

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

**Charakterisierung der neuronalen  
Progenitorzelllinie CSM14.1**  
*in vitro*

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

vorgelegt von  
Birthe-Christine Weiss geb. Eckhoff  
geboren am 26. Januar 1982 in Stade

Rostock, 2011

Meinen Eltern

Angelika und Peter-Ulrich Eckhoff.

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter Prof. Dr. med. Oliver Schmitt, Institut für Anatomie, Rostock

2. Gutachter Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Jens Pahnke, Klinik und Poliklinik für  
Neurologie, Universitätsklinikum Rostock

3. Gutachter Prof. Dr. med. Alexander Storch, Neurologische Universitätsklinik,  
Dresden

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 31.01.2011

Datum der Verteidigung: 06.06.2012

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Parkinson-Krankheit (ICD-10: G 20)</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Therapeutische Möglichkeiten</b>	<b>12</b>
<b>1.2.1 Medikamentöse Therapie</b>	<b>12</b>
<b>1.2.2 Tiefe Hirnstimulation</b>	<b>13</b>
<b>1.2.3 Zellersatztherapie</b>	<b>14</b>
<b>1.3 Dopaminerge Differenzierung bei der Ratte</b>	<b>16</b>
<b>1.4 Zelllinie CSM14.1</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Fragestellung dieser Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Kultur der Zelllinie CSM14.1</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Immuncytochemie und stereologische Auswertung</b>	<b>20</b>
<b>2.2.1 Kultivierung und Differenzierung für die Immuncytochemie</b>	<b>20</b>
<b>2.2.2 Primärantikörper für die Immuncytochemie</b>	<b>21</b>
<b>2.2.3 Durchführung der Immunfluoreszenz an Zellkulturen</b>	<b>24</b>
<b>2.2.4 Stereologische Auswertung mit Olympus BX 51</b>	<b>24</b>
<b>2.2.5 Lösungen für die Immuncytochemie</b>	<b>26</b>
<b>2.3 Proteomics</b>	<b>27</b>
<b>2.3.1 Kultivierung und Differenzierung für Proteomics</b>	<b>28</b>

---

2.3.2	Homogenisation des Zellmaterials	28
2.3.3	Proteinbestimmung nach Bradford	29
2.3.4	Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung	29
2.3.5	Zweite Dimension – SDS-Gelelektrophorese	30
2.3.6	Auswertung der digitalisierten Gele	31
2.3.7	MALDI-TOF, Peptid-Massen-Fingerabdruck	32
2.3.8	Lösungen Proteomics	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1	Immuncytochemie und stereologische Auswertung	35
3.1.1	Nestin	35
3.1.2	Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	37
3.1.3	Neuronal Nuclei (NeuN)	39
3.1.4	Tyrosinhydroxylase (TH)	41
3.2	Proteomics	43
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1	Immuncytochemie und stereologische Auswertung	50
4.2	Proteomics	54
<b>5</b>	<b>Thesen</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
6.1	Internet-Quellen	75
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>76</b>
7.1	Ergebnisse der Zellzählungen	76
7.2	Ergebnisse der manuellen Spot-Detektion	78
7.3	Verwendete Materialien	79
7.4	Publikationen	82
7.4.1	Veröffentlichungen	82

