Zunahme, wohingegen das immortalisierende Onkogenprotein Large-T-Antigen schon nach drei Tagen nicht mehr nachweisbar war. Die hier für CSM14.1-Zellen erbrachten Erkenntnisse bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Zu- oder Abnahme von Markerproteinen dienen nun als Vorlage für weitere Studien. Die Veränderungen bei den weiteren, hier beschriebenen Markerproteinen sind Gegenstand

gegenwärtiger Untersuchungen, in denen auch deutlich kürzere Zeiträume mit einbezogen werden. In diesen, bislang unveröffentlichten, Studien konnten wir inzwischen zeigen, dass das Onkogenprotein Large-T-Antigen schon nach 24 Stunden Kultivierungszeit bei 39° C Umgebungstemperatur und Serumentzug (1% FKS) kaum mehr nachzuweisen ist.

In diesen aktuellen Studien unserer Arbeitsgruppe, die ja auf den hier erbrachten Erkenntnissen beruhen, werden zudem weitere Markerproteine zur Charakterisierung neuronaler Stammzellen und ausdifferenzierter dopaminerge Neurone zur Anwendung gebracht. Als neuer, sehr früh exprimierter Stammzellmarker wurde das Zellkernprotein Nucleostemin beschrieben (Tsai und McKay, 2002). Dieses Protein findet sich in ES-Zellen, in Stammzellen der unterschiedlichsten Gewebe und in einigen Tumorzelllinien. Interessanterweise besitzen proliferierende neurale Stammzellen diesen Kernbestandteil, jedoch ist er nicht mehr auffindbar wenn deren Tochterzellen beginnen eine neuronale oder gliale zelltypspezifische Linie einzuschlagen. Diese Vorläuferzellen sind teilweise noch Nestin-immunreaktiv und proliferieren, jedoch sind dies eben keine Stammzellen mehr. Für eine bessere Charakterisierung sollte daher Nucleostemin bei weiteren Untersuchungen herangezogen werden (Tsai und McKay, 2002). Erste Untersuchungen mit einem von der Firma R&D-Systems kommerziell erhältlichen Antikörper, der gegen Nucleostemin gerichtet ist, zeigten positive Immunreaktionen bei undifferenzierten CSM14.1-Zellen. Wir müssen jedoch die Spezifität dieses Antikörpers noch mit Western Blot-Experimenten und bekannten Positivkontrollen belegen, bevor eindeutigere Aussagen bezüglich des Nucleostemin-Gehaltes in den CSM14.1-Zellen getroffen werden können. Die zeitlichen Verteilungsmuster, speziell im Vergleich zum Nestingehalt, unter Differenzierungsbedingungen werden bei diesen Untersuchungen besonders berücksichtigt werden. Als Marker für ausdifferenzierte dopaminerge Nervenzellen sollten in nachfolgenden Studien zudem, neben den in dieser Studie verwendeten Antikörper gegen TH und ALDH2, Antikörper verwendet werden die sich gegen VMAT2, DAT und den Rezeptorkomplex GDNFR α richten (Perrone-Capano et al., 1999). Der Nachweis von Dopamin in den ausdifferenzierten CSM14.1-Zellen oder dem Zellkulturmedium wäre ein weiterer Belegpunkt für die dopaminerge Differenzierung. Da das Dopamin, unter Verwendung immunzytochemischer- oder Western Blot- Methoden schwer nachzuweisen ist, könnte dies mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) geschehen (Braunewell und Gundelfinger, 1997). Verschiedenste Arbeitsgruppen konnten inzwischen mittels HPLC zeigen, daß ES-Zellen oder neurale Stammzellen nach neuronaler Differenzierung in der Lage sind den Neurotransmitter Dopamin zu synthetisieren (Kim et al., 2002; Barberi et al., 2003; Storch et al., 2003).

Ein weiterer kritischer Punkt bei der Charakterisierung differenzierter Nervenzellen, die aus ES-Zellen oder neuronalen Stammzellen generiert werden, ist ihre sogenannte neuronale „Funktionalität“, die anhand elektrophysiologischer Eigenschaften bestimmt werden kann. Wenige Arbeitsgruppen haben sich bislang mit der elektrophysiologischen Charakterisierung solcher, aus ES-Zellen oder neuronalen Stammzellen „generierter“ Nervenzellen beschäftigt. Inzwischen ist jedoch gut belegt, daß neuronal ausdifferenzierte Stammzellabkömmlinge *in vitro* (Ehrlich et al., 2001; Song et al., 2002; Storch et al., 2003) und *in vivo* nach Transplantation in das ZNS (Auerbach et al., 2000; Englund et al., 2002c) einen elektrophysiologisch maturen neuronalen Phänotypen ausbilden können. Diese Befunde wurden auch für ausdifferenzierende ES-Zellen *in vitro* und *in vivo* nach Transplantation erbracht (Arnhold et al., 2000; Kim et al., 2002; Barberi et al., 2003). Eine solche Charakterisierung war nicht Fragestellung der hier vorliegenden Dissertation, jedoch wäre diese eine interessante Aufgabe für zukünftige Studien. Hierbei müssten einerseits differenzierende mit undifferenzierten CSM14.1-Zellen bezüglich Ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften *in vitro* untereinander und zuzüglich mit den Eigenschaften dopaminergener Neurone der unterschiedlichsten Differenzierungsstadien *in vivo* verglichen werden. Diese sicher sehr aufwendigen Arbeiten würden die Kooperation mit Arbeitsgruppen, die über die notwendigen technischen und methodischen Voraussetzungen verfügen, erfordern. Die hierfür erbrachten Vorarbeiten bei der Erstellung der Differenzierungsprotokolle, der morphologischen und phänotypischen Charakterisierung der CSM14.1-Zellen könnten nun herangezogen werden, um morphologische Veränderungen mit dem elektrophysiologischen Korrelat zu vergleichen.

Ein weiterer aussichtsreicher Ansatz für weitere *in vitro* Studien ist die Supplementierung des Kultivierungsmediums mit Neurotrophen und sogenannten neuropoetischen Zytokinen, um die Ausbeute an dopaminergen Zellen zu erhöhen. In einer Reihe von Studien wurde die verbesserte Ausdifferenzierung mesenzephaler Progenitoren in dopaminerge Nervenzellen unter Verwendung eines solchen Differenzierungscocktails dokumentiert (Ling et al., 1998; Potter et al., 1999; Carvey et al., 2001; Storch et al., 2003). Neben GDNF, dessen neurotrophe Eigenschaften auf dopaminerge Nervenzellen schon länger bekannt waren (Lin et al., 1993; Beck et al., 1995; Unsicker et al., 1998; Bohn, 1999), waren in dem oben beschrieben Supplement noch die Zytokinderivate Interleukin- α -1 (IL- α -1) und Interleukin-11 (IL-11) enthalten. Bislang ist nur bekannt, dass IL- α -1 und IL-11 in der Lage sind dopaminerge Progenitoren mit hoher Effizienz in dopaminerge Neurone zu konvertieren (Ling et al., 1998; Potter et al., 1999; Carvey et al., 2001; Storch et al., 2003). Die Mechanismen, mit denen IL-

α -1 und IL-11 dies bewirken, sind allerdings noch nicht bekannt. Laufende Studien unserer Arbeitsgruppe sollten zeigen, ob sich eine effizientere dopaminerge Differenzierung der CSM14.1-Zellen durch Supplementierung mit einem, GDNF-, IL- α -1- und IL-11-enthaltenden, Cocktail durchführen lässt.

Eine verstärkte Aktivierung von Nurr1 wäre eine weitere Möglichkeit die dopaminerge Differenzierung der CSM14.1-Zellen zu induzieren und intensivieren. Aufgrund der, bislang jedoch nicht genau bekannten Bindungspartner von Nurr1, waren solche Studien an den CSM14.1-Zellen nicht durchführbar. Kürzlich konnte eine französische Arbeitsgruppe die in dieser vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde verifizieren und aufzeigen, dass CSM14.1-Zellen einen hohen Nurr1 mRNA-Gehalt besitzen (Sacchetti et al., 2006). Weiterhin, konnte mittels eines Luciferase-Reporter Assays die Transkription der Nurr1 mRNA zu einem funktionellen Protein nachgewiesen werden und basierend auf dieser Methode einige mögliche physiologische Reaktionspartner von Nurr1 ermittelt werden (Sacchetti et al., 2006). Leider erfolgte in dieser Studie keine Untersuchung über mögliche Auswirkungen dieser Liganden auf eine dopaminerge Differenzierung der CSM14.1-Zellen (Sacchetti et al., 2006). Daher kann über deren Effekte nur spekuliert werden, solange entsprechende Experimente ausstehen.

4.1.4 Zusammenfassung der *in vitro* Befunde

Bezüglich der *in vitro* Charakterisierung der CSM14.1-Zellen lässt sich folgendes zusammenfassen: Undifferenzierte CSM14.1-Zellen zeigen aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate und ihrer Nestin-Immunreaktivität typische Eigenschaften neuraler Stammzellen. Unter Differenzierungsbedingungen verlieren diese Zellen ihre Nestin-Immunreaktivität, das immortalisierende Onkogenprotein Large-T-Antigen ist nicht mehr nachweisbar, und es kommt zu einem Anstieg im Gehalt allgemeiner neuronaler Marker (NSE, MAP5, NF200 und NeuN), dopaminerger Progenitoren (Nurr1) und letztendlich maturer dopaminerger Marker (TH und ALDH2). Das Fehlen einer glialen Differenzierung *in vitro* lässt sich durch den geringen endogenen CNTF-Gehalt erklären.

CSM14.1-Zellen lassen sich nahezu unbegrenzt vermehren und differenzieren *in vitro* in den benötigten dopaminergen Zelltyp. Alle diese Punkte machen die CSM14.1-Zellen für eine experimentelle Zellersatztherapie in Tiermodellen des Morbus Parkinson besonders interessant.

4.2 Charakterisierung der CSM14.1-Zellen *in vivo* nach Transplantation in das Corpus striatum von Hemiparkinson-Ratten und ihr Einfluß auf Apomorphin-induzierte Rotationen

Aufgrund der *in vitro* Befunde bezüglich der neuronalen und dopaminergen Differenzierung der CSM14.1-Zellen, die sich als aussichtsreiche Quelle für die experimentelle Transplantation herausstellten, wurden diese Zellen bilateral in den Caudatus-Putamen-Komplex der dopaminerg deafferentierten (läsionierten) und der intakten Kontrollhemisphäre transplantiert. In den folgenden drei Monaten wurde in diesen Tieren, sowie in scheintransplantierten Kontrolltieren, das Apomorphin-induzierte kontralaterale Drehverhalten als Maß für diese therapeutische Behandlung ermittelt. Nach Abschluß dieser Tests wurde die Morphologie der läsionierten und transplantierten Hirngebiete mit histologischen und immunhistochemischen Methoden untersucht. Hierbei rückte, neben den Veränderungen im dopaminerg deafferentierten Wirtsgehirn, das Überleben, die Migration, die Differenzierung und eventuelle Integration der transplantierten CSM14.1-Zellen in den Blickpunkt.

4.2.1 Validität der PKH26-Markierung

Das Auffinden und Charakterisieren von Spenderzellen oder des Spendergewebes im Wirtsorganismus ist hierbei einer der kritischsten Punkte bei Transplantationsstudien. Schon im ausgehenden 19. Jahrhundert und zu Beginn des 20. Jahrhunderts fanden erste Neurotransplantationen statt (Thompson, 1890; Dunn, 1917), jedoch waren diese ersten Beschreibungen aufgrund der damaligen methodischen Beschränkungen sehr vage. Eine sehr elegante frühe Methode, z. B. durch die Transplantation von pigmentiertem neuralen Gewebe in unpigmentierte Molchlarven, ermöglichte es genauere Aussagen über die Morphologie und die Wechselwirkungen zwischen Spender- und Empfängergerewebe zu tätigen (Spemann und Mangold, 1924; Spemann, 1936). Die ebenfalls artübergreifende Xenotransplantation von Hühnergerewebe (*Gallus gallus*) in Wachtelembryonen (*Coturnix coturnix*) oder vice versa ist ebenfalls eine ältere und adäquate Charakterisierungsmethode, da sich die Zellkerne beider Spezies morphologisch und bezüglich der Kernkörperchenanzahl unterscheiden (Le Douarin, 1982, 2005). Bei der allogenen Transplantation von Rattenzellen in das Gehirn der Laborratte kann man auf diese Eigenschaften nicht zurückgreifen und benötigt andere Markierungsmethoden. Daher wurden die CSM14.1-Zellen vor der Transplantation mit dem lipophilen rotfluoreszierenden Farbstoff PKH26 beladen (Horan und Slezak, 1989). In eigenen Vorexperimenten wurde diese Markierungsmethode für neurale Zellen, die aus

Primärkulturen gewonnen wurden, in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Haas et al., 2000). Wir konnten zeigen, dass bis zu 100% der Zellen vor der Transplantation *in vitro* markiert werden und dieser Farbstoff zudem keine toxische Wirkung besitzt, da sich die Zellen nach der Markierung beim weiteren Kultivieren nur durch ihre deutliche Fluoreszenz von unbehandelten Kulturen unterscheiden. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass eine 100%ige Anzahl PKH26-markierter Zellen bis dahin sonst nur mit der radioaktiven [³H]-Thymidinmarkierung zu erreichen war (Lundberg et al., 1997). Zum Zeitpunkt der durchgeführten Experimente war diese Methode der Goldstandard zur Zellmarkierung (Lundberg et al., 1997). Aufgrund des Umgangs mit radioaktiven Substanzen benötigt man jedoch spezielle räumliche Gegebenheiten in Tierställen und Laboren. Diese Methode ist zudem sehr arbeits- und zeitaufwändig und ist mit manchen immunhistochemischen Verfahren zur Zellcharakterisierung, aufgrund der langen Inkubationszeiten, inkompatibel (Lundberg et al., 1997). Die nahezu vollständige PKH26-Markierung der Zellpopulation ist auch deutlich effektiver als die 80% markierter Zellen die mit 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) erreicht werden können (Lundberg et al., 1997; Fricker et al., 1999, Englund et al., 2002b) und sehr viel effektiver als die 10-20% bei Transfektion der zu transplantierenden Zellen mit Reportergenen wie LacZ (β -Galactosidase-Gen) oder GFP (grün fluoreszierendes Protein) mittels der zum damaligen Zeitpunkt üblichen Transfektionsmethoden (Onifer et al., 1993; Shihabuddin et al., 1995; Lai et al., 1999; Englund et al., 2002b).

Der weitere Vorteil der PKH26-Markierung besteht in der stabilen Bindung des rotfluoreszierenden Farbstoffs an die Zellmembran, die eine langfristige Identifizierung von Zellen nach Transplantation ermöglicht (Horan und Slezak, 1989). In der Literatur wurden bislang Nachweiszeiten von bis zu vier Monaten, z. B. für das hämatopoetische System, beschrieben (Young und Hay, 1995; Fox et al., 1999). Bei intrazerebralen Transplantationen wurden in eigenen Vorstudien (Haas et al., 2000) und auch von anderen Gruppen (Modo et al., 2000a; Bantubungi et al., 2008) ähnliche Zeiträume untersucht und die PKH26-Markierung erfolgreich angewandt. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Proteinmarkern wie GFP oder β -Galaktosidase besonders in langzeitigen Experimenten recht variabel, bzw. nicht mehr auffindbar (Lundberg et al., 1996; Gingrich und Roder, 1998). Dementsprechend konnten in dieser Studie die PKH26-markierten CSM14.1-Zellen 3 Monate nach intrastriataler Transplantation anhand ihrer roten Fluoreszenz sicher identifiziert werden und, da die kryoprotektierten Hirnschnitte nach der Freeze-Thaw Methode aufgearbeitet wurden (Haas et al., 2000), weiter immunhistochemisch charakterisiert werden. Neben der, zuvor schon diskutierten Nicht-Toxizität von PKH26 *in vitro*, hat diese Markierung anscheinend

auch nicht das *in vivo* Verhalten nach Transplantation beeinträchtigt, da die CSM14.1-Zellen 300-400 µm weit entfernt vom Transplantationskanal aufgefunden werden konnten. Zudem, differenzierten etliche der transplantierten Zellen *in vivo* in Glia- oder Nervenzellen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden anderer Arbeitsgruppen überein, die nach intrazerebraler Transplantation von PKH26-markierten Zellen, in verschiedenen experimentellen Modellen, eine extensive Migration dieser Zellen zeigen und die Differenzierung solcher markierter Zellen mittels immunhistochemischen Färbungen für gliale und neuronale Marker nachweisen konnten (Modo et al., 2002a, b, c; Peng et al., 2002). In einer dieser Arbeiten (Modo et al., 2002a) zeigte die Kombination von PKH26 und einem zusätzlichen Markierungsreagenz perfekte Übereinstimmungen, was ebenfalls auf die Spezifität der PKH26-Markierung hindeutet (Modo et al., 2002a). Bei dieser Studie wurden die Zellen vor Transplantation mit dem intrazellulären Kontrastmittel Gadolinium Rhodamin Dextran (GRID) in Verbindung mit PKH26 beladen. Dieses Kontrastmittel ist im lebenden Tier mittels hochauflösendem MRT (Magnetresonanztomographie) sowie in Gewebsschnitten unter dem Fluoreszenzmikroskop nachweisbar. Die Verteilung GRID-markierter Zellen war dadurch am lebenden Tier möglich und entsprach später auch der Verteilung GRID-markierter Zellen in histologischen Präparaten desselben Tieres. Wichtiger jedoch war die Tatsache, dass die Verteilung der PKH26-markierten Zellen der Lokalisation und Verteilung der GRID-markierten Zellen entsprach (Modo et al., 2002a).

Ein weiterer Nachweis für die Verlässlichkeit der Zellmarkierung unter Verwendung von PKH26 lieferte die Arbeitsgruppe um Weiss et al. (2003). Hier wurden PKH26-markierte Zellen durch Inkubation in einem Ultraschallbad abgetötet und das hierbei entstandene Lysat in das Gehirn injiziert. Bei der histologischen Untersuchung der Gehirne, ein oder zwei Wochen nach Injektion dieses Zelldebris, waren keine PKH26-markierten Zellen im Wirtsgehirn auffindbar. Damit lässt sich zeigen, dass PKH26-markierte Zellfragmente die endogenen Glia- und Nervenzellen der Wirtsgehirne nicht anfärben. Dies beruht wohl auf dem enzymatischen Verdau dieses ursprünglich rotfluoreszierenden Farbstoffs durch phagozytierenden Zellen im Wirtsgewebe (Weiss et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden zudem von einer weiteren Arbeitsgruppe publiziert (Bantubungi et al., 2008). In dieser Arbeit wurden PKH26-markierte mesenchymale und neurale Stammzellen in das zuvor mit Quinolinsäure läsionierte Gehirn von Ratten transplantiert. Bei zuvor abgetöteten und danach injizierten Zelllysaten - als Kontrollinjektionen - befanden sich in diesen Gehirnen, nach Aufarbeitung, ebenfalls keine PKH26-enthaltenden Zellen (Bantubungi et al., 2008).

Aufgrund der oben angeführten Befunde eigener Arbeiten und der anderer Gruppen kann geschlossen werden, dass PKH26 als nichttoxischer membranständiger Marker für die Detektion und weitergehende immunhistochemische Charakterisierung intrazerebral transplanterter Zellen auch gegenwärtig noch geeignet ist (Haas et al., 2007, 2008; Bantubungi et al., 2008).

4.2.2 Migration, Integration und Tumorigenität der CSM14.1-Zellen nach intrastriataler Transplantation

Aufgrund der histologischen Befunde dieser Arbeit ist davon auszugehen, dass die in das Striatum injizierten PKH26-markierten CSM14.1-Zellen 3 Monate nach Injektion überlebt haben. Die Zellen migrierten, vom Injektionskanal ausgehend, ca. 300-400 µm weit in das umgebende Parenchym. Eine genaue stereologische Quantifizierung der überlebenden transplantierten CSM14.1-Zellen wurde aufgrund methodischer Probleme nicht durchgeführt. Da die Zellen im Injektionskanal sehr dicht gepackte Konglomerate bildeten, konnten einzelne Zellen in diesen Regionen nicht voneinander unterschieden werden und ließen eine Auszählung an den 30 µm dicken Fluoreszenzmarkierten Präparaten nicht zu. Ähnliche Schwierigkeiten beim Auszählen PKH26-markierter intrazerebral injizierter ES-Zellen aus Mäusen wurden zuvor auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben (Baier et al., 2004). Diese ES-Zellen migrierten ebenfalls nur in geringem Maß in das umgebende Hirngewebe und bildeten dichte Cluster im Injektionskanal (Baier et al., 2004). In der hier vorliegenden Arbeit wird aufgrund der visuellen Einschätzung der untersuchten Hirnschnitte vermutet, dass die Anzahl der aufgefundenen CSM14.1-Zellen ähnlich der Ausgangszahl der zuvor injizierten Zellen war. Im Vergleich mit der bisherigen Transplantation von postmitotischen fetalen dopaminergen Progenitoren mit Überlebensraten von ca. 5-10% wäre dies eine sehr hohe Überlebensrate (Hagell und Brundin, 2001; Nikkhah, 2005). Für diese hohe Anzahl gibt es jedoch einige mögliche Erklärungen. Vorherige Transplantationsexperimente mit neuronalen Zelllinien, die ebenfalls mittels Expression des Onkogenproteins Large-T-Antigen immortalisiert wurden, zeigten, dass diese Zellen in den ersten Tagen nach Injektion noch zwei bis drei Mitosen durchliefen (Lundberg et al., 1996; 1997; Olsson et al., 1997). Dadurch war die Anzahl überlebender Zellen, auch wenn einige der transplantierten Zellen während der ischämischen Phase starben, sogar höher als die der zunächst injizierten Zellsuspension (Lundberg et al., 1997). Diese *in vivo* Beobachtungen (Lundberg et al., 1996, 1997; Olsson et al., 1997) stimmen mit den in dieser Dissertation vorgestellten, sowie auch von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten (Frederiksen et al., 1988; Whittemore und White, 1993) *in*

vitro Befunden überein, die zeigen, dass das immortalisierende Onkogenprotein Large-T-Antigen in den immortalisierten Zellen nach 3-4 Tagen in Zellkultur bei nicht permissiver Temperatur nicht mehr detektierbar ist und dass die Zellproliferation um diese Zeitpunkte stark abnimmt (Jat und Sharp, 1989, Cattaneo und Conti, 1998; Haas und Wree, 2002). Von Cattaneo et al. (1994) gibt es zudem *in vivo* Befunde, die zeigen, dass das Onkogenprotein Large-T-Antigen in ST14A-Zellen kurz nach intrazerebraler Transplantation nicht mehr nachweisbar ist.

Im Zusammenhang mit dem Proliferationsstopp der immortalisierten CSM14.1-Zellen nach intrazerebraler Transplantation ist ein wichtiger zu berücksichtigender Aspekt die Unbedenklichkeit bezüglich einer eventuellen Tumorbildung. Es besteht ja hierbei die theoretisch mögliche Gefahr einer malignen Transformation der transplantierten Zellen, welche durch eine genetische Veränderung immortalisiert wurden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde nach 3 Monaten Überlebenszeit in keinem der Tiere ein Tumor in den histologischen Präparaten nachgewiesen. Dies bestätigt zudem weitere Befunde unserer Arbeitsgruppe, bei denen CSM14.1-Zellen heterotop in das CPu neonataler Ratten oder orthotop in die Substantia nigra adulter Ratten transplantiert wurden und nach 6, bzw. 12 Wochen Überlebenszeit ebenfalls keine Tumore bei diesen Tieren auffindbar waren (Haas et al., 2007, 2008). Eine weitere Reihe von Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten auf, dass transplantierte Zellen, die mittels der Expression des Large-T-Antigens immortalisiert wurden, nach bis zu dreizehn Monaten *in vivo* ebenfalls keine Tumore bilden (Anton et al., 1994; 1995; Lundberg et al., 1997, 1998; Clarkson et al., 1998). Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass solche temperatursensitiv immortalisierte Zelllinien ohne signifikante Gefahr von Tumorbildung transplantiert werden können. Dies lässt sich zum einen durch die Herunterregulierung des Large-T-Antigens bei 39° C Umgebungstemperatur erklären (Frederiksen et al., 1988; Whittemore und White, 1993; Cattaneo et al., 1994; La Rosa et al., 1998; Haas und Wree, 2002; Haas et al., 2007, 2008) und zum anderen durch das Vorhandensein von hirnspezifischen Large-T-Antigen-hemmenden Faktoren, die die Bildung dieses Onkogenproteins und damit unkontrollierte Zellteilungen der transplantierten Zellen inhibieren (Whittemore und White, 1993; La Rosa et al., 1998).

Das Migrations- und Integrationsverhalten von transplantierten Zellen in das umgebende Hirnparenchym hängt sowohl von den Eigenschaften der injizierten Zellen wie auch von denen der Gewebeumgebung im Wirtsgehirn ab. Viele bekannte aber bislang auch unbekannte Faktoren spielen hierbei eine wichtige Rolle (Nikkhah, 2005). Darunter sind das Entwicklungsstadiums des Wirtsorganismus (embryonal, neonatal, juvenil oder adult), die

Besonderheit der Hirnregion, wohin die Zellen transplantiert werden (intakt oder läsioniert, neurogene oder nicht-neurogene Region), die Übereinstimmung zwischen der Region aus welcher die Zellen ursprünglich stammen und ihrem Implantationsort (orthotopes oder heterotopes Transplantat), Xeno- (Speziesverschieden) oder Allotransplantate (Costantini und Isacson, 1999; Nikkhah, 2005), sowie der Vorgehensweise bei der Transplantation selbst (Makroinjektion oder atraumatischere Mikroinjektionsmethoden).

Als Beispiel für unterschiedliches Migrationsverhalten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium der Wirtstiere gibt es schon seit längerem Literaturbefunde verschiedener Arbeitsgruppen. Primäre embryonale striatale Zellen, die in das embryonale Ventrikelsystem des Gehirns oder das neonatale Striatum selbst injiziert wurden, wanderten extensiv entlang der Capsula interna in verschiedene Hirngebiete oder in das gesamte Striatum ein (Campbell et al., 1995; Olsson et al., 1997, 1998). Embryonale Vorläuferzellen aus derselben Region verblieben aber, nach Injektion in das adulte intakte oder läsionierte Striatum am Injektionsort und zeigten nahezu kein Migrationsverhalten (Victorin et al., 1990; Labandeira-Garcia et al., 1991). Ähnliche Befunde gibt es auch für Transplantationsstudien mit mesenzephalen dopaminergen Progenitoren, die in das läsionierte oder intakte Striatum neonataler oder adulter Ratten injiziert wurden (Nikkhah et al., 1995; Costantini und Isacson, 1999; Nikkhah, 2005). Embryonale striatale Progenitoren der Zelllinie ST14A fanden sich, nach Transplantation in das embryonale Ventrikelsystem, fünf Tage nach Injektion in weiten Bereichen des ZNS (Ventrikel, Kortex, Striatum, Thalamus und Cerebellum) (Cattaneo et al., 1994). Nach Transplantation in das adulte Striatum migrierten ST14A-Zellen nur in das umgebende Striatum und den Kortex aus (Lundberg et al., 1997). In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studien mit PKH26-markierten ST14A-Zellen, die in das adulte Striatum der Ratte injiziert wurden, führten zu ähnlichen Ergebnissen wie von Lundberg et al. (1997) beschrieben. Die PKH26-enthaltenden Zellen migrierten ca. 1400-1800 µm in das Striatum und den Kortex ein, wobei die größte Strecke entlang des Corpus callosums führte (Haas et al., 1999). Diese Ergebnisse der orthotopen Transplantation einer striatalen Zelllinie sind von besonderem Interesse für den Vergleich der heterotopen Transplantation von mesenzephalen Progenitoren der Linie CSM14.1 wie nachfolgend weiter aufgeführt.

Bezüglich des Migrationsverhaltens von CSM14.1-Zellen nach Transplantation in das adulte Striatum waren aus bisherigen Literaturbefunden keine detaillierten Angaben aufzufinden (Anton et al., 1994, 1995). In der hier vorliegenden Arbeit konnte immerhin ein Auswandern aus dem Injektionskanal 300-400 µm weit in das umgebende Hirngewebe beobachtet werden. Interessanterweise ist diese Entfernung jedoch wesentlich geringer als bei der orthotopen

Transplantation von CSM14.1-Zellen in die intakte oder 6-OHDA-läsionierte Substantia nigra von adulten Ratten (Haas et al., 2008). In dieser Umgebung, ihrem eigentlichen Herkunftsort, migrierten CSM14.1-Zellen bis zu 1400 µm in das Wirtsgehirn. Nach Transplantation in das neonatale 6-OHDA-läsionierte Striatum verhielten sich CSM14.1-Zellen anders als im adulten Gehirn und zeigten hierbei ebenfalls ein immenses Wanderverhalten mit Entfernungen von ca. 800-1100 µm aus dem Injektionskanal heraus (Haas et al., 2007). Wie zuvor erwähnt sind für diese unterschiedlichen Migrationsverhalten sicherlich viele Faktoren verantwortlich. Bei unseren eigenen Studien wurden im Falle der adulten striatalen und nigralen CSM14.1-Transplantation jeweils die, damals noch standardmäßige, traumatischere Form der Makroinjektion verwendet. Hierbei kamen jeweils Hamilton-Kanülen mit einem Außendurchmesser von ca. 0,4 mm zum Einsatz. Da sich die CSM14.1-Zellen wie auch die intrastriatal transplantierten ST14A-Zellen hierbei jedoch unterschiedlichst verhielten ist dies als Ursache für die geringe Migrationskapazität der CSM14.1-Zellen im Striatum zu vernachlässigen (Haas et al., 1999, 2007, 2008). Viel eher kommen hierbei der vom Wirtsgewebe gebildeten Komponenten der EZM oder der unterschiedlich hohe Gehalt gebildeter Neurotrophine (in Abhängigkeit vom Alter, bzw. der Region) in Frage. Hierbei kann den endogenen Astrozyten im Hirngewebe eine entscheidende Rolle zugewiesen werden (Krobert et al., 1997; Pierret et al., 1998; Reuss und Unsicker, 2000; Chadi und Gomide, 2004; Joosten et al., 2004). Es ist bekannt, dass Astrozyten im adulten Gehirn mehr wachstumshemmende Substanzen, wie z. B. Chondroitin-6-sulfat, Tenascin und verschiedene Proteoglykane bilden, womit eventuell erklärt werden kann, warum Astrozyten die Integration von transplantierten Zellen im adulten Gehirn weniger unterstützen als sie dies beim Neonatalen tun (Krobert et al., 1997). Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass das neonatale Hirn mehr wachstumsfördernde EZM-Komponenten, wie Laminin, Kollagen und Fibronektin, enthält (Mendez et al., 1996; Bentlage et al., 1999). Das bessere Auswachsen und Überleben der injizierten CSM14.1-Zellen im neonatalen Striatum gegenüber dem Adulten könnte auch durch neurotrophe Faktoren wie FGF-2 bedingt sein. FGF-2 wird ebenfalls von Astrozyten gebildet und fördert das Überleben dopaminergischer Neurone während der Entwicklung (Reuss und Unsicker, 2001). FGF-2 wird auch vermehrt in der Substantia nigra adulter Ratten gebildet (Claus et al., 2004), was das gute Migrationsverhalten nach Transplantation der CSM14.1-Zellen in die adulte Substantia nigra mitunter erklären könnte. Unterschiede bezüglich des Gehalts der EZM-Komponenten oder der Neurotrophinmuster im adulten Striatum und der Substantia nigra sind noch weitgehend unbekannt und Gegenstand momentaner Forschungsvorhaben unserer Arbeitsgruppe. Es kann davon ausgegangen werden,

dass hier ein Schlüsselansatz für zukünftige erfolgreichere Transplantationsstudien, verbunden mit einem besseren Auswachsen injizierter Zellen, zu finden ist.

4.2.3 *In vivo* Differenzierung der CSM14.1-Zellen

Zusätzlich zu der *in vitro* Charakterisierung der CSM14.1-Zellen war es eine Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit, das *in vivo* Differenzierungspotential dieser Zelllinie nach bilateraler Transplantation in das intakte und 6-OHDA-läsionierte Striatum adulter Ratten zu untersuchen. Aufgrund der *in vitro* Untersuchungen, mittels immunzytochemischer und Western Blot Methoden, besitzen diese Zellen ein neurogenes Potential und bilden keine Gliamarker (Haas und Wree, 2002; Vernon und Griffin, 2005). Da aber aus der Literatur bekannt ist, dass solche immortalisierten Progenitoren sich nach Transplantation plastischer verhalten und ein breiteres Phänotyppotential als *in vitro* aufweisen (Shihabuddin et al., 1995; Lundberg und Björklund, 1996; Lundberg et al., 1997, Cattaneo und Conti, 1998; Whittemore und Onifer, 2000), und da bei den bisher wenigen publizierten Transplantationsstudien (Anton et al., 1994, 1995) keine *in vivo* Phänotypen der transplantierten Zellen untersucht wurden, wurde in dieser Arbeit eingehender den *in vivo* Eigenschaften der CSM14.1-Zellen nach intrastriataler Transplantation nachgegangen.