---

7.4.2	Posterbeitrag	82
7.5	Danksagung	83

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b>	<b>Aktivität der Basalganglienschleife beim Gesunden (vereinfacht)</b>	<b>___ 10</b>
<b>Abbildung 2:</b>	<b>Aktivität der Basalganglienschleife beim idiopathischen Parkinson Syndrom (vereinfacht)</b>	<b>_____ 11</b>
<b>Abbildung 3:</b>	<b>CSM14.1-Zellen transfiziert mit einem GFP (green fluorescent protein)-codierenden adenoviralen Vektor</b>	<b>_____ 17</b>
<b>Abbildung 4:</b>	<b>Beispielhafte Darstellung eines Zählrasters auf der Fläche eines Objektträgers</b>	<b>_____ 25</b>
<b>Abbildung 5:</b>	<b>Nestin-positive Zellen in Prozent an der Gesamtzellzahl</b>	<b>_____ 35</b>
<b>Abbildung 6:</b>	<b>CSM14.1-Zellen gefärbt gegen den Progenitorzellmarker Nestin (rot) und den Kernfarbstoff DAPI (blau)</b>	<b>_____ 36</b>
<b>Abbildung 7:</b>	<b>GFAP-positive Zellen in Prozent an der Gesamtzellzahl</b>	<b>_____ 37</b>
<b>Abbildung 8:</b>	<b>CSM14.1-Zellen gefärbt gegen den Astrozytenmarker GFAP (rot) und den Kernfarbstoff DAPI (blau)</b>	<b>_____ 38</b>
<b>Abbildung 9:</b>	<b>NeuN-positive Zellen in Prozent an der Gesamtzellzahl</b>	<b>_____ 39</b>
<b>Abbildung 10:</b>	<b>CSM14.1-Zellen gefärbt gegen den Neuronenmarker NeuN (rot) und den Kernfarbstoff DAPI (blau)</b>	<b>_____ 40</b>
<b>Abbildung 11:</b>	<b>TH-positive Zellen in Prozent an der Gesamtzellzahl</b>	<b>_____ 41</b>
<b>Abbildung 12:</b>	<b>CSM14.1-Zellen gefärbt gegen den dopaminergen Marker TH (rot) und den Kernfarbstoff DAPI (blau)</b>	<b>_____ 42</b>
<b>Abbildung 13:</b>	<b>Referenzgel</b>	<b>_____ 43</b>
<b>Abbildung 14:</b>	<b>Experimental-Gel Tag 28 (Beispiel)</b>	<b>_____ 44</b>
<b>Abbildung 15:</b>	<b>Quantitative Verteilung der nur bei differenzierten CSM14.1-Zellen exprimierten Proteine (absent)</b>	<b>_____ 48</b>
<b>Abbildung 16:</b>	<b>Quantitative Verteilung der bei differenzierten CSM14.1-Zellen höher exprimierten Proteine (UP)</b>	<b>_____ 48</b>
<b>Abbildung 17:</b>	<b>Quantitative Verteilung der bei differenzierten CSM14.1-Zellen geringer exprimierten Proteine (DOWN)</b>	<b>_____ 49</b>

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b>	<b>Zusammensetzung Kultur- und Differenzierungsmedium _____</b>	<b>19</b>
<b>Tabelle 2:</b>	<b>Belichtungszeiten für Zellzählung _____</b>	<b>25</b>
<b>Tabelle 3:</b>	<b>Lösungen zur Fixierung der Zellen _____</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 4:</b>	<b>Lösungen für die Immunfluoreszenz _____</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 5:</b>	<b>Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper _____</b>	<b>26</b>
<b>Tabelle 6:</b>	<b>Lösungen für die Proteinaufreinigung _____</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 7:</b>	<b>Lösungen für die Isoelektrische Fokussierung _____</b>	<b>33</b>
<b>Tabelle 8:</b>	<b>Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese _____</b>	<b>34</b>
<b>Tabelle 9:</b>	<b>Lösungen zum Fixieren, Färben und Aufbewahren der SDS-Gele ____</b>	<b>34</b>
<b>Tabelle 10:</b>	<b>Ergebnisse der Proteinidentifikation _____</b>	<b>45</b>
<b>Tabelle 11:</b>	<b>Ergebnisse der Zellzählungen für Nestin _____</b>	<b>76</b>
<b>Tabelle 12:</b>	<b>Ergebnisse der Zellzählungen für GFAP _____</b>	<b>76</b>
<b>Tabelle 13:</b>	<b>Ergebnisse der Zellzählungen für NeuN _____</b>	<b>77</b>
<b>Tabelle 14:</b>	<b>Ergebnisse der Zellzählungen für TH _____</b>	<b>77</b>
<b>Tabelle 15:</b>	<b>Ergebnisse der manuellen Spot-Detektion _____</b>	<b>78</b>
<b>Tabelle 16:</b>	<b>Verzeichnis der für die Zellkultur verwendeten Materialien _____</b>	<b>79</b>
<b>Tabelle 17:</b>	<b>Verzeichnis der für die Immuncytochemie verwendeten Materialien _</b>	<b>79</b>
<b>Tabelle 18:</b>	<b>Verzeichnis der für Proteomics verwendeten Materialien _____</b>	<b>80</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