In allen transplantierten Tieren wurden drei Populationen von PKH26-markierten CSM14.1-Zellen nachgewiesen: (1) ein großer Anteil Zellen, die mit dem Gliamarker GFAP kolokalisiert waren, (2) ein sehr geringer Anteil, die sich in neuronale Richtung differenziert haben und (3) eine Gruppe, nahezu die Hälfte aller transplantierten Zellen, die mit keinem der untersuchten Marker charakterisiert werden konnten. Wenn man diese drei Gruppen von Zellen, die in das Striatum bei nicht permissiver Gehirntemperatur (Schröder, 1986; Gordon, 1990) injiziert wurden und die dort die entsprechenden Bedingungen hatten sich zu differenzieren, genauer betrachtet, fallen die folgenden Besonderheiten auf.

Der Teil der Zellen, die mit dem astrozytären Marker GFAP kolokalisiert gefunden wurden, waren meist Zellen, die im Injektionskanal lagen, wo auch viele reaktive Astrozyten des Wirtes zu finden waren, oder dicht in der Nähe an Blutgefäßen zu finden. Von anderen Arbeitsgruppen und eigenen Arbeiten ist bekannt, dass sich in der Region des Einstichkanals ein endogener intensiver CNTF-Gehalt nachweisen lässt (Asada et al., 1995; Haas et al., 2004, 2008). Diese Befunde legen nahe, dass die *in situ* CNTF-Expression zu der glialen Differenzierung der transplantierten CSM14.1-Zellen und der endogenen reaktiven Gliose wesentlich beigetragen hat, da solche Effekte dieses Neurotrophins schon mehrmals beschrieben wurden (Levison et al., 1996; Lisosovski et al., 1997; Lee et al., 2000) und

zudem CNTF in *in vitro* Protokollen eine gezielte gliale Differenzierung von Stammzellen induziert (Sun et al., 2001; Barberi et al., 2003). Diese Ergebnisse stimmen auch mit einer anderen Studie überein, wo eine gliale Differenzierung von immortalisierten ST14A-Zellen im und in der Nähe des Injektionskanals gezeigt werden konnte (Lundberg et al., 1996). Interessanterweise handelte es sich ST14A-Zellen um Progenitoren, die sich *in vitro* ausschließlich in neuronale Richtung differenzieren (Cattaneo und Conti, 1998). Nicht zu vergessen ist auch die Tatsache, dass es sich beim adulten Striatum um eine nicht-neurogene Umgebung handelt, wo ähnlich wie bei anderen nicht-neurogenen Regionen wie z. B. Rückenmark, Cerebellum oder Substantia nigra eher eine gliale Differenzierung der transplantierten Zellen induziert wird (Svendsen et al., 1996, 1997; Fricker et al., 1999; Rubio et al., 2000; Cao et al., 2002; Lie et al., 2002). Wie bezüglich der Migration beschrieben versucht man dies mit dem Vorhandensein von weitgehend unbekannten restriktiven Signalen und Faktoren zu erklären, die in dem adulten intakten bzw. läsionierten ZNS dazu in noch größeren Mengen vorhanden sein sollen, die eine neuronale Differenzierung in diesen Hirngebieten verhindern (Keirstead, 2001; Cao et al., 2002).

Der Anteil an neuronal differenzierten CSM14.1-Zellen *in vivo*, nach Transplantation in das adulte Striatum, war sehr gering. Nur vereinzelt waren PKH26-markierte Zellen, die den postmitotischen Nervenzellmarker NF200 enthielten, auffindbar. Zudem waren bei allen striatal transplantierten adulten Tiere keine NeuN- oder TH-immunreaktiven CSM14.1-Zellen detektierbar. Ein Unterschied bezüglich intakter oder läsionierter Hemisphäre konnte nicht aufgezeigt werden. Der genaue Phänotyp dieser NF200-immunreaktiven Zellen bleibt ungeklärt, da die Zellen *in vivo* TH-negativ waren und somit also keine katecholaminerge Differenzierung durchführten. Diese Befunde stimmen mit denen von Anton et al. (1994, 1995), die bei in das Striatum transplantierten und genetisch nicht veränderten CSM14.1-Zellen ebenfalls keine TH-Immunreaktivität nachweisen konnten. Allerdings konnte bei intranigralen Transplantationen der CSM14.1-Zellen eine respektable Anzahl NeuN-immunreaktiver CSM14.1-Zellen, ausserhalb des Injektionskanals, nachgewiesen werden (Haas et al., 2008), jedoch waren diese ebenfalls nicht TH-immunreaktiv. Im Gegensatz hierzu fanden sich nach neonataler intrastriataler Transplantation NeuN- und TH-immunreaktive CSM14.1-Zellen, die zudem in der Lage waren den Gehalt an TH im zuvor 6-OHDA-läsionierten Striatum wieder auf Werte zu erhöhen, wie sie bei intakten Kontrolltieren aufgefunden werden (Haas et al., 2007). Hierdurch wird nochmals deutlich, dass die CSM14.1-Zellen *in vitro* und *in vivo*, je nach Transplantations-Lokus und Zeitpunkt, imstande sind in dopaminerge Nervenzellen zu differenzieren. Weitere neuronale Marker, um z. B.

GABAerge oder cholinerge Neurone zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit nicht untersucht und weitere Aussagen können daher nicht getroffen werden.

Es war auffällig, dass eine grössere Menge (ca. die Hälfte) der PKH26-markierten Zellen mit keinem der untersuchten Marker charakterisierbar war. Unter diesen Zellen gabe es welche, deren Zelleib ausdifferenzierten Nerven- oder Gliazellen ähnelte, die aber aus technischen Gründen, z. B. aufgrund zu geringer Proteingehalte (unterhalb der Nachweisgrenze), mittels immunhistochemischer Techniken nicht charakterisierbar waren. Eine andere Fraktion dieser dritten Gruppe von Zellen, die zudem den überwiegenden Teil ausmachte, besaß eine undifferenzierte Morphologie (klein und meist rundlich). Solche Zellen fanden sich an unterschiedlichsten Orten: einige lagen im Injektionskanal, befanden sich im Striatum oder sie gehörten zu der Zellgruppe, die am weitesten entlang des Corpus callosum migrierte und dabei in einer reihenförmigen Anordnung absetzten. Da in dieser Arbeit keine Antikörpermarkierungen gegen oligodendrogliale Epitope durchgeführt wurden, lässt sich nicht bestimmen, ob es sich bei den Zellen im Corpus callosum um Oligodendrozyten handelte, die eine ähnliche Morphologie und perlschnurartige Aufreihung der aufeinanderfolgenden Zelleiber aufweisen. Dies sollte in zukünftigen Studien eingehender untersucht werden. In einer weiteren Reihe von Studien wurde ebenfalls eine grosse Anzahl von nicht charakterisierbaren oder undifferenzierten Zellen beobachtet (Renfranz et al., 1991; Shihabuddin et al., 1995; Lundberg et al., 1996, 1997, Hovakimyan et al., 2006; Miljan et al., 2008). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass wahrscheinlich ein Teil dieser Zellen nach Transplantation in das Gehirn in einen stummen stammzellähnlichen Zustand gerät und in diesem über Monate hinweg verbleibt (Renfranz et al., 1991; Snyder 1994; Miljan et al., 2008). Von Shihabuddin et al. (1995) wurde für die Zelllinie RN33B zudem beschrieben, dass die Anzahl überlebender undifferenzierter Zellen bei längeren Überlebenszeiten abnimmt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Zellen, die nicht differenzieren, mit der Zeit verloren gehen, möglicherweise wegen des Fehlens trophischer Faktoren (Whittemore und White, 1993).

4.2.4 Einfluß der Transplantation auf Apomorphin-induzierte Rotationen im unilateralen 6-OHDA-Läsionsmodell der Ratte

Bei den Fragestellungen dieser Arbeit sollte zuletzt der Frage nachgegangen werden, ob die transplantierten CSM14.1-Zellen einen Einfluß auf das Apomorphin-induzierte Rotationsverhalten der unilateral 6-OHDA-läsionierten Tiere ausüben. Diese Rotationen wurden zudem bei ebenfalls unilateral dopaminerg deafferentierten und anschließend

scheintransplantierten Kontrolltieren untersucht und die Veränderungen der Rotationen miteinander verglichen. Wie schon in der Einleitung erwähnt (Kap. 1.5), ist das unilaterale 6-OHDA-Läsionsmodell der Ratte eines der wichtigsten Hilfsmittel der Parkinson-Forschung zur experimentellen Entwicklung von Behandlungsstrategien (Ungerstedt, 1968; Ungerstedt und Arbuthnott, 1970; Schwarting und Huston, 1996a, b; Schober, 2004). Die Injektion von 6-OHDA in das MVB führt schon nach 12 h zu neurodegenerativen Veränderungen in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra (Jeon et al., 1995) und nach 2 Tagen sind im histologischen Bild eine extensive neuronale Nekrose mit zugehöriger Gliose zu finden (Maler et al., 1973). Nach 4-6 Tagen ist der Höhepunkt des Zelluntergangs zu beobachten, in den folgenden 2 Wochen geht dieser dann zurück, wobei dann letztendlich über 97% der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra abgestorben sind (Jeon et al., 1995). Die intraperitoneale Gabe von Desipramin, ein Hemmstoff des hochaffinen Noradrenalin-Transporters, 30 min vor der 6-OHDA-Injektion bewirkt, dass nur dopaminerge Neurone, nicht aber andere katecholaminerge Nervenzellen absterben (Breese und Traylor, 1970). Die Degenerationserscheinungen im ipsilateralen CPU, dem Efferenzgebiet der Substantia nigra, sind 2-3 Tage nach Läsion am auffälligsten, wobei schon nach 5 Tagen dort keine weiteren Nekrosen feststellbar waren (Maler et al., 1973). Der Verlust der terminalen dopaminergen Boutons, und damit einhergehend die beginnende dopaminerge Deafferentierung des CPU, kann schon 18 h nach Läsion nachgewiesen werden (Hökfelt und Ungerstedt, 1973). Apomorphin-induzierte Rotationen lassen sich schon 2 Tage nach Läsion auslösen und sind danach noch für mindestens 200 Tage, bzw. bis zum Lebensende der Versuchstiere, auslösbar (Ungerstedt, 1971). Die Anzahl der Apomorphin-induzierten Rotationen zeigt in den ersten drei Monaten nach Läsion einen kontinuierlichen Anstieg bis nach ca. 3 Monaten ein Plateau erreicht wird, da die striatale dopaminerge Deafferentierung parallel zu einem Anstieg der dortigen D1- und D2-Rezeptoren führt (Schwarting und Huston, 1996a, b). Der Verlauf der pathologischen Veränderungen in diesem Tiermodell spiegelt ganz sicher nicht den langsamen progredienten Verlauf des iPS mit dem allmählichen Verlust dopaminerge Neurone und der Ausbildung von Einschlusskörperchen, sogenannten Lewy-Körperchen, in den verbleibenden pigmentierten dopaminergen Neuronen wieder (Schwarting und Huston, 1996a, b; Gerlach et al., 2001). Im Gegensatz allerdings zu Tiermodellen, bei denen es durch die wiederholte systemische Gabe von geringen Mengen MPTP (Schober, 2004) oder die intrazerebrale Injektion von Rotenon (Betarbet et al., 2000) zu einem langsamen progredienten Verlauf des Zelluntergangs und der Ausbildung von Einschlusskörperchen kommt, sind 6-OHDA-Läsionen irreversibel. Bei MPTP und Rotenongabe werden oftmals, nach einer zuvor deutlich

sichtbaren Schädigung des nigro-striatalen Systems, in Tierverhaltenstests und im histologischen Gehirnppräparat Spontangesungen beobachtet (Betarbet et al., 2000; Schober, 2004). Die MPTP- und Rotenonmodelle sind zudem sehr variabel in ihrer Ausprägung des Schadens und variieren von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe (Betarbet et al., 2000; Gerlach et al., 2001; Schober, 2004), so dass sich das hier verwendete unilaterale 6-OHDA-Läsionsmodell mit einem über 97%igen dopaminergen Zelluntergang als das Valideste für Neurorestaurationsstudien mit mesenzephalen Progenitorzellen herausstellte. Unilateral mit 6-OHDA-injizierte Ratten, die vor der Transplantation mehr als vier kontralaterale Apomorphin-induzierte Rotationen pro min durchführten (über einen Zeitraum von 40 min ermittelt) konnten, aufgrund dieser Verhaltensexperimente sicher als erfolgreich läsiert angesehen werden. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen an solchen Gehirnen, 7 Tage nach Läsion, zeigten einen deutlichen unilateralen Verlust dopaminerg Perikarya in der Substantia nigra und eine damit einhergehende Reduktion TH-immunreaktiver Fasern im ipsilateralen CPu. Eigene stereologische Arbeiten an solchen unilateral läsierten Ratten, bei denen die dopaminergen Neurone in der intakten, bzw. läsierten Substantia nigra ausgezählt und verglichen wurden, zeigten einen mehr als 97%igen Verlust in der läsierten Hemisphäre auf (Haas et al., 2008). Alle in dieser Arbeit untersuchten läsierten Tiere, die drei Monate nach Transplantation bzw. Scheintransplantation auf das Vorhandensein dopaminerg Neurone in der Substantia nigra oder dem CPu hin untersucht wurden, wiesen eine klare dopaminerge Deafferentierung des CPu und einen massiven Verlust dopaminerg Neurone in der Substantia nigra auf. Hierdurch kann deutlich aufgezeigt werden, 1) dass diese Art von Läsion irreversibel ist und 2) eine Transplantation von CSM14.1-Zellen nicht zu einer dopaminergen Reinnervation des läsierten CPu geführt hat.

Dieser zweite Punkt ist von besonderem Interesse, wenn es um die Betrachtung der hier durchgeführten Verhaltensexperimente mittels Apomorphin-induzierter Rotationen geht. Eine Woche nach 6-OHDA-Injektion wurde der Erfolg der Läsion mit diesem Test ermittelt, und die Versuchstiere erhielten eine weitere Woche später ein Zelltransplantat mit CSM14.1-Zellen oder sie wurden einer Sham-Operation unterzogen. Dieser frühe Zeitpunkt, bei dem das Plateau der Apomorphin-induzierten Rotationen noch nicht erreicht ist, haben wir damals bewusst gewählt, um die Zellen in ein Milieu zu bringen, welches gerade akute Veränderungen durchläuft. Der Gedanke war, dass den CSM14.1-Zellen vom Wirtsgewebe gebildete Faktoren bestimmte Differenzierungssignale, hin zu dopaminergen Neuronen, vermitteln würden. Anschließend wurden, für sechs weitere Wochen alle sieben Tage und

danach im 14 Tägigen Rhythmus, diese Rotationen ermittelt. Die Zunahme der Rotationen bei der Scheintransplantat-Gruppe während der ersten vier Wochen entsprach den schon bekannten Erwartungen (Schwartz und Huston, 1996a, b). Die CSM14.1-transplantierten Tiere dagegen zeigten einen deutlich geringeren Anstieg der nach drei und vier Wochen signifikant geringer als bei der scheintransplantierten Gruppe war. Nach 8 Wochen jedoch zeigten die scheintransplantierten Tiere, wie auch die Transplantierten, eine deutliche Abnahme der Rotationen, die bewirkte, dass sich beide Gruppen wieder dem Ausgangswert näherten. Bei den transplantierten Tieren lagen die Rotationen gegen Ende des Experiments jedoch ca. 10% unter dem Ausgangswert und immerhin noch über 20% unter denen der scheintransplantierten Gruppe. Diese Unterschiede waren am Ende des Experiments jedoch nicht signifikant. Ähnliche Rotationswerte erzielte auch die Transplantationsstudie von Anton et al. (1994), obwohl in deren Experiment die zehnfache Menge vitaler CSM14.1-Zellen injiziert wurde. Hieraus lässt sich ableiten, dass initial das Transplantat, gegenüber der Scheintransplantations-Operation, zu einer Verbesserung führte, jedoch im Verlauf des Experiments die Effekte einer Scheintransplantation auch zu einer Abnahme der Rotationen beitrug. Da keine TH-immunreaktiven Neurone im transplantierten CPu aufgefunden wurden und es damit sicherlich nicht zu einer dopaminergen Reinnervation kam, müssen andere Mechanismen als Erklärung herangezogen werden. Inzwischen gibt es eine Reihe von Transplantationsstudien bei Hemiparkinson-Ratten und nichtmenschlichen Primaten mit induzierten Parkinsonsymptomen, bei denen ebenfalls neurale Progenitorzellen verwendet wurden und bei denen es auch zu Verbesserungen in Verhaltenstests kam, obwohl eine dopaminerge Differenzierung der Zellen ebenfalls unterblieb (Yasuhara et al., 2006; Redmond et al., 2007; Hovakimyan et al., 2008b; Miljan et al., 2008). Es wird davon ausgegangen, dass die Sekretion von Neurotrophinen von den injizierten Zellen, oder angeregt durch diese vom endogenen Gewebe durch Interaktion mit dem Transplantat, für die Verbesserungen in den Verhaltenstests eine große Rolle spielen. Von vielen Zelllinien ist schon bekannt, dass sie für das iPS klinisch relevante Neurotrophine, wie z. B. BDNF, CNTF, bFGF, FGF-2 oder auch GDNF bilden können (Cattaneo und Conti, 1998, Lu et al., 2003; Gao et al., 2006; Miljan et al., 2008). Gerade GDNF ist ein sehr potenter Wirkstoff, der auch schon in klinischen Studien mit Parkinson-Patienten zum Einsatz kam (Gill et al., 2003). Dieser wirkt zum einen, vor einer 6-OHDA-Injektion verabreicht, neuroprotektiv, jedoch auch neuroregenerativ auf endogene dopaminerge Neurone, wenn er nach entsprechenden Läsionen appliziert wird (Beck et al., 1995; Bohn, 1999; Kirik et al., 2000, 2001). Eine mögliche Erklärung für die spontane Besserung nach CSM14.1-Transplantation kann evtl.

durch die GDNF-Sekretion der injizierten Zellen erklärt werden, da sie in der Lage sind dieses Neurotrophin zu bilden, wie Western Blot Ergebnisse und immunzytochemische Markierungen in dieser Arbeit gezeigt haben (Haas et al., 2008). Die allerdings ebenfalls nachfolgende Abnahme bei den scheintransplantierten Tieren könnte ebenfalls durch die Wirkung von GDNF erklärt werden, da nämlich die Arbeitsgruppe um Liberatore et al. (1997) gezeigt hat, dass nach einer Stabwound-Läsion im Striatum, also ähnlich unserer bei den Scheintransplantationen ebenfalls durchgeführten Makroinjektion mit DMEM, der Gehalt der endogenen GDNF-mRNA in dieser Region eine Verdopplung erfährt. Dies wäre eine Möglichkeit der Erklärung für die zeitlich versetzte Abnahme der Apomorphin-induzierten Rotationen bei dieser Kontrollgruppe. Interessanterweise führte die Transplantation der CSM14.1-Zellen in die Substantia nigra adulter Hemiparkinson-Ratten, ebenfalls 14 Tage nach 6-OHDA-Läsion, zu einer signifikanten Abnahme der Rotationen unter den Ausgangswert, was also einer richtigen Besserung der Symptomatik bedeutet, wohingegen die scheintransplantierten Tiere eine stetige Verschlechterung mit dann schon beschriebener Plateaubildung (Schwartz und Huston, 1996a, b) über den untersuchten Zeitraum von 3 Monaten ausbildeten (Haas et al., 2008). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass das Platzieren der CSM14.1-Zellen in die Substantia nigra, die dann als sogenannte Zellpumpen GDNF nahe am Zelleib der verbliebenen dopaminergen Neurone bilden, zu einem „sprouting“ dieser verbliebenen Neurone führt, und dies effektiver als nach Injektion der Zellen in das Striatum.

4.2.5 Zusammenfassung der *in vivo* Befunde

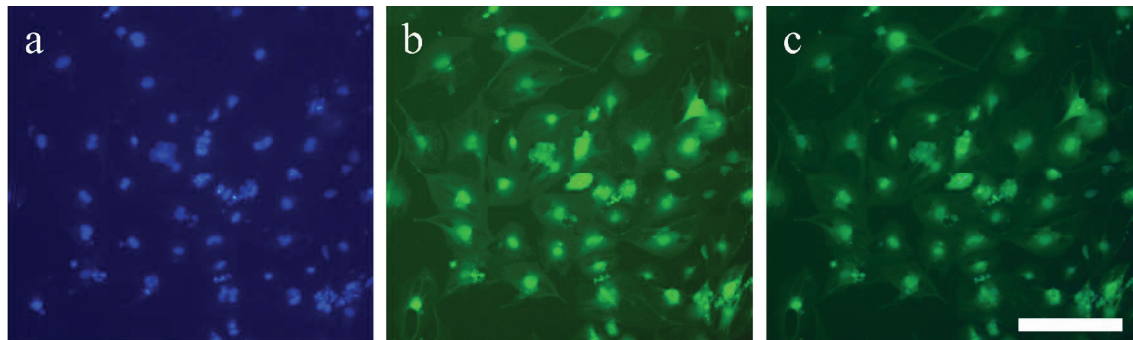
Abschließend lässt sich sagen, dass die Verhaltenseffekte nur spekulativ diskutiert werden können, da viele Faktoren, die hierauf einen Einfluss haben, noch nicht ausreichend bekannt sind. Jedoch stellen gerade solche immortalisierte Progenitoren, wie die der Zelllinie CSM14.1, ein gutes Ausgangsmaterial für weitere Transplantationsstudien dar, da sie sich leicht vermehren lassen, nach Transplantation keine Tumore ausbilden, sich auch nach inzwischen fast zwei Jahrzehnten in Kultur nicht verändert haben, sich *in vitro* zielgerichtet in Neurone mit dopaminergen Eigenschaften differenzieren lassen und sie zudem zukünftig einem *ex-vivo* Gentransfer zur Ausbildung von therapeutisch wirksamen Substanzen oder Markerproteinen unterzogen werden können. Diese Punkte lassen vermuten, dass zukünftige Modifikationen dieser Zellen eine Generierung von Material für die Entwicklung einer effektiven, kontrollierten molekularen und zellulären Neurorestorationstherapie erlauben.

4.3 Ausblick

Die Regenerative Medizin und gerade das Feld der Neurotransplantation unter Verwendung neuraler Stammzellen unterliegt einem stetigen Wandel, ist somit keine statische Forschungsrichtung, sondern dauernd im Fluß. Aufgrund, bzw. trotz der in dieser Arbeit erhobenen Befunde sollten bei zukünftigen Studien einige wichtige Punkte, Protokolle oder Arbeitsmethoden erweitert, bzw. abgewandelt werden:

- Für zukünftige Arbeiten mit dem unilateralen 6-OHDA-Läsionsmodell sollte eine weitere Reihe von Verhaltensexperimenten durchgeführt werden. Der Apomorphin-induzierte Rotationstest stellt zwar weiterhin die einzige Möglichkeit dar nahezu vollständige Läsionen zu ermitteln (Hefti et al., 1980; Heikkila et al., 1981; Casas et al., 1988; Carman et al., 1991; Hudson et al., 1993; Moore et al., 2001), dieser sollte aber durch weitere, z. B. nicht Pharmaka-induzierte, Verhaltensexperimente erweitert werden. Der sogenannte Zylindertest (Schallert und Lindner, 1990; Schallert und Tillerson, 1999; Kirik, 2001), bei dem die präferentielle Verwendung der Vorderpfoten und der Footprint Analysis Test (Metz et al., 2005), bei dem die Schrittweiten der beiden Körperhälften, ermittelt werden, sollten standardmäßig durchgeführt werden. Diese Tests ermitteln gänzlich andere Parameter und spiegeln therapeutische Verbesserungen unterschiedlicher motorischer Komponenten, z. B. taktile Lokomotion oder Laufverhalten, wieder.
- Die atraumatischere Mikroinjektionsmethode (Nikkhah et al., 1994, 1995) sollte bei weiteren Transplantationsstudien zum Einsatz kommen. Hierbei werden, gegenüber der hier noch verwendeten Hamilton-Kanülen mit 0,4 mm Durchmesser, Glaskapillaren mit einem Aussendurchmesser von ca. 70-80 µm benutzt. Dies führt zu geringeren Verletzungen des Hirngewebes und damit einhergehend zu einer verminderten Aktivität der endogenen Mikroglia (Nikkhah et al., 1995, Hovakimyan et al., 2008), was letztendlich zu einem besseren Überleben des Transplantats führt.
- Die gentechnische Veränderung der CSM14.1-Zellen mittels Lentiviren zur Expression des Markerproteins GFP sollte es in zukünftigen Studien erlauben die transplantierten Zellen im Wirtsgewebe aufzufinden und immunhistochemisch charakterisieren zu können. Eine Transduktion mit diesem Gentransfersystem hat, gegenüber dem älteren retroviralen System den Vorteil, dass die veränderten Zellen

die GFP-Expression auch unter Stress- oder Differenzierungsbedingungen nicht einstellen. Daher eignet sich diese Vorgehensweise sehr gut für Transplantationsstudien. Eigene Vorexperimente in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe für Vektorologie und experimentelle Gentherapie an der Universität Rostock (Prof. B. Pützer) zeigten, dass solche GFP-exprimierenden CSM14.1-Zellen auch nach 14 d bei 39° C und 1% FKS (Differenzierungsbedingungen) GFP enthalten und im Fluoreszenzmikroskop detektierbar sind (siehe Abbildung unten). Durch diese Markierungsmethode könnten transplantierte Zellen auch im akuten Gehirnschnittpräparat elektrophysiologisch weiter charakterisiert werden (Auerbach et al., 2000).



GFP-Expression differenzierter CSM14.1-Zellen:

CSM14.1-Zellen wurden mittels Lentiviren gentechnisch verändert, sodass sie stabil das Markerprotein GFP bilden. Dieses ist auch nach zwei Wochen unter Differenzierungsbedingungen (39° C, 1% FKS) noch nachweisbar.

a) DAPI-Markierung der Zellkerne (blaue Fluoreszenz) und b) endogene GFP-expression (grüne Fluoreszenz) in allen Zellen detektierbar, wie in c) der Überlagerung erkennbar wird. Maßstab = 80 µm (a-c).

- Die *in vitro* Differenzierung und anschließende Transplantation der CSM14.1-Zellen in das CPU oder die Substantia nigra von 6-OHDA-Ratten ist ein interessanter experimenteller Ansatz für zukünftige Studien, da aus der Literatur bezüglich solcher Vergleiche (undifferenzierte versus differenzierte Transplantate) widersprüchliche Ergebnisse vorliegen und diese beiden unterschiedlichen Ansätze immer noch kontrovers diskutiert werden. Nur prädifferentzierte mesenzepale Progenitoren, im Vergleich zu undifferenzierten Progenitoren, waren in den Studien von Wang et al. (2004) in der Lage das Striatum dopaminerg zu reinnervieren und Verhaltensbesserungen auszulösen, wohingegen andere Gruppen diesbezüglich zu gegenteiligen Ergebnissen kamen (Wagner et al., 1999).

- Übertragen des Läsionsmodells auf Mäuse (Iancu et al., 2005). Hierdurch könnten zukünftig sogenannte immundefiziente Mäuse bei Transplantationsstudien verwendet werden. Immunologische Abstossungsreaktionen der Transplantate, auch im als immunprivilegiert angesehenen Gehirn, werden als Ursachen für geringe Überlebensraten und Migrationsvorgänge diskutiert (Hagell und Brundin, 2001).
- Ermitteln von neurotrophen Faktoren oder EZM-Komponenten, die sich positiv auf das Auswachsen eines Transplantats auswirken. Dies könnte durch den Vergleich von intakten Hirnregionen (CPu und Substantia nigra) mit 6-OHDA-läsionierten Gebieten durchgeführt werden oder durch Vergleiche von neonatalem mit adultem Hirngewebe ermittelt werden. Wenn solche Faktoren, z. B. mittels Proteomanalyse, bekannt würden, bestünde die Möglichkeit, die entsprechende Region vor oder während der Transplantation mit diesen Stoffen anzureichern, um den injizierten Zellen sozusagen die Strassen freizuräumen. Ein solcher Ansatz wird momentan von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (Dissertation von Frau Grit Lessner).

Die Konzentration auf die entwicklungsabhängige Transplantationsnische (neonatale Transplantate) scheint momentan die erfolgversprechendste Strategie zu sein, um die Bedingungen der dopaminergen Differenzierungen von Transplantaten mesenzephaler neuraler Progenitorzellen besser zu verstehen. In eigenen Arbeiten konnte bislang nur nach Transplantation mesenzephaler Progenitoren aus der Ratte (Haas et al., 2007) oder auch dem Gehirn eines menschlichen Feten (Hovakimyan et al., 2006) in neonatale Tiere eine dopaminerge Differenzierung der injizierten Zellen nachgewiesen werden. Bei adulten Tieren unterblieb dies bislang, obwohl es sich um Zellen gleichen Ursprungs handelte (Haas et al. 2008; Hovakimyan et al., 2008). Interessanterweise wiesen bei einer der beiden einzigen Placebo-kontrollierten Transplantationsstudien an Parkinson-Patienten, nur die jüngeren unter 60jährigen Patienten eine klinische Verbesserung gegenüber den Kontrollpatienten auf (Freed et al., 2001). Diese Patienten sind sicher nicht als neonatal oder juvenil anzusehen, jedoch könnte, aufgrund der Altersunterschiede zu den anderen Patienten, die Zusammensetzung bestimmter Komponenten im Gehirn trotz allem ein permissiveres Milieu für die Integration transplanterter Zellen darstellen. Diese „Hypothese der kompetenten Nische“ führte auch zu gegenwärtigen im Labor durchgeführten differentiellen ontogenetischen Proteomstudien des Rattengehirns, da wir der Meinung sind hier einen Ansatz für zukünftig erfolgreiche

Transplantationsstrategien zur Behandlung eines experimentell ausgelösten Parkinsonsyndroms zu entwickeln.

5. Anhang

5.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, zum einen das Differenzierungsverhalten mesenzephaler temperaturabhängig-immortalisierter Progenitorzellen der Zelllinie CSM14.1 aus dem Gehirn der Ratte unter kontrollierten Differenzierungsbedingungen *in vitro* mittels semiquantitativem Western Blot und immunzytochemischen Methoden zu charakterisieren und zum anderen das Differenzierungsverhalten von CSM14.1-Zellen *in vivo* nach Transplantation in das Striatum von 6-OHDA-injizierten Hemiparkinson-Ratten zu untersuchen. Zudem sollte der therapeutische Einfluß eines solchen Transplantats mittels Apomorphin-induzierter Rotationen ermittelt werden. In CSM14.1-Zellen wurde der Expressionsverlauf zelltypspezifischer Markerproteine für Progenitorzellen (Nestin), Neurone, dopaminerge Progenitoren (Retinsäurerezeptor Nurr1) und ausdifferenzierte dopaminerge Nervenzellen (TH, ALDH2) unter definierten Differenzierungsbedingungen (nichtpermissive Temperatur 39° C, 1% FKS) untersucht. Die Zellzahl nahm während des untersuchten Zeitraumes (14 Tage) im Zeitverlauf ab. Die ehemals flachen, epithelialen Zellen bildeten bei 39° C zahlreiche Ausläufer aus und exprimierten GDNF. Das immortalisierende Onkogenprodukt Large-T-antigen war in den Zellen nach 3 Tagen bei 39°C nicht mehr nachweisbar. Eine Abnahme von Nestin über den Kultivierungszeitraum war deutlich erkennbar, wohingegen die Expression neuronaler Proteine hochreguliert wurde. Nurr1 wurde in den Zellen schon bei 33° C nachgewiesen und nach 3 Tagen bei 39° C hochreguliert. TH wurde bei 33° C gering exprimiert, dessen Gehalt stieg aber nach 3 Tagen bei 39° C stark an und blieb dann konstant nachweisbar. ALDH2 war bei 33° C nicht nachweisbar und dessen Gehalt stieg während der Differenzierung kontinuierlich an. In diesem *in vitro* System wurde also ein ähnlicher Ablauf der dopaminergen Differenzierung beobachtet wie er wohl auch während der Embryonalentwicklung abläuft. Drei Monate nach bilateraler Transplantation in das Striatum konnte aufgezeigt werden, dass die PKH26-markierten CSM14.1-Zellen ca. 300-400 µm aus dem Injektionskanal migrierten und überwiegend mit GFAP kolokalisiert waren; ein Großteil war nicht charakterisierbar und nur einzelne Zellen waren NF200-immunreaktiv. Eine dopaminerge Differenzierung, und somit eine dopaminerge Reinnervation, im adulten Striatum unterblieb. Seitenunterschiede wurden nicht beobachtet. Bei Apomorphin-induzierten Rotationen war nur zu Beginn eine signifikante Reduktion bei CSM14.1-transplantierten Tieren im Vergleich zu scheintransplantierten Kontrollen nachweisbar. Gegen Ende glichen sich die Rotationswerte jedoch an und unterschieden sich nicht signifikant.