2-VP	2-Vinylpyridin
A. dest	Aqua destillata
ALDH2	Aldehyddehydrogenase 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arp3	Actin related protein 3
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF8	basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor 8
BSA	bovines Serumalbumin
Cy3	Cyanocyanin 3
Da	Dalton, atomare Masseneinheit
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSM-IV	Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders – 4. Version
DTT	DL-Dithiothreitol
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
GPe	Globus pallidus externus
GPi	Globus pallidus internus
HCl	Salzsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPS	idiopathisches Parkinson-Syndrom
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
L-Dopa	L-Dihydroxyphenylalanin
LRRK2	Leucin-rich repeat protein kinase 2
MW	Molekulargewicht
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaaC	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Ncl.	Nucleus
NeuN	Neuronal Nuclei Antigen
NGS	Normal goat serum (Ziegen Serum)
NHS	Normal horse serum (Pferdeserum)
PBS	Phosphat Buffered Saline
PepA	Pepstatin

---

pERM	phosphoryliertes ERM
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PNS	peripheres Nervensystem
PS	Petrischale
REM	rapid eye movement
RG	Reaktionsgefäß
RW	Reinstwasser
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shh	Sonic hedgehog
SNC	Substantia nigra pars compacta
SNr	Substantia nigra pars reticulata
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TH	Tyrosinhydroxylase
tHS	tiefe Hirnstimulation
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VMAT2	vesikulärer Monoamintransporter 2
ZNS	zentrales Nervensystem
ZR	Zentrifugenröhrchen

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

# 1 Einleitung

## 1.1 Parkinson-Krankheit (ICD-10: G 20)

Die Parkinson-Krankheit (Synonyme: idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS), Morbus Parkinson, Paralysis agitans, Schüttellähmung) wurde benannt nach ihrem Erstbeschreiber, dem englischen Arzt Sir James Parkinson (Parkinson, 1817). Sie ist neben der Demenz vom Alzheimer-Typ die häufigste neurodegenerative Erkrankung. Die Prävalenz liegt bei ca. 1% der Über-60-Jährigen und bei ca. 3% der Über-80-Jährigen (de Lau und Breteler, 2006). Das Alter bei Erstmanifestation beträgt im Mittel 55 Jahre. Beim „early-onset“-Typ kann die Erkrankung auch schon vor dem 40. Lebensjahr manifest werden. In nur etwa 10% der Fälle tritt die Parkinson-Krankheit hereditär als familiäre Form des Parkinson-Syndroms auf. Diese Patienten weisen z.B. Mutationen im  $\alpha$ -Synuclein-Gen auf Chromosom 4 (PARK 1; Polymeropoulos et al., 1997) oder im Parkin-Gen auf Chromosom 6 (PARK 2; Kitada et al., 1998) auf. Ein positives Ansprechen auf L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) ermöglicht die Abgrenzung des IPS von anderen Parkinson-Syndromen. Diese können als atypische Parkinson-Syndrome im Rahmen einiger neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise der Multisystematrophie entstehen. Weitere im Rahmen der Diagnostik auszuschließende Formen sind sekundär-induzierte Parkinson-Syndrome z.B. infolge einer Therapie mit klassischen Neuroleptika wie Haloperidol. Das IPS macht dabei insgesamt ca. 75% aller Parkinson-Syndrome aus (Samii et al., 2004).