5.2 Tabellenanhang

5.2.1 Anhang zu Diagramm 1

(Fortsatzlängenbestimmung bei undifferenzierten und differenzierenden CSM14.1-Zellen)

Es sind die Mittelwerte der Messungen von zufällig ausgewählten Zellen (n = 20) aus sechs verschiedenen Kultivierungsgefäßen aufgeführt:

	33°/10% FKS/2d	39°/1% FKS/7d	39°/1% FKS/14d
Well 1	89	181	341
Well 2	84	203	364,5
Well 3	81	185,5	360
Well 4	103	220	331
Well 5	88	271,5	339,5
Well 6	87	241,5	329

5.2.2 Anhang zu Diagramm 2

(Zellzahlveränderung in vitro unter Differenzierungsbedingungen)

	0d	3d/39° C	7d/39° C	10d/39° C	14d/39° C
Probe1	560000	715000	370000	225000	200000
Probe2	520000	755000	390000	210000	190000
Probe3	520000	575000	320000	170000	180000
Probe4	535000	610000	250000	190000	190000
Mittelwert	533750	663750	332500	198000	190000
Standardabweichung	16345,9	73686,4	54025,5	20728,9	7071,1

5.2.3 Anhang zu Diagramm 3

Werte der Apomorphin-induzierten kontralateralen Rotationen von CSM14.1-transplantierten Tieren (CSM14) und der Versuchstiere (ST), die ein Scheintransplantat erhielten. R0 stellt den Zeitpunkt 1 Woche nach Läsion dar. Die Werte R1-R12 stellen die Zeitpunkte eine Woche (R1) bis 12 Wochen (R12) nach CSM14.1-Zelltransplantation oder Scheintransplantation dar. Nur diese aufgeführten Werte gingen in die statistische Auswertung für die Rotationen ein (siehe Kap. 3.2.1).

VT	CSM14	R0	T	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R8	R10	R12
L72	CSM14	9,4		11,6	9,6	12,1	9,3	9,3	9,9	7,5	6,8	6,2
L73	CSM14	16		20,4	16,9	14,7	15	14	15,6	16,3	14,1	17,2
L74	CSM14	4,7		10,4	8,4	6,9	7,7	5,8	7	5,3	5	5,5
L76	CSM14	11,5		10,6	12,6	9,9	8	8,9	6,9	5,4	4	3,4
L82	CSM14	8,5		13,1	12,1	8,5	5,6	2,9	4	4,1	8,7	7,2
L15	CSM14	4,6		11,1	10,5	10,5	10,8	14,2	16	13,5	15,4	13,2
L16	CSM14	12,5		12,9	11,2	13,1	14,8	16,7	14,6	16	14,8	13,3
L17	CSM14	10,8		13,2	16,1	13,7	9,5	15,9	16,8	14,4	14,1	12,4
L18	CSM14	14		13	11,2	10,6	10,3	10,4	8,1	7	8	7,4
L19	CSM14	12,2		14,5	14,1	14,3	11,9	16,9	14,5	12	11	12,1
L20	CSM14	7		7,9	11,8	8,4	5,4	9,4	9,4	8,7	3,4	7,1
L21	CSM14	17,1		11,7	10,9	12,2	12,2	18,1	14,5	11	10,9	9,2

VT	sham	R0	ST	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R8	R10	R12
L87	sham	5,4		8,9	10,7	11,4	11,2	8,9	10,8	12,4	10,7	11
L91	sham	4,1		6,5	6,5	6,1	6,2	5,6	4,6	4,6	4,2	3,2
L92	sham	8,9		18	10,1	8,3	6,6	9,1	8,6	7,9	2,8	2,1
L96	sham	7,9		10,7	11,9	9,8	9,1	8,5	7,1	7,1	6,2	6,7
L98	sham	10,2		16,2	19,8	19,7	19,5	17,3	19,2	14,4	14,4	14,6
L4	sham	13,8		17,4	17,8	19,6	21,5	20,3	23,3	20,6	15	16,7
L10	sham	7,3		9,6	10,5	9	6,1	5,9	6	8,9	2,3	7,4
L11	sham	8,7		10,5	8,7	7,3	7,7	8	4,3	3	4	3,6
L12	sham	4,1		6,3	9,9	11,8	9,4	10,7	7,6	5,9	7,9	6,9
L13	sham	8,9		10,4	10,3	9,5	9,2	9,2	8,5	5,7	6,1	4,5
L14	sham	7,5		17,9	17,3	18,2	16,8	21,1	22,8	19,1	20,5	19,4

5.3 Literaturverzeichnis

Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, 25: 239-252.

Alfahel-Kakunda A, Silverman WF (1997) Calcium binding proteins in the substantia nigra and ventral tegmental area during development: Correlation with dopaminergic compartmentalization. *Dev Brain Res*, 103: 9-20.

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 U.S.A.*, 93: 7346-7351.

Andressen C, Briese V, Ulfig N (2003) Progenitor cells from human embryonic retina - Proliferation and preferential differentiation into ganglion cells. *Neuroembryology*, 2: 123-129.

Anton R, Kordower JH, Maidment NT, Manaster JB, Kane DJ, Rabizadeh S, Schueler SB, Yang J, Rabizadeh S, Edwards RH, Markham CH, Bredesen DE (1994) Neural-targeted gene therapy for rodent and primate hemiparkinsonism. *Exp Neurol*, 127: 207-218.

Anton R, Kordower JH, Kane DJ, Markham CH, Bredesen DE (1995) Neural transplantation of cells expressing the anti- apoptotic gene bcl-2. *Cell Transplant*, 4: 49-54.

Arenas E (2002) Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull*, 57: 795-808.

Arnhold S, Andressen C, Angelov DN, Vajna R, Volsen SG, Hescheler J, Addicks K (2000) Embryonic stem-cell derived neurones express a maturation dependent pattern of voltage-gated calcium channels and calcium binding proteins. *Int J Devl Neurosci*, 18: 201-212.

Asada H, Ip NY, Pan L, Razack, Parfitt MM, Plunkett RJ (1995) Time course of ciliary

neurotrophic factor mRNA expression is coincident with the presence of protoplasmatic astrocytes in traumatized rat striatum. *J Neurosci Res*, 40: 22-30.

Auerbach JM, Eiden MV, McKay RDG (2000) Transplanted CNS stem cells form functional synapses in vivo. *Eur J Neurosci*, 12: 1696- 1704.

Bachoud-Levi AC, Deglon N, Nguyen JP, Bloch J, Bourdet C, Winkel L, Remy P, Goddard M, Lefaucheur JP, Brugieres P, Baudic S, Cesaro P, Peschanski M, Aebischer P (2000) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther*, 11: 1723-1729.

Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B, Knutsson E, Martensson A, Sedvall G, Seiger A, Olson L (1985) Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism: first clinical trials. *J Neurosurg*, 2: 169-173.

Bäckman C, Perlmann T, Wallen A, Hoffer BJ, Morales M (1999) A selective group of dopaminergic neurons express Nurr1 in the adult mouse brain. *Brain Res*, 851: 125-132.

Baier PC, Schindehütte J, Thinyane K, Flügge G, Fuchs E, Mansouri A, Paulus W, Gruss P, Trenkwalder C (2004) Behavioral changes in unilaterally 6-hydroxy-dopamine lesioned rats after transplantation of differentiated mouse embryonic stem cells without morphological integration. *Stem Cells*, 22: 396-404.

Bantubungi K, Blum D, Cuvelier L, Wislet-Gendebien S, Rogister B, Brouillet E, Schiffmann SN (2008) Stem cell factor and mesenchymal and neural stem cell transplantation in a rat model of Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci*, 37: 454-470.

Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MAS, Studer L (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nature Biotech*, 21: 1200-1207.

Bauer P, Knoblich R, Mix E, Pahnke J, Rolfs A (2002) Aktueller Stand und Perspektive der Zelltransplantation bei neurodegenerativen Erkrankungen. *Nervenheilkunde*, 21: 88-93.

Baughman RW, Huettner JE, Jones KA, Khan KA (1991) Cell culture of neocortex and basal forebrain from postnatal rats. In: *Culturing nerve cells*. Banker G, Goslin K (eds.), MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA. pp. 227-249.

Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2: 325-331.

Beck KD, Valverde J, Alexi T, Poulsen K, Moffat B, Vandlen RA, Rosenthal A, Hefti F (1995) Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature*, 373: 339-341.

Benabid AL, Pollak P, Gervason C (1991) Longterm suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet*, 337: 403-406.

Benazzouz A, Hallett M (2000) Mechanism of action of deep brain stimulation. *Neurology*, 55 (Suppl. 6): 13-16.

Bentlage C, Nikkhah G, Cunningham MG, Björklund A (1999) Reformation of the nigrostriatal pathway by fetal dopaminergic micrografts into the substantia nigra is critically dependent on the age of the host. *Exp Neurol*, 159: 177-190.

Berger B, Di Porzio U, Daguet MC, Gay M, Vigny A, Glowinski J Prochiantz A (1982) Long-term development of mesencephalic dopaminergic neurons of mouse embryos in dissociated primary cultures: morphological and histochemical characteristics. *Neuroscience*, 7: 193-205.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neurosci*, 3: 1301- 1306.

Bilang-Bleuel A, Revah F, Colin P, Locquet I, Robert JJ, Mallet J, Horellou P (1997) Intrastratial injection of an adenoviral vector expressing glial- cell- line- derived neurotrophic factor prevents dopaminergic neuron degeneration and behavioural impairment in a rat model of Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 94: 8818-8823.

Birkmayer W, Danielczyk W (1991) Die Parkinson-Krankheit. 5. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart-New York.

Björklund A, Lindvall O (1984) Dopamine containing Systems in the CNS. In: Björklund A, Höckfelt T (eds) Handbook of chemical neuroanatomy. Elsevier, Amsterdam, 55-122.

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

Björklund L, Isacson O (2002) Regulation of dopamine cell type and transmitter function in fetal and stem cell transplantation for Parkinson's disease. *Prog Brain Res*, 138: 411-420.

Bloch J, Bachoud-Levi AC, Deglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugieres P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski M (2004) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther*, 15: 968-975.

Bohn MC (1999) A commentary on glial cell line- derived neurotrophic factor (GDNF). From a glial secreted molecule to gene therapy. *Biochem Pharmacol*, 57: 135-142.

Borlongan CV, Cameron DF, Saporta S, Sanberg PR (1997) Intracerebral transplantation of testis-derived sertoli cells promotes functional recovery in female rats with 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism. *Exp Neurol*, 148: 388-392.

Böttcher T, Mix E, Koczan D, Bauer P, Pahnke J, Peters S, Weinelt S, Knoblich R, Strauss U, Cattaneo E, Thiesen HJ, Rolfs A (2003) Gene expression profiling of neurotrophic factor over-expression rat striatal progenitor cells (ST14A) indicates improved stress response during the early stage of differentiation. *J Neurosci Res*, 73: 42-53.

Buc-Caron MH (1995) Neuroepithelial progenitor cells explanted from human fetal brain proliferate and differentiate in vitro. *Neurobiol Dis*, 2: 37-47.

Braunewell KH, Gundelfinger E (1997) Neurochemie. In: Kischka U, Wallesch CW, Wolf G (Hrsg.) Methoden der Hirnforschung, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 35-61.

Breese GR, Traylor TD (1970) Effect of 6-hydroxydopamine on brain norepinephrine and dopamine: evidence for selective degeneration of catecholamine neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 174: 413-420.

Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin I (1983) A primate model of parkinsonism: Selective destruction of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 80: 4546-4550.

Cameron HA, McKay RDG (1998) Stem cells and neurogenesis in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*, 8: 677-680.

Campbell K, Olsson M, Björklund A (1995) Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle. *Neuron*, 15: 1259-1273.

Cao QL, Zhang YP, Howard RM, Walters WM, Tsoulfas P, Whittemore SR (2001) Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Exp Neurol*, 167: 48-58.

Carlsson A, Lundqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, 180: 1200.

Carman LS, Gage FH, Shults CW (1991) Partial lesion of the substantia nigra: relation between extent of lesion and rotational behavior. *Brain Res* 553, 275-283.

Carvey PM, Ling ZD, Sortwell CE, Pitzer MR, McGuire SO, Storch A, Collier TJ (2001) A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 171: 98-108.

Casas M, Guix T, Prat G, Ferre S, Cadafalch J, Jane F (1988) Conditioning of rotational behavior after the administration of a single dose of apomorphine in rats after denervation of the dopaminergic nigrostriatal pathway: relevance to drug addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 31, 605-609.

Catapano LA, Sheen VL, Leavitt BR, Macklis JD (1999) Differentiation of transplanted neural precursors varies regionally in adult striatum. *Neuroreport*, 10: 3971-3977.

Cattaneo E, Magrassi L, Butti G, Santi L, Giavazzi A, Pezzotta S (1994) A short term analyses of the behaviour of conditionally immortalized neuronal progenitors and primary neuroepithelial cells implanted into the fetal rat brain. *Dev Brain Res*, 83: 197-208.

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

Cazorla P, Smidt MP, O'Malley KL, Burbach JPH (2000) A response element for the homeodomain transcription factor Ptx3 in the tyrosine hydroxylase gene promoter. *J Neurochem*, 74: 1829-1837.

Chadi G, Gomide VC (2004) FGF-2 and S100beta immunoreactivities increase in reactive astrocytes, but not in microglia, in ascending dopamine pathways following a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *Cell Biol Int*, 28: 849-861.

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.

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.

Clarkson ED, La Rosa FG, Edwards-Prasad J, Weiland DA, Witta SE, Freed CR, Prasad KN (1998) Improvement of neurological deficits in 6-hydroxydopamine-lesioned rats after transplantation with allogeneic simian virus 40 large tumor antigen gene-induced

immortalized dopamine cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 95: 1265-1270.

Claus P, Werner S, Timmer M, Grothe C (2004) Expression of the fibroblast growth factor-2 isoforms and the FGF receptor 1-4 transcripts in the rat model system of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 360: 117-120.

Costantini LC, Isacson O (1999) Dopamine neuron grafts: Development and molecular biology. In: di Porzio U, Pernas-Alosno R, Perrone-Capano C (Hrsg.) Development of dopaminergic neurons. Georgetown: RG Landes. Seiten 123-144.

Culican SM, Baumrind NL, Yamamoto M, Pearlman AL (1990) Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocytes. *J Neurosci*, 10: 684-692.

Curtis MA, KamNannmark U, Anderson MF, Zetstrom Axel M, Wikkelsø C, Holtas S, van Roon-Mom WMC, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RLM, Eriksson PS (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*, 315: 1243-1249.

Daadi MM, Weiss S (1999) Generation of tyrosine hydroxylase-producing neurons from precursors of the embryonic adult forebrain. *J Neurosci*, 19: 4484-4497.

Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S, Edge A, Penney D, Kassissieh S, Dempsey P, Isacson O (1997) Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nature Med*, 3: 350-353.

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

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

Di Porzio U, Zuddas A, Cosenza-Murphy DB, Barker JL (1990) Early appearance of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurones in the mesencephalon of mouse embryos. *Int J Devl Neurosci*, 8: 523-532.

Dunn EH (1917) Primary and secondary findings in a series of attempts to transplant cerebral cortex in albino rat. *J Comp Neurol*, 25: 565-582.

Durand MM, Chugani DC, Mahmoudi M, Phelps ME (1990) Characterization of neuron- like cell line immortalized from primary rat mesencephalon cultures. *Soc Neurosci Abstr*, 16: 40.

Eells JB, Rives JE, Yeung SK, Nikodem VM (2001) In vitro regulated expression of tyrosine hydroxylase in ventral midbrain neurons from *Nurr1*-null mouse pups. *J Neurosci Res*, 64: 322-330.

Eells JB (2003) The control of dopamine neuron development, function and survival: Insights from transgenic mice and the relevance to human disease. *Curr Med Chem*, 10: 857-870.

Ehrlich ME, Conti L, Toselli M, Taglietti L, Fiorillo E, Taglietti V, Ivkovic S, Guinea B, Tranberg A, Sipione S, Rigamonti D, Cattaneo E (2001) ST14A cells have properties of a medium- size spiny neuron. *Exp Neurol*, 167: 215-226.

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

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

Englund U, Björklund A, Wictorin K (2002a) Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain. *Dev Brain Res*, 134: 123-141

Englund U, Fricker-Gates RA, Lundberg C, Björklund A, Wictorin K (2002b) Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections. *Exp Neurol*, 173: 1-21.

Englund U, Björklund A, Wictorin K, Lindvall O, Kokaia M (2002c) Grafted neural stem cells develop into functional pyramidal neurons and integrate into host cortical circuitry. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 99: 17089-17094.

Espejo EF, Montoro RJ, Armengol JA, López-Barneo J (1998) Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron*, 20: 197-206.

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

Feany MB, Bender WW (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature*, 404: 394-398.

Fox D, Kouris GJ, Blumofe KA, Heilizer TJ, Husak V, Greisler HP (1999) Optimizing fluorescent labelling of endothelial cells for tracking during long-term studies of autologous transplantation. *J Surg Res*, 86: 9-16.

Filipov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci*, 23: 373-382.

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.

Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D, McKay RDG (1988) Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron*, 1: 439-448.

Frederiksen K, McKay RDG (1988) Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci*, 8: 1144-1151.

Freed WJ, Morihasa JM, Spoor E, Hoffer BJ, Olson L, Seiger A, Wyatt RJ (1981) Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain reduce lesion-induced rotational behaviour. *Nature*, 292: 351-352.

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 344: 710-719.

Freeman TB, Spence MS, Boss BD, Spector DH, Strecker RE, Olanow CW, Kordower JH (1991) Development of dopaminergic neurons in the human substantia nigra. *Exp Neurol*, 113: 344-353.

Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C, Greco C, Gates M, Björklund A (1999) Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci*, 19: 5990-6005.

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 U.S.A.*, 92: 11879-11883.

Gage FH, Ray J, Fisher LJ (1995) Isolation, characterization and use of stem cells from the CNS. *Ann Rev Neurosci*, 18: 159- 192.

Gage FH (1998) Stem cells of the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 8: 671-676.

Gagnon C, Bédard PJ, Di Paolo T (1993) Grafts in the treatment of Parkinson's disease: animal models. *Rev Neurosci*, 4: 17-40.

Gao J, Prough DS, McAdoo DJ, Grady JJ, Parsley MO, Ma L, Tarensenko YI, Wu P (2006) Transplantation of primed human fetal neural stem cells improves cognitive function in rats after traumatic brain injury. *Exp Neurol*, 201: 281-292.

Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmermann L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, 380: 252-255.

Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (2001) *Die Parkinson-Krankheit*. 2. Aufl., Springer Verlag, Wien-New York.

German DC, Manaye KF (1993) Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): Three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol*, 331: 297-309.

Gibb WR (1992) Melanin, tyrosine hydroxylase, calbindin and substance P in the human midbrain and substantia nigra in relation to nigrostriatal projections and differential neuronal susceptibility in Parkinson's disease. *Brain Res*, 581: 283-291.

Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P (2003) Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. *Nature Med*, 9: 589-595.

Gingrich JR, Roder J (1998) Inducible gene expression in the nervous system of transgenic mice. *Annu Rev Neurosci*, 21: 377- 405

Gordon CJ (1990) Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav*, 47: 963-991.

Goslin K, Banker G (1991) Rat hippocampal neurons in low-density culture. In: *Culturing nerve cells*. Banker G, Goslin K (eds.), MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA. pp. 251-281.

Götz M (2001) Gliazellen bilden Nervenzellen – Radiale Glia als Stammzellen des ZNS von Vertebraten. *Neuroforum*, 1: 3-10.

Gould E, Reeves AJ, Graziano MSA, Gross CG (1999) Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*, 286: 548-552.

Grasso A, Haglid KG, Hansson HA, Persson L, Ronnback L (1977) Localization of 14-3-2 protein in the rat brain by immunoelectron microscopy. *Brain Res*, 122: 582-585.

Gurney EG, Tomowski S, Deppert W (1986) Antigenic binding sites of monoclonal antibodies specific for simian virus 40 large T antigen. *J Virol*, 57: 1168-1172.

Haas SJP, Bauer P, Cattaneo E, Rolfs A, Wree A (1999) Transplantation of the PKH26-labeled, immortalized striatal cell line ST14A in a rat model of Parkinson's Disease. *Proceedings of the Göttinger Neurobiology Conference - Abstract Nr. 825*.

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.

Haas SJP, Beckmann S, Petrov S, Andressen C, Wree A, Schmitt O (2007) Transplantation of immortalized mesencephalic progenitors (CSM14.1-cells) into the neonatal Parkinsonian rat caudate putamen. *J Neurosci Res*, 85: 778-786.

Haas SJP, Petrov S, Kronenberg G, Schmitt O, Andreas Wree (2008) Orthotopic transplantation of immortalized mesencephalic progenitors (CSM14.1-cells) into the substantia nigra of Hemiparkinsonian rats induces neuronal differentiation and motoric improvement. *J Anat*, 212: 19-30.

Hagell P, Brundin P (2001) Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 60: 741-752.

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

Haque NSK, LeBlanc CJ, Isacson O (1997) Differential dissection of the rat E16 ventral mesencephalon and survival and reinnervation of the 6-OHDA-lesioned striatum by a subset of aldehyde dehydrogenase-positive TH neurons. *Cell Transplant*, 6: 239-248.

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.

Hefti F, Melamed E, Wurtman RJ (1980) Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: biochemical characterization. *Brain Res* 195, 123-137.

Heikkila RE, Cabbat FS, Manzino L (1981) Differential inhibitory effects of ascorbic acid on the binding of dopamine agonists to neostriatal membrane preparations: correlations with behavioral effects. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 34, 409-421.

Herman JP, Arous ND (1994) Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. *Prog Neurobiol*, 44: 1-35.

Hildt (2000) Transplantation von fetalem Hirngewebe. In: Knoepffler N, Haniel A (Hrsg.) *Menschenwürde und medizinethische Konfliktfälle*. Hirzel, Stuttgart-Leipzig, 131-148.

Hökfelt T, Ungerstedt U (1973) Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons: an electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection of the nigro-striatal dopamine system. *Brain Res*, 60: 269-297.

Horan PK, Slezak SE (1989) Stable cell membrane labelling. *Nature*, 340: 167-168.

Hovakimyan M, Haas SJP, Schmitt O, Gerber B, Wree A, Andressen C (2006) Mesencephalic human neural progenitor cells transplanted into the neonatal hemiparkinsonian rat striatum differentiate into neurons and improve motor behaviour. *J Anat*, 209: 721-732.

Hovakimyan M, Weinreich K, Haas SJP, Cattaneo E, Rolfs A, Wree A (2008a) In vitro characterization of embryonic ST14A-cells. *Int J Neurosci*, accepted.

Hovakimyan M, Haas SJP, Schmitt O, Gerber B, Wree A, Andressen C (2008b) Mesencephalic human neural progenitor cells transplanted into the adult hemiparkinsonian rat striatum lack dopaminergic differentiation but improve motor behavior. *Cells Tissue Organs*, in press, doi: 10.1159/000140680.

Hudson JL, van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J, Hoffer BJ, Gerhardt GA (1993) Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626, 167-174.

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.

Huneau D, Villaroya S, Scholler R (1988) Monoclonal antibody labelling of human spermatozoa: an electron microscope study. *Int J Androl*, 11: 13-24.

Hynes M, Poulsen K, Tessier-Lavigne M, Rosenthal A (1995) Control of neuronal diversity by the floor plate: contact-mediated induction of midbrain dopaminergic neurons. *Cell*, 80: 95-101.

Hynes M, Rosenthal A (1999) Specification of dopaminergic and serotonergic neurons in the vertebrate CNS. *Curr Opin Neurobiol*, 9: 26-36.

Iacopino AM, Christakos S (1990) Specific reduction of calcium-binding protein (28-kilodalton calbindin-D) gene expression in aging and neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 87: 4078-4082.

Iancu R, Mohapel P, Brundin P, Paul G (2005) Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behav Brain Res*, 162: 1-10.

Ito H, Goto S, Sakamoto S, Hirano A (1992) Calbindin D28k in the basal ganglia of patients with parkinsonism. *Ann Neurol*, 32: 543-550.

Jat PS, Sharp PA (1989) Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus gene are growth restricted at the nonpermissive temperature. *Mol Cell Biol*, 9: 1672-1681.

Jatzkewitz H (1978) *Neurochemie*. 1. Aufl., Thieme, Stuttgart.

Jeon BS, Jackson-Lewis V, Burke RE (1995) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time-course and morphology of cell death. *Neurodegeneration*, 4: 131-137.

Joosten EAJ, Veldhuis WB, Hamers FPT (2004) Collagen containing neonatal astrocytes stimulates regrowth of injured fibers and promotes modest locomotor recovery after spinal cord injury. *J Neurosci Res*, 77: 127-142.

Jung M, Krämer EM, Müller T, Antonicek H, Trotter J (1998) Novel pluripotential neural progenitor lines exhibiting rapid controlled differentiation to neurotransmitter receptor-expressing neurons and glia. *Eur J Neurosci*, 10: 3246-3256.

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

Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF, Wyatt RJ (1993) Absence of 6-hydroxydopamine in the rat brain after treatment with stimulants and other dopaminergic agents: a mass fragmentographic study. *J Neurochem*, 61: 1369-1375

Kathmann EC, Naylor S, Lipsky J (2000) Rat liver constitutive and phenobarbital-inducible cytosolic aldehyde dehydrogenases are highly homologous proteins that function as distinct isozymes. *Biochemistry*, 39: 11170-11176.

Keefer EW, Gramoski A, Gross GW (2001) NMDA receptor-dependent periodic oscillations in cultured spinal cord networks. *J Neurophysiol*, 86: 3030-3042.

Keirstead HS (2001) Stem cell transplantation into the central nervous system and the control of differentiation. *J Neurosci Res*, 63: 233-236.

Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay RDG (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, 418: 50-56.

Kirik D, Rosenblad C, Björklund A, Mandel RJ (2000) Long-term, rAAV-mediated gene transfer of GDNF in the rat Parkinson's model: intrastriatal but not intranigral transduction promotes functional regeneration in the lesioned nigrostriatal system. *J Neurosci*, 20: 4686-4700.

Kirik D (2001) Restorative and neuroprotective treatment strategies for Parkinson's disease. Doctoral dissertation, University of Lund (Sweden).

Kirik D, Georgievska B, Rosenblad C, Björklund A (2001) Delayed infusion of GDNF promotes recovery of motor function in the partial lesion model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, 13: 1589-1599.

Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jurecic J, Ullmer C, Lübbert H, Bujard H (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 93: 10933-10938.

Koch-Brandt C (1993) *Gentransfer*. Thieme, Stuttgart, New York.

Krobert K, Lopez-Colberg I, Cunningham LA (1997) Astrocytes promote or impair the survival and function of embryonic ventral mesencephalon co-grafts: Effects of astrocyte age and expression of recombinant brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*, 145: 511-523.

Labandeira-Garcia JL, Wictorin K, Cunningham ET, Björklund A (1991) Development of intrastriatal striatal grafts and their afferent innervation from the host. *Neuroscience*, 42: 407-426.

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

Lai CC, Gouras P, Doi K, Lu F, Kjeldbye H, Goff SP, Pawliuk R, Leboulch P, Tsang SH (1999) Tracking RPE transplants labelled by retroviral gene transfer with green fluorescent protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40: 2141-2160.

Laitinen LV, Bergenheim AT, Hariz MI (1992) Lecksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosurg*, 76: 53-61.

La Rosa FG, Adams FS, Krause GE, Meyers AD, Edwards-Prasad J, Kumar R, Freed CR, Prasad KN (1998) Inhibition of Proliferation and expression T-antigen in SV large T-antigen gene-induced immortalized cells following transplantation. *Cancer Lett*, 113: 55-60.

Le Douarin NM (1982) *The neural crest*. Cambridge University Press, Cambridge.

Le Douarin NM (2005) The Nogent Institute – 50 years of embryology. *Int J Dev Biol*, 49: 85-103.

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

Lendahl U, Zimmermann LB, McKay RDG (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60: 585-595.

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.

Li W, Cogswell CA, LoTurco JJ (1998) Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP. *J Neurosci*, 18: 8853-8862.

Li QJ, Tang YM, Liu J, Zhou DY, Li XP, Xiao SH, Jian DX, Xing YG (2007) Treatment of Parkinson disease with C17.2 neural stem cells overexpressing NURR1 with a recombinant replicon-deficient adenovirus containing the NURR1 gene. *Synapse*, 61: 971-977.

Lin LFH, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260: 1130-1132.

Liang CL, Sinton CM, German DC (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: Colocalization with Calbindin-D28K and calretinin. *Neuroscience*, 75: 523-533.

Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Donnan GA, Howells DW (1997) Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA following mechanical injury to mouse striatum. *Neuroreport*, 8: 3097-3101.

Lie DC, Dziewczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH (2002) The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci*, 22: 6639-6649.

Lindl T (2000) *Zell- und Gewebekultur*. 4. Aufl., Spektrum Verlag, Heidelberg-Berlin.

Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM (1998) Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol*, 149: 411-423.

Lisovoski F, Akli S, Peltekian E, Vigne E, Haase G, Perricaudet M, Dreyfus PA, Kahn A, Peschanski M (1997) Phenotypic alteration of astrocytes induced by ciliary neurotrophic factor in the intact adult brain, as revealed by adenovirus-mediated gene transfer. *J Neurosci*, 17: 7228-7236.

Liu HW, Kuang YJ, Wu JC, Ma KH, Wang SD, Liu JC (1999) Intrastriatal transplantation of sertoli cells may improve amphetamine-induced rotation and tyrosine hydroxylase immunoreactivity of the striatum in hemiparkinsonian rats. *Brain Res*, 838: 227-233.

Lozano AM, Lang AE, Hutchinson WD, Dostrovsky JO (1998) New developments in understanding the etiology of Parkinson's disease and its treatment. *Curr Opin Neurobiol*, 8: 783-790.

Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH (2003) Neural stem cells constitutively secrete

neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol*, 181: 115-129.

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

Lundberg C, Winkler C, Whittemore SR, Björklund A (1996) Conditionally immortalized neural progenitor cells grafted to the striatum exhibit site- specific neuronal differentiation and establish connections with the host globus pallidus. *Neurobiol Dis*, 3: 33-50.

Lundberg C, Martínez-Serrano A, Cattaneo E, McKay RDG, Björklund A (1997) Survival, integration, and differentiation of neural stem cell lines after transplantation to the adult rat striatum. *Exp Neurol*, 145: 342-360.

Lundberg C, Englund U, Trono D, Björklund A, Victorin K (2002) Differentiation of the RN33B cell into forebrain projection neurons after transplantation into the neonatal rat brain. *Exp Neurol*, 175: 370-387.

Luquin MR, Montoro RJ, Guillén J, Saldise L, Insausti R, Del Río J, López-Barneo J (1999) Recovery of chronic parkinsonian monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates into putamen. *Neuron*, 22: 743-750.

Maler L, Fibiger HC, McGeer PL (1973) Demonstration of the nigro-striatal projection by silver staining after nigral injections of 6-hydroxydopamine. *Exp Neurol*, 40: 505-515.

Mansuy IM, Winder DG, Moallem TM, Osman M, Mayford M, Hawkins RD, Kandel ER (1998) Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron*, 21: 257-265.

Marsden CD (1992) Dopamine and basal ganglia disorders in humans. *Seminars in the Neurosciences*, 4: 171-178.

Martinez-Serrano A, Björklund A (1997) Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci*, 20: 530-538.

Matus A (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci*, 11: 29-44.

McCaffery P, Dräger UC (1994) High levels of a retinoic acid-generating dehydrogenase in the meso-telencephalic dopaminergic system. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 91: 7772-7776.

McKay, R. D. G. (1989) The origins of cellular diversity in the mammalian central nervous system. *Cell*, 58: 815-821.

McPhail LT, McBride CB, McGraw J, Steeves JD, Tetzlaff W (2004) Axotomy abolishes NeuN expression in facial but not rubrospinal neurons. *Exp Neurol*, 185: 182-190.

Mendez I, Sadi D, Hong M (1996) Reconstruction of the nigrostriatal pathway by simultaneous intrastriatal and intranigral dopaminergic transplants. *J Neurosci*, 16: 7216-7227.

Metz GA, Tse A, Ballermann M, Smith LK; Fouad K (2005) The unilateral 6-OHDA rat model of Parkinson's disease revisited: an electromyographic and behavioural analysis. *Eur J Neurosci*, 22: 735-744.

Miljan EA, Hines SH, Pande P, Corteling RL, Hicks C, Zbarsky V, Umachandran M, Sowinski P, Richardson S, Tang E, Wieruszew M, Patel S, Stroemer P, Sinden JD (2008) Implantation of c-mycER^{TAM} immortalized human mesencephalic-derived clonal cell lines ameliorates behavior dysfunction in a rat model of Parkinson's disease. *Stem Cells Dev*, in press, doi: 10.1089/scd.2008.0078.

Modo M, Cash D, Mellodew K, Williams SCR, Fraser SE, Meade TJ, Price J, Hodges H (2002a) Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *Neuroimage*, 17: 803-811.

Modo M, Rezaie P, Heuschling P, Patel S, Male DK, Hodges H (2002b) Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Res*, 958: 70-82.

Modo M, Stroemer P, Tang E, Patel S, Hodges H (2002c) Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke*, 33: 2270-2278.

Moore AE, Cicchetti F, Hennen J, Isacson O (2001) Parkinsonian motor deficits are reflected by proportional A9/A10 dopamine neuron degeneration in the rat. *Exp Neurol* 172, 363-376.

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

Neale EA, MacDonald RL, Nelson PG (1978) Intracellular horseradish peroxidase injection for correlation of light and electron microscopic anatomy and synaptic physiology of cultured mouse spinal cord neurons. *Brain Res*, 152: 265-282.

Nelson EL, Liang CL, Sinton CM, German DC (1996) Midbrain dopaminergic neurons in the mouse: Computer-assisted mapping. *J Comp Neurol*, 369: 361-371.