Bei den idiopathischen Formen der Parkinson-Krankheit ist die genaue Ursache noch nicht geklärt, aber ein Zusammentreffen genetischer Prädispositionen und verschiedener Umweltfaktoren scheint wahrscheinlich (Giasson et al., 2000; Warner und Schapira, 2003). Neuropathologisches Korrelat ist der Untergang verschiedener Nervenzellpopulationen (siehe unten) und die Ansammlung sogenannter Lewy-Körperchen in Nervenzellen. Diese eosinophilen, fibrillären Einschlusskörperchen enthalten abnorm gefaltete, hyperphosphorylierte Proteine und sind immunreaktiv gegen  $\alpha$ -Synuclein und Ubiquitin (Spillantini et al., 1997; Jellinger, 2002). Im Jahr 2003 wurde von Braak et al. eine typische Sequenz des Voranschreitens dieser Ablagerungen postuliert, die eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein  $\alpha$ -Synuclein-positiver Strukturen in verschiedenen Kerngebieten und Regionen des Gehirns mit dem klinischen Stadium der Krankheit ermöglicht (Braak et al., 2003; 2005). Diese Sequenz lautet (vereinfacht): Bulbus olfactorius – Nucleus dorsalis nervi vagi – Locus coeruleus und Raphe-Kerne – Substantia nigra, Nucleus basalis Meynert, CA2-Region im Hippocampus – Amygdala – Neokortex. Die Parkinson-Krankheit beruht also

nicht nur auf dem Untergang dopaminerger Neurone der Substantia nigra pars compacta (SNc) und des mesolimbischen Systems, sondern auch auf der Degeneration noradrenerger Neurone (Locus coeruleus - German et al., 1992), serotoninerger Neurone der Raphe-Kerne (Halliday et al., 1990) sowie cholinergischer Neurone des Ncl. basalis Meynert (Beal, 2001) und des dorsalen Vaguskerne. Durch diese Vielzahl an betroffenen Transmittersystemen werden die Komplexität der Symptome sowie das Vorhandensein großer interindividueller Unterschiede im Krankheitsgeschehen erklärbar.

Das klinische Bild ist vom Stadium der Erkrankung abhängig (nach Buchta et al., 2008):

- Präsymptomatische Phase (bis zu 20 Jahre vor dem Auftreten der Kardinalsymptome):
  - o Hyposmie (Bulbus olfactorius)
  - o Verzögerte Darmpassage oder Obstipation (Ncl. dorsalis nervi vagi)
  - o Depressionen (Locus coeruleus und Raphe-Kerne)
  - o Störungen des REM-Schlafs (v.a. Schlafwandeln, motorisch-aggressives Verhalten)
- Symptomatische Phase (mit den Kardinalsymptomen)
  - o Brady-/Akinese
  - o Rigor (zu Beginn oft einseitige, ziehende Schmerzen im Schulterbereich)
  - o Ruhetremor der distalen Extremitäten (meist einseitig, 4 – 7 Hz)
  - o posturale Instabilität

Im Krankheitsverlauf häufig auftretende Begleitsymptome sind eine Hypomimie, eine Seborrhö (die zum typischen „Salbengesicht“ führt), eine Sialorrhö bedingt durch eine Schluckstörung sowie Störungen des Urogenital- und Sexualsystems, der Schweißproduktion, des kardiovaskulären Systems und anderer autonomer Systeme (Gerlach et al., 2007). Eine Depression nach DSM-IV-Kriterien entwickeln ca. 40% der Patienten (Dooneief et al., 1992; Poewe, 1993) und mehr als 20% der Patienten eine Demenz (Biggins et al., 1992, Aarsland et al., 2003). In Abhängigkeit vom dominierenden Kardinalsymptom unterscheidet man den Äquivalenztyp (Rigor, Tremor und Akinese gleich ausgeprägt), den Tremordominanz- und den akinetisch-rigiden Typ (nach Masuhr und Neumann, 2007).