Nikkhah G, Cunningham MG, Jödicke A, Knappe U, Björklund A (1994) Improved graft survival and striatal reinnervation by microtransplantation of fetal nigral cell suspension in the rat parkinson model. *Brain Res*, 633: 133-143.

Nikkhah G, Cunningham MG, Cenci MA, McKay RDG, Björklund A (1995) Dopaminergic microtransplants into the substantia nigra of neonatal rats with bilateral 6-OHDA lesions. I. Evidence for anatomical reconstruction of the nigrostriatal pathway. *J Neurosci*, 15: 3548-3561.

Nikkhah G (2005) Stammzellbasierte Rekonstruktion des dopaminergen Projektionssystems: Von der der Molekularbiologie zur klinischen Anwendung beim Morbus Parkinson. *Neuroforum*, 4: 120-127.

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.

Nottebohm F (1985) Neuronal replacement in adulthood. In: Hope for a new neurology, Nottebohm F (ed), New York, Ann N Y Acad Sci, 457: 143-161.

Olanow CW, Kordower JH, Freeman TB (1996) Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. Trends Neurosci, 19: 102-109.

Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. Ann Neurol, 54: 403-414.

Olson L, Strömberg I, Ebendal T, Seiker A, Hoffer B (1991) Grafting strategies in Parkinson's disease: the chromaffin alternative. Rest Neurol, 4: 3-14.

Olsson M, Bentlage C, Victorin K, Campbell K, Björklund A (1997) Extensive migration and target innervation by striatal precursors after grafting into the neonatal striatum. Neuroscience, 79: 57-78.

Olsson M, Bjerregaard K, Winkler C, Gates M, Björklund A, Campbell K (1998) Incorporation of mouse neural progenitors transplanted into the rat embryonic forebrain is developmentally regulated and dependent on regional and adhesive properties. Eur J Neurosci, 10: 71-85.

Onifer SM, White LA, Whittemore SR, Holets VR (1993) In vitro labeling strategies for identifying primary neural tissue and a neuronal cell line after transplantation in the CNS. Cell Transplant, 2: 131-149.

Pagano SF, Impagnatiello F, Girelli M, Cova L, Grioni E, Onofri M, Cavallaro M, Etteri S, Vitello F, Giombini S, Solero CL, Parati EA (2000) Isolation and characterization of neural stem cells from the adult human olfactory bulb. Stem Cells, 18: 295-300.

Palmer TD, Takahashi J, Gage FH (1997) The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. Mol Cell Neurosci, 8: 389-404.

Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P, Kaspar B, Stein SA, Gage FH (2001) Progenitor cells

from human brain after death. *Nature*, 411: 42-43.

Parkinson J (1817) *An essay on the shaking palsy*. Whittingham and Rowland, London.

Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed., Academic Press, London.

Peng WM, Yu LL, Bao CY, Liao F, Li XS, Zuo MX (2002) Transplanted neuronal precursors migrate and differentiate in the developing mouse brain. *Cell Res*, 12: 223-228.

Perrone-Capano C, Pernas-Alonso R, Di Porzio U (1999) Development of midbrain dopaminergic neurons. In: Perrone-Capano C, Pernas-Alonso R, Di Porzio U (eds) *Development of dopaminergic neurons*. RG Landes Company, Austin, 37-55.

Perrone-Capano C, Di Porzio U (2000) Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Int J Dev Biol*, 44: 679-687.

Peterson DA (2002) Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr Opin Pharmacol*, 2: 34-42.

Piccini P, Brooks DJ, Björklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehnström S, Widner H, Lindvall O (2000) Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nature Neurosci*, 2: 1137-1140.

Pierret P, Quenneville N, Vandaele S, Abbaszadeh R, Lanctôt C, Crine P, Doucet G (1998) Trophic and tropic effects of striatal astrocytes on co-grafted mesencephalic dopamine neurons and their axons. *J Neurosci Res*, 51: 23-40.

Polak JM, van Noorden S (1992) *An introduction to immunocytochemistry: current techniques and problems*. Revised edition. Oxford University Press, Oxford.

Potter ED, Ling ZD, Carvey PM (1999) Cytokine-induced conversion of mesencephalic-derived progenitor cells into dopamine neurons. *Cell Tissue Res*, 296: 235-246.

Rakic P (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res*, 33: 471-476.

Redies C, Lendahl U, McKay RDG (1991) Differentiation and heterogeneity in T-antigen immortalized precursor cell lines from mouse cerebellum. *J Neurosci Res*, 30: 601-615.

Redmond DE, Bjugstad KB, Teng YD, Ourednik V, Ourednik J, Wakeman DR, Parsons XH, Gonzalez R, Blanchard BC, Kim SU, Gu Z, Lipton SA, Markakis EA, Roth RH, Elsworth JD, Sladek JR, Sidman RL, Snyder EY (2007) Behavioral improvement in a primate Parkinson's model is associated with multiple homeostatic effects of human neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 104: 12175-12180.

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

Renfranz PJ, Cunningham MG, McKay RD (1991) Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell*, 66: 713-729.

Reuss B, Unsicker K (2000) Survival and differentiation of dopaminergic mesencephalic neurons are promoted by dopamine-mediated induction of FGF-2 in striatal astroglial cells. *Mol Cell Neurosci*, 16: 781-792.

Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S (1992) A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 12: 4565-4574.

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 27: 1707-1710.

Richardson PM (1994) Ciliary neurotrophic factor: a review. *Pharmacol Ther*, 63: 187-198

Ries V, Depboylu C, Arias-Carrion O, Oertel WH, Höglinger GU (2008) M. Parkinson – Zukünftige Therapieoptionen aus der Grundlagenforschung. *Neuroforum*, 3: 234-241

Rohkamm R (2000) Taschenatlas Neurologie. Thieme Verlag, Stuttgart-New York.

Romeis B (1989) Mikroskopische Technik. 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore.

Rosenblad C, Martinez-Serrano A, Björklund A (1998) Intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 82: 129-137.

Rossi F, Cattaneo E (2002) Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nature Rev Neurosci*, 3: 401-409.

Rubio FJ, Bueno C, Villa A, Navarro B, Martinez-Serrano A (2000) Genetically perpetuated human neural stem cells engraft and differentiate into the adult mammalian brain. *Mol Cell Neosci*, 16: 1-13.

Sacchetti P, Carpentier R, Segard P, Olive-Cren C, Lefebvre P (2006) Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res*, 34: 5515-5527.

Sanai N, Tramotin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Verdugo JMG, Berger MS, Alvarez-Buylla A (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427: 740-744

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

Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JPH, Conneely OM (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype

and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 95: 4013-4018.

Sauer FC (1935) Mitosis in the neural tube. *J Comp Neurol*, 62: 377-405.

Schallert T, Lindner MD (1990) Rescuing neurons from trans-synaptic degeneration after brain damage: helpful, harmful, or neutral in recovery of function? *Can J Psychol*, 44: 276-292.

Schallert T, Tillerson (1999) Intervention strategies for degeneration of dopamine neurons in Parkinsonism: optimising behavioral assessment of outcome. In: Clifton NJ (Hrsg.) *Innovative models of CNS disease: from molecule to therapy*. Totowa, New Jersey, Humana press. Seiten 131-151.

Schmechel D, Marangos PJ, Brightman M (1978) Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature*, 276: 834-836.

Schröder L (1986) *Morphologische und physiologische Daten der Haus- und Laboratoriumstiere*. 1. Aufl., Hirzel, Leipzig.

Schwartz RKW, Huston JP (1996a) Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. *Prog Neurobiol*, 49: 215-266.

Schwartz RKW, Huston JP (1996b) The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioural brain research: Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*, 50: 275-331.

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

Sensenbrenner M, Lucas M, Deloulme JC (1997) Expression of two neuronal markers, growth associated protein 43 and neuron-specific enolase, in rat glial cells. *J Mol Med*, 75: 653-663.

Shelanski ML (1987) Neurofilaments. In: Adelman G (ed) Encyclopedia of neuroscience, Birkhäuser, Basel-Boston-Stuttgart, 787-788.

Shihabuddin LS, Hertz JA, Holets VR, Whittemore SR (1995) The adult CNS retains the potential to direct region- specific differentiation of a transplanted neuronal precursor cell line. J Neurosci, 15: 6666-6678.

Sholl DA (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. J Anat, 87: 387-406.

Simon HH, Saueressig H, Wurst W, Goulding MD, O'Leary DD (2001) Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. J Neurosci, 21: 3126-3134.

Simon HH, Bhatt L, Gherbassi D, Sgado P, Alberi L (2003) Midbrain dopaminergic neurons. Determination of their developmental fate by transcription factors. Ann NY Acad Sci, 991: 36-47.

Singh N, Pillay V, Choonara YE (2007) Advances in the treatment of Parkinson's disease. Prog Neurobiol, 81: 29-44.

Skogh C, Campbell K (2003) Homotopic glial regulation of striatal projection neuron differentiation. Neuroreport, 14: 1037-1040.

Smidt MP, Asbreuk CHJ, Cox JJ, Chen H, Johnson RL, Burbach JPH (2000) A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires *Lmx1b*. Nature Neurosci, 3: 337-341.

Snyder EY (1994) Grafting immortalized neurons to the CNS. Curr Opin Neurobiol, 4: 742-751.

Spemann H, Mangold H (1924) Über Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organistoren. Arch mikr. Anat und Entw mech, 100: 599-638.

Spemann H (1936) Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung. Verlag von

Julius Springer, Berlin.

Song HJ, Stevens CF, Gage FH (2002) Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature Neurosci*, 5: 438-445.

Specht LA, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ (1981) Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. *J Comp Neurol*, 199: 233-253.

Storch A, Lester HA, Boehm BO, Schwarz J (2003) Functional characterization of dopaminergic neurons derived from rodent mesencephalic progenitor cells. *J Chem Neuroanat*, 26: 133-142.

Strömberg I, Björklund L, Johansson M, Tomac A, Collins F, Olson L, Hoffer B, Humpel C (1993) Glial cell line- derived neurotrophic factor is expressed in the developing but not adult striatum and stimulates developing dopamine neurons in vivo. *Exp Neurol*, 124: 401-412.

Sun Y, Nadal-Vicens M, Misono S, Lin MZ, Zubiaga A, Hua X, Fan G, Greenberg ME (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell*, 104: 365-376.

Svendsen CN, Rosser AE (1995) Neurons from stem cells? *Trends Neurosci*, 18: 465-467.

Svendsen CN, Clarke DJ, Rosser AE, Dunnett SB (1996) Survival and differentiation of rat and human epidermal growth factor-responsive precursor cells following grafting into the lesioned adult central nervous system. *Exp Neurol*, 137: 376–388.

Svendsen CN, Caldwell MA, Shen J, ter Borg MG, Rosser AE, Tyers P, Karmiol S, Dunnett SB (1997) Long-term survival of human central nervous system progenitor cells transplanted into a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 148: 135–146.

Svendsen CN, Bhattacharyya A, Tai YT (2001) Neurons from stem cells: preventing an identity crisis. *Nat Rev Neurosci*, 2: 831-834.

Temple S, Alvarez-Buylla A (1999) Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 9: 135-141.

Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature*, 414: 112-117.

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

Thompson WG (1890) Successful brain grafting. *NY Med J*, 51: 701-702.

TolosaE, Marti MJ, Valdeoriola F, Molinuovo JL (1998) History of levodopa and dopamine agonists in Parkinson's disease treatment. *Neurology*, 50 (Suppl): 2-10.

Toulouse A, Sullivan AM (2008) Progress in Parkinson's disease – Where do we stand? *Prog Neurobiol*, 85: 376-392

Trenkner E (1991) Cerebellar cells in culture. In: *Culturing nerve cells*. Banker G, Goslin K (eds.), MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA. pp. 283-307.

Tretiakoff MC (1919) Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering. Thèse, Université de Paris.

Tsai RYL, McKay RDG (2002) A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev*, 16: 2991-3003.

Ungerstedt U (1968) 6-Hydroxydopamine-induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*, 5: 107-110.

Ungerstedt U, Arbuthnott GW (1970) Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res*, 24: 485-493.

Ungerstedt U (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system in the rat brain. *Acta Physiol Scand*, 82 (Suppl. 376): 69-93.

Unsicker K, Suter-Crazzolara C, Krieglstein K (1998) Neurotrophic roles of GDNF and related receptors. In: Hefti F (ed) *Handbook of experimental pharmacology. Neurotrophic factors*, 134. Springer Verlag, Berlin, 189-224.

Vernon PS, Griffin DE (2005) Characterization of an in vitro model of alphavirus infection of immature and mature neurons. *J Virol*, 79: 3438-3447.

Voorn P, Kalsbeek A, Jorritsma-Byham B, Groenewegen HJ (1988) The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience*, 25: 857-887.

Wagner J, Akerud P, Castro DS, Holm PC, Canals JM, Snyder EY, Perlmann T, Arenas E (1999) Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nature Biotech*, 17: 653-659.

Wallen A, Zetterström RH, Solomin L, Arvidsson M, Olson L, Perlmann T (1999) Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopaminergic progenitor cells in NURR1 mutant mice. *Exp Cell Res*, 253: 737-746.

Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NPC, Perlmann T (2003) Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature*, 423: 555-560.

Wang X, Lu Y, Zhang H, Wang K, He Q, Wang Y, Liu X, Li L, Wang X (2004) Distinct efficacy of pre-differentiated versus intact fetal mesencephalon-derived human neural progenitor cells in alleviating rat model of Parkinson's disease. *Int J Devl Neurosci*, 22: 175-183.

Weinelt S, Peters S, Bauer P, Mix E, Haas SJP, Dittmann A, 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.

Weintraub D, Comella L, Horn S (2008) Parkinson's disease – Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care*, 14: S40-S48.

Weiss S, Reynolds BA, Vescovi AL, Morshead C, Craig CC, van der Kooy D (1996) Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends Neurosci*, 19: 387-393.

Weiss ML, Mitchell KE, Hix JE, Medicetty S, El-Zarkouny SZ, Grieger D, Troyer DL (2003) Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp Neurol*, 182: 288-299.

Whittemore SR, White LA (1993) Target regulation of neuronal differentiation in a temperature-sensitive cell line derived from medullary raphe. *Brain Res*, 615: 27-40.

Whittemore SR, Onifer SM (2000) Immortalized neural cell lines for CNS transplantation. *Prog Brain Res*, 127: 49–65.

Victorin K, Clarke DJ, Bolam JP, Björklund A (1990) Fetal striatal neurons grafted into the obotenate lesioned adult striatum: efferent projections and synaptic contacts in the host globus pallidus. *Neuroscience*, 37: 301-315.

Winkler C, Fricker RA, Gates MA, Olsson M, Hammang JP, Carpenter MK, Björklund A (1998) Incorporation and glial differentiation of mouse EGF-responsive neural progenitor cells after transplantation into the embryonic rat brain. *Mol Cell Neurosci*, 11: 99-116.

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

Wood JN, Anderton BH (1981) Monoclonal antibodies to mammalian neurofilaments. *Biosci Rep*, 1: 263-268

Wree A, Weinreich K, Cattaneo E, Rolfs A, Haas SJP (2002) Immunohistochemical differentiation of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A-cells *in vitro*. *Ann Anat*, 184 (Suppl): 149-150.

Yamada T, McGeer PL, Baimbridge KG, McGeer EG (1990) Relative sparing in Parkinson's disease of substantia nigra dopamine neurons containing calbindin-D28K. *Brain Res*, 526: 303-307.

Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, Yu G, Xu L, Maki M, Kim SU, Borlongan CV (2006) Transplantation of human neural stem cells exerts neuroprotection in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 26: 12479-12511.

Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA, Rosenthal A (1998) FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in anterior neural plate. *Cell*, 93: 755-766.

Young AJ, Hay JB (1995) Rapid turnover of the recirculating lymphocyte pool in vivo. *Int Immunol*, 7: 1607-1615.

Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in *Nurr1*-deficient mice. *Science*, 276: 248-250.

Zhong L, Kane DJ, Bredesen DE (1993) Bcl-2 blocks glutamate toxicity in neural cell lines. *Mol Brain Res*, 19: 353-355.

Zigmond MJ, Keefe KA (1998) 6-Hydroxydopamine as a tool for studying catecholamines in adult animals. In: Kostrzewa RM (ed) *Highly selective neurotoxins*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 75-107.

Zilles K, Rehkämper G (1998) *Funktionelle Neuroanatomie*. 3. Aufl., Springer Verlag, Berlin.