Die motorischen Kardinalsymptome haben ihre Ursache in einem Transmitterungleichgewicht innerhalb der Basalganglien. Hauptsächlich ist dies durch eine verminderte Afferenz dopaminerger Neurone der SNc bedingt. Dieser Mangel kann bis zu dem Zeitpunkt

kompensiert werden, an welchem mehr als 80 – 85% der dopaminergen Neurone der SNc degeneriert sind. Dies führt zu einem Verlust der dopaminergen Afferenzen im Striatum von 60 – 80% (Marsden, 1982). Die Basalganglien bestehen aus dem Striatum (als Eingangskern), dem Globus pallidus externus (GPe) und Globus pallidus internus (GPi), dem Ncl. subthalamicus und der Substantia nigra mit der pars compacta und der pars reticulata (SNr). Sie sind der zentrale Teil eines kortiko-thalamo-kortikalen Regelkreises, der Informationen aus vielen Regionen des Kortex sammelt, diese verarbeitet und sie dann den Teilen des Kortex zuführt, die für die Bewegungsinitiierung und -ausführung zuständig sind (Gerlach et al., 2007). Die Abbildungen 1 und 2 illustrieren die wichtigsten Verschaltungen in vereinfachter Form.

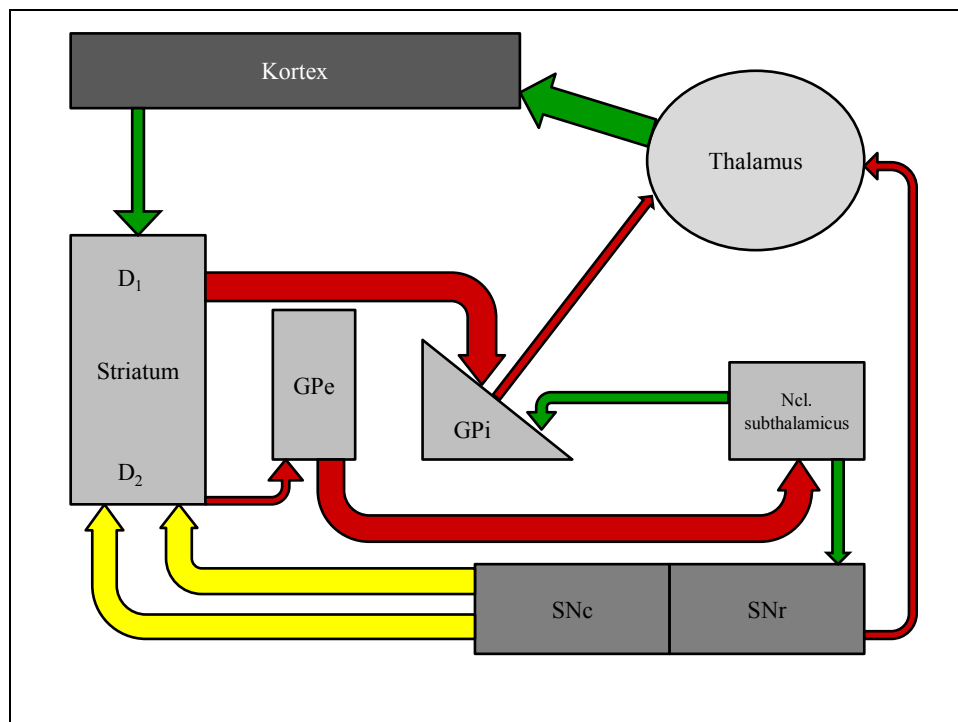


Abbildung 1: **Aktivität der Basalganglienschleife beim Gesunden (vereinfacht).** Grüne Pfeile: Glutamat, rote Pfeile: GABA, gelbe Pfeile: Dopamin (eigene Darstellung).

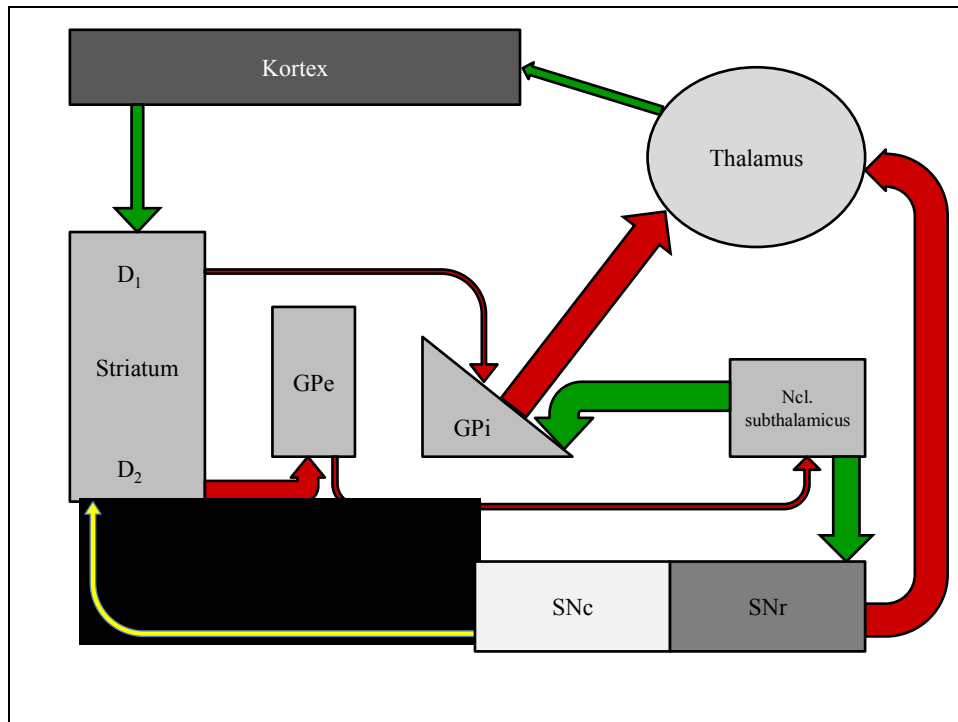


Abbildung 2: **Aktivität der Basalganglienschleife beim idiopathischen Parkinson Syndrom (vereinfacht)**. Grüne Pfeile: Glutamat, rote Pfeile: GABA, gelbe Pfeile: Dopamin (eigene Darstellung).

Innerhalb der Basalganglien gibt es einen direkten, motorikfördernden Weg und einen indirekten motorikhemmenden. Das Striatum erhält erregende glutamaterge Afferenzen aus dem Kortex. Beim direkten Weg hemmen striatale Neurone durch Freisetzung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) mit Substanz P als Kotransmitter direkt die beiden Ausgangskerne GPi und SNr. Deren GABAerge Hemmung der motorischen Thalamusgebiete (Ncl. ventralis anterior und Ncl. ventralis lateralis) wird kleiner, sodass diese enthemmt werden und exzitatorisch auf den Motorkortex einwirken. Beim indirekten Weg wirken GABAerge Neurone des Striatums mit Enkephalin als Kotransmitter inhibierend auf den GPe ein. Dessen Hemmung des Ncl. subthalamicus wird geringer und dieser erregt mit Glutamat die beiden Ausgangskerne GPi und SNr stärker. Es kommen folglich mehr motorikhemmende Impulse im Thalamus an und die Erregung des Motorkortex nimmt ab.

Die dopaminergen Afferenzen aus der SNc spielen für das Gleichgewicht zwischen den beiden Wegen eine entscheidende Rolle. Dopamin wirkt im Striatum über D<sub>1</sub>-Rezeptoren exzitatorisch auf die Neurone des direkten Weges und über D<sub>2</sub>-Rezeptoren inhibierend auf die Neurone des indirekten Weges. Es wirkt also motorikfördernd. Fehlen diese Afferenzen aus der SNc wie beim IPS (Abbildung 2) kommt es zu einem Übergewicht der motorikhemmenden Einflüsse (nach Huppelsberg und Walter, 2005).

## 1.2 Therapeutische Möglichkeiten

Die Therapie des idiopathischen Parkinson Syndroms ist sehr komplex. Sie muss sich auch am Alter des Patienten und bestehenden Begleiterkrankungen orientieren. Deshalb soll hier nur ein Überblick über die prinzipiellen Möglichkeiten gegeben werden. Zugrunde gelegt wurde hierfür die entsprechende Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Stand 10/2008):

### 1.2.1 Medikamentöse Therapie

Die Grundidee der verschiedenen medikamentösen Therapien liegt in der Verschiebung der Transmitterkonzentrationen zugunsten der motorikfördernden Einflüsse im Striatum. Da das biogene Amin Dopamin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwindet, stellt die Gabe von Dopamin als Ausgleich für den Verlust der Afferenzen aus der SNc keine therapeutische Option dar.

Die direkte Dopaminvorstufe L-Dopa hingegen überwindet die Blut-Hirn-Schranke und wird im zentralen Nervensystem (ZNS) dann zu Dopamin decarboxyliert. Das durch den Untergang der dopaminergen Neurone der SNc bestehende Dopamindefizit in den Basalganglien wird auf diese Weise ersetzt. L-Dopa gilt als das wirksamste Medikament bei der Behandlung des IPS (Parkinson Study Group, 2004) und wird in fester Kombination mit einem Hemmstoff der peripheren Dopadecarboxylase (Carbidopa, Benserazid) appliziert, um den Abbau von L-Dopa außerhalb des ZNS zu verhindern. Im Verlauf einer Therapie mit L-Dopa kommt es sehr häufig zu Komplikationen z.B. in Form von Dyskinesien, da sich die beim Gesunden ständig verändernden Dopaminspiegel durch Gabe von außen anhand eines festen Schemas nur unzulänglich imitieren lassen. Die Wahrscheinlichkeit für ihr Auftreten steigt mit zunehmender Therapiedauer und stellt vor allem für die Therapie jüngerer Patienten einen limitierenden Faktor dar.

Direkte Dopaminagonisten wie Bromocriptin, Lisurid, Apomorphin, Rotigotin, Pergolid, Cabergolin u.a. stellen die Mittel der ersten Wahl für die Initialtherapie von Patienten mit einem biologischen Alter von weniger als 70 Jahren dar, weil sie weniger häufig als L-Dopa zu Dyskinesien im Krankheitsverlauf führen (Oertel et al., 2006). Allerdings haben diese Substanzen z.T. andere therapielimitierende unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie vermehrte Tagesmüdigkeit sowie Fibrosen der Herzklappen durch Pergolid oder Cabergolin (Bhattacharyya et al., 2009).

Ergänzend sind Hemmstoffe der Catecholamin-O-Methyltransferase wie Entacapon in Kombination mit L-Dopa zugelassen, die die motorischen Wirkungsfluktuationen durch

Verminderung des Abbaus von L-Dopa außerhalb des ZNS analog zu den Hemmstoffen der peripheren Dopadecarboxylase reduzieren.

Monoaminoxidase-B-Hemmstoffe wie Selegilin hemmen den Abbau von Dopamin im ZNS, führen so zu einer höheren Dopaminkonzentration und ermöglichen somit eine Dosisreduktion von L-Dopa.

Ein anderer Weg wird durch den Wirkstoff Amantadin beschritten. Dieser blockiert den NMDA-Rezeptor und führt so zu einer verminderten Freisetzung von Acetylcholin. Auf diese Weise wird das Übergewicht der motorikhemmenden cholinergen Einflüsse in den Basalganglien reduziert.

Den gleichen Effekt kann man auch durch die Gabe von Anticholinergika wie Benztropin oder Biperiden erreichen. Allerdings wirken diese nicht selektiv im ZNS und es kommt dosisabhängig zu anticholinergen Nebenwirkungen wie Tachykardie, Obstipation, Mundtrockenheit, Miktionsstörungen u.a. (Lüllmann et al., 2006).

Durch die medikamentöse Therapie lassen sich nur die Symptome jedoch nicht die Ursache des IPS behandeln. Wie bei allen Arzneimitteln kommt es außerdem auf dem Weg des Wirkstoffs zu seiner Zielstruktur (Bioverfügbarkeit) zu Wechselwirkungen mit dem Organismus. Diese können durch ihre teilweise Nicht-Vorhersehbarkeit sowie inter- und intraindividuelle Variabilität zu Schwierigkeiten bei der Dosisfindung und vor allem auch zu Wirkungsfluktuationen führen. Dabei sind bei der L-Dopatherapie die Wearing-off-/End-of-Dose-Akinese (Nachlassen der Medikamentenwirkung 4 – 6 Stunden nach Einnahme), das On-Off-Phänomen (sehr rascher Wirkungsverlust und plötzliches Wiedereinsetzen der Beweglichkeit) und das Freezing