5.4 Publikationen

5.4.1 Veröffentlichungen

- 1 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.
- 2 Haas SJP, Wree A (2002) Dopaminergic differentiation of the Nurr1-expressing immortalized mesencephalic cell line CSM14.1 *in vitro*. *J Anat*, 201: 61-69.
- 3 Weinelt S, Peters S, Bauer P, Mix E, Haas SJP, Dittmann A, 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.
- 4 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.
- 5 Schmitt O, Preuß S, Haas SJP (2004) Comparison of contrast, sensitivity and efficiency of signal amplified and nonamplified immunohistochemical reactions suitable for videomicroscopy-based quantification and neuroimaging. *Brain Res Protoc*, 12: 157-171.
- 6 Hovakimyan M*, Haas SJP*, Schmitt O, Gerber B, Wree A, Andressen C (2006) Mesencephalic human neural progenitor cells transplanted into the neonatal hemiparkinsonian rat striatum differentiate into neurons and improve motor behaviour. *J Anat*, 209: 721-732.
- 7 Haas SJP*, Beckmann S*, Petrov S, Andressen C, Wree A, Schmitt O (2007) Transplantation of immortalized mesencephalic progenitors (CSM14.1-cells) into the neonatal Parkinsonian rat caudate putamen. *J Neurosci Res*, 85: 778-786.
- 8 Schmidt A, Haas SJP, Hildebrandt S, Scheibe J, Eckhoff B, Racek T, Kempermann G, Wree A, Pützer BM (2007) Selective targeting of adenoviral vectors to neural precursor in the hippocampus of adult mice: new prospects for in situ gene therapy. *Stem Cells*, 25: 2910-2918.
- 9 Hawlitschka A, Haas SJP, Schmitt O, Weiss DG, Wree A (2007) Effects of proteasome inhibition on catecholaminergic cells in the brain, adrenal medulla and carotid body in Wistar rats. *Brain Res* 1173: 137-144.
- 10 Haas SJP*, Petrov S*, Kronenberg G, Schmitt O, Andreas Wree (2008) Orthotopic transplantation of immortalized mesencephalic progenitors (CSM14.1-cells) into the substantia nigra of Hemiparkinsonian rats induces neuronal differentiation and motoric improvement. *J Anat*, 212: 19-30.

- 11 Strauss U, Zhou FW, Henning J, Battefeld A, Wree A, Köhling R, Haas SJP, Benecke R, Rolfs A, Gimsa U (2008) Increasing extracellular potassium results in subthalamic neuron activity resembling that seen in a 6-hydroxydopamine lesion. *J Neurophysiol*, 99: 2902-2915.
- 12 Hovakimyan M*, Haas SJP*, Schmitt O, Gerber B, Wree A, Andressen C (2008) Mesencephalic human neural progenitor cells transplanted into the adult hemiparkinsonian rat striatum lack dopaminergic differentiation but improve motor behavior. *Cells Tissue Organs*, in press, doi: 10.1159/000140680.
- 13 Hovakimyan M, Weinreich K, Haas SJP, Cattaneo E, Rolfs A, Wree A (2008) *In vitro* characterization of embryonic ST14A-cells. *Int J Neurosci*, accepted.

(* Zu gleichen Teilen beteiligt, contributed equally)

5.4.2 Posterbeiträge, Vorträge und sonstige Veröffentlichungen

- 1 Nichtradioaktiver Zellproliferationsnachweis unter Verwendung von 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) im Gehirn des Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern (1997).
- 2 Haas S, Thode C, Linder S, Güttinger HR (1997) Side and time restricted cell proliferation in the brain of two songbird species. *Proceedings of the Göttinger Neurobiology Conference – Abstract Nr. 957*.
- 3 Haas S, Bauer P, Wree A (1999) Transplantation PKH26-markierter Zellen in das Striatum der Ratte. *Ann Anat* 181: 322 – Abstract.
- 4 Haas S, Bauer P, Wree A (1999) PKH26-markierte Zellen lassen sich in vitro und in vivo immunhistochemisch charakterisieren. *Ann Anat* 181 (Suppl): 266-267 – Abstract.
- 5 Haas S, Bauer P, Cattaneo E, Weinreich K, Rolfs A, Wree A (1999) Intrazerebral transplantierte ST14A-Zellen exprimieren neuronale Marker und beeinflussen das Rotationsverhalten in einem Rattenmodell des Morbus Parkinson. *Ann Anat* 181 (Suppl): 109-110 – Abstract.
- 6 Haas SJP, Bauer P, Cattaneo E, Rolfs A, Wree A (1999) Transplantation of the PKH26-labeled, immortalized striatal cell line ST14A in a rat model of Parkinson's Disease. *Proceedings of the Göttinger Neurobiology Conference - Abstract Nr. 825*.
- 7 Bauer P, Haas SJP, Weinreich C, Knoblich R, Cattaneo E, Benecke R, Wree A, Rolfs A (1999) Intracerebrally grafted neuronal progenitor cells (ST14A) express neuronal

- markers and ameliorate rotational behaviour in a rat model of Parkinson's Disease. J Neurol, 246 (Suppl 1): 47 - Abstract Nr. 201.
- 8 Haas SJP, Wree A (2000) Immunohistochemical characterization of the immortalized rat nigral cell line CSM14.1 *in vitro*. Ann Anat 182 (Suppl): 172-173 – Abstract.
 - 9 Haas SJP, Wree A (2000) Immortalized rat nigral progenitor cells of the cell line CSM14.1 as a model to study the influences of trophic factors on neural and glial development in vitro. Restor Neurol Neurosci, 16: 51-52 – Abstract.
 - 10 Haas SJP, von Widdern OC, Bauer P, Rolfs A, Wree A (2000) The immortalized rat nigral cell line CSM14.1 as a source for intracerebral grafting in hemiparkinsonian rats. Europ J Neurosci, 12 (Suppl 11): 293 – Abstr.- Nr. 130.18.
 - 11 Haas SJP, Weinelt S, Cardinal v. Widdern O, Bauer P, Mix E, Cattaneo E, Rolfs A, Wree A (2000) Intracerebral transplantation of an immortalized neural stem cell line transfected to secrete ciliary neurotrophic factor (CNTF). ISDN2000, Abstract Volume: 64- 65 – Abstract.
 - 12 Haas SJP, Cardinal v. Widdern O, Wree A (2000) *In vitro* differentiation of neural progenitor cells of the cell line CSM14.1. ISDN2000, Abstract Volume: 64 – Abstract.
 - 13 Haas SJP, von Widdern OC, Wree A (2001) Transplantation of immortalized neural stem cells in the brain of Hemiparkinsonian rats. Ann Anat, 183 (Suppl): 186-187 – Abstract.
 - 14 Bauer P, Haas SJP, Schubert B, Weinelt S, Cattaneo E, Benecke R, Wree A, Rolfs A (2000) Transplantation of neural progenitor cells (ST14A) in a rat model of Parkinson's disease ameliorates the functional deficits. Movement Disorders, 15 (Suppl 3): 21 – Abstract.
 - 15 Haas SJP, von Widdern OC, Bauer P, Rolfs A, Wree A (2001) Intracerebral grafting of immortalized rat nigral progenitor cells in Hemiparkinsonian rats. Ann Anat, 183 (Suppl): 237-238 – Abstract.
 - 16 von Widdern OC, Haas SJP, Wree A (2001) Characterisation of the immortalised neural progenitor cell line CSM14.1 *in vitro*. Ann Anat, 183 (Suppl): 305 – Abstract.
 - 17 Haas SJP, von Widdern OC, Wree A (2001) Dopaminergic differentiation of a Nurr1-expressing immortalized neural stem cell line (CSM14.1) in vitro. Proceedings of the Göttinger Neurobiology Conference – Abstract-Nr. 953.
 - 18 von Widdern OC, Haas SJP, Wree A (2001) Differentiation of Nurr1-expressing neural stem cells. World J Biol Psych, 2 (Suppl 1): 286.

- 19 Schrag HJ, Karwath D, Grub C, Wree A, Haas SJP, Hopt UT, Noack T (2001) *In vitro* Modell eines glattmuskulären Neosphinkters: Die elektrodynamische Relaxationsplastik. Biomed Tech, 46 (Suppl 1): 294-295 – Abstract.
- 20 Wree A, Weinreich K, Cattaneo E, Rolfs A, Haas SJP (2002) Immunohistochemical differentiation of embryonic striatal conditionally immortalized ST14A- cells *in vitro*. Ann Anat, 184 (Suppl): 149-150 – Abstract.
- 21 Haas SJP, Wree A (2002) Nurr1-positive immortalisierte mesenzepale Progenitorzellen der Zelllinie CSM14.1 zeigen *in vitro* eine dopaminerge Differenzierung. Ann Anat, 184 (Suppl): 44 – Abstract.
- 22 Haas SJP, Wree A (2002) Dopaminerge Differenzierung Nurr1-exprimierender immortalisierter mesenzephaler Progenitorzellen der Zelllinie CSM14.1 *in vitro*. Ann Anat, 184: 107 – Abstract.
- 23 Haas SJP, Wree A (2002) Cultured NURR1-positive immortalized mesencephalic progenitor cells (CSM14.1) corroborate the *in vivo* differentiation of rodent mesencephalic dopaminergic neurons. FENS Abstr. Vol 1, A 036.17.
- 24 Haas SJP, Schmitt O, Petrov S, Ahrens A, Wree A (2002) Increase of CNTF after a quinolinic acid lesion in the rat caudate putamen investigated with immunohistochemistry and Western blotting. Restor Neurol Neurosci, 20: 268 – Abstract.
- 25 Petrov S, Haas SJP, Wree A (2003) Dopaminergic differentiation of immortalized neural progenitors (CSM14.1) after intranigral grafting Ann Anat, 185: 107-108 – Abstract.
- 26 Ahrens A, Haas SJP, Wree A (2003) Expression of the Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) in the caudate putamen of the rat after a quinolinic acid lesion. Ann Anat, 185, 45-46 – Abstract.
- 27 Haas SJP, Ahrens A, Schmitt O, Wree A (2003) Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to an increase of Ciliary Neurotrophic Factor. Proceedings of the 29th Göttinger Neurobiology Conference – Abstr. Nr. 26 (pp144-145).
- 28 Petrov S, Haas SJP, Kronenberg G, Wree A (2004) Intranigraly grafted neural stem cells (CSM14.1) have a therapeutic effect in hemiparkinsonian rats. Ann Anat, 186 (Suppl): 206-207 – Abstract.
- 29 Haas SJP, Beckmann S, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) Intracerebrally transplanted CSM14.1-cells lead to preferential forelimb use in parkinsonian neonatal rats. FENS Abstr., A019.22, Vol.2 – Abstract.

-
- 30 Haas SJP (2004) Human embryonic stem cells. AY Chiu, MS Rao (eds.), Humana Press (2004). Ann Anat, 186: 450 – Book Review.
 - 31 Haas SJP, Beckmann S, Schmitt O, Petrov S, Wree A (2005) Transplantation of CSM14.1-cells in the neonatal dopaminergic deafferented striatum leads to a therapeutic improvement and dopaminergic reinnervation. Ann Anat, 187 (Suppl): 41 – Abstract.
 - 32 Hovakimyan M, Haas SJP, Briesse V, Ulfing N, Wree A, Andressen C (2005) Human neural stem cells differentiate into neurons and astrocytes after transplantation into the adult rat striatum. Ann Anat, 187 (Suppl): 113 – Abstract.
 - 33 Haas SJP (2006) Basic cell culture protocols. CD Helgason, CL Miller (eds.), Humana Press (2005). Ann Anat, 188: 285-286 – Book Review.

5.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. A. Wree für die Bereitstellung des Themas und der Laborarbeitsplätze. Ausserdem möchte ich ihm für die ausserordentliche fachliche Betreuung bei wissenschaftlichen Fragen, sowie auch seiner Hilfe bezüglich des anfangs nicht einfach zu bewältigenden anatomischen Unterrichts danken. Dass man auch in privaten Dingen seinen Rat erfragen konnte und man somit manche Klippe umschiffte, hat mir sehr geholfen.

Prof. Dr. D.G. Weiss danke ich ebenfalls für die Betreuung und die wertvollen Hilfestellungen beim Verfassen der Promotionsarbeit, sowie für seine vielfältigen Unterstützungen.

Den beiden leider viel zu früh verstorbenen ehemaligen Meistern der Feinmechanischen Werkstatt (Institut für Physiologie, Universität Rostock) Herrn Stave und Herrn Trinks gilt mein Dank für die Mithilfe beim Bau der Rotometereinheiten. Ausserdem danke ich Herrn Dr. Janik (Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, Universität Rostock) für den Bau der elektronischen Komponenten dieser Rotometer.

Den ehemaligen MTAs im Institut für Anatomie Frau Kuhnke, Frau Waldmann und Frau Wilms gilt ebenso mein Dank für die geleistete Arbeit.

Dr. Ole Cardinal von Widdern danke ich für die Einführung in die Western Blot Technik.

Prof. Dr. T. Beck möchte ich für die kritischen Diskussionen und Anmerkungen zu meiner Forschung während unserer gemeinsamen Zeit am Institut für Anatomie danken. Nur durch ständiges kritisches Hinterfragen (auch) seiner eigenen Ergebnisse kommt man weiter und lernt das wissenschaftliche Disputieren.

Prof. Dr. Oliver Schmitt möchte ich zunächst für die fachliche Hilfe bei Fragen der Stereologie und der statistischen Auswertung danken. Ausserdem gilt ihm mein Dank für die vielfältige freundschaftliche Unterstützung, die letztendlich mit zur Erstellung dieser Arbeit geführt hat.

Ferner gilt mein Dank allen Kolleginnen und Kollegen, mit denen ich zusammen arbeiten durfte. Namentlich möchte ich hier besonders erwähnen: Stanislav Petrov, Aline Ahrens, Stephan Beckmann, Marina Hovakimyan, Alexander Hawlitschka und PD Dr. Christian Andressen.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und Förderung bei der Erstellung dieser Arbeit.

5.6 Lebenslauf von Stefan Jean-Pierre Haas

- 23.1.1971, geboren in München, Deutsche und Französische Staatsbürgerschaft
- 31.5.1990, Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife des Landes Rheinland-Pfalz an der Integrierten Gesamtschule Ernst Bloch in Ludwigshafen/Rh. (Gesamtnote 2,4)
- 1.7.1990-30.6.1991, Ableistung des Grundwehrdienstes bei der Deutsch/Französischen Brigade in Stetten am kalten Markt (Baden-Württemberg)
- Oktober 1991, Aufnahme des Diplomstudiengangs Biologie an der Universität Kaiserslautern
- 6.8.1997, Diplomprüfung im Fachbereich Biologie an der Universität Kaiserslautern (Gesamtnote 1,93), Thema der Diplomarbeit: Nichtradioaktiver Zellproliferationsnachweis unter Verwendung von 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdU) im Gehirn des Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). Betreut durch Prof. Dr. H.R. Güttinger.
- ab September 1997, Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anatomie an der Universität Rostock in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Wree. Beginn der Dissertation mit dem Thema: Charakterisierung neuraler Stammzellen (CSM14.1-Zellen) *in vitro* und *in vivo* nach Transplantation in das Striatum von Hemiparkinson-Ratten.
- Forschungspreis: Dr. Wendroth Posterpreis der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock (10.11.1999)
- Mitgliedschaft in Fachgesellschaften:
- Neurowissenschaftliche Gesellschaft
Anatomische Gesellschaft
International Society for Developmental Neuroscience

Unterrichtserfahrung:**Abteilung für Zoologie, Fachbereich Biologie, Universität Kaiserslautern:***Unterricht im Fach Diplom-Biologie*

- Zoologisches Anfängerpraktikum: SS 95, SS 96, SS 97
- Zoologische Bestimmungsübungen: WS 95/96
- Fortgeschrittenenkurs: Anatomie, Histologie u. Embryologie der Wirbeltiere: WS 96/97

Anatomisches Institut, Medizinische Fakultät, Universität Rostock*Unterricht im Fach Humanmedizin*

- Präparierkurs für Mediziner: WS 97/98, WS 98/99, WS 99/00, WS 00/01, WS 01/02, WS 02/03, WS 03/04, WS 04/05, WS 05/06, WS 06/07, SS 07, SS 08
- Mikroskopierkurs für Mediziner: SS 98, SS 99, SS 02, SS 03, SS 04, SS 05, SS 06, WS 07/08
- Anatomieseminar mit klinischen Bezügen: SS 01

Unterricht im Bachelorstudiengang „Medizinische Biotechnologie“

- Zellbiologie- und Histologiekurs: WS 05/06, WS 06/07, WS 07/08
- Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie: SS 05, SS 06

Teilnahme an Summer Schools

- | | |
|-----------------------|---|
| August 1999 | Route28-Meeting “Therapeutic potential of neural stem cells in the adult CNS“ in Port Ludlow (Seattle, USA). |
| August 2001 | Route28-Meeting “The Id of stem cells“ in Port Ludlow (Seattle, USA). |
| August/September 2003 | Baltic Summer School „Neurodegenerative diseases: Mechanisms and principles of rational treatment“ an den Universitäten Kiel/Lund (Schweden). Laborkurs „Behavioural testing of animal models of Parkinson’s disease“ in Lund betreut durch Prof. A. Cenci-Nilsson, Prof. Patrik Brundin und Dr. Deniz Kirik. |

Rostock, im Oktober 2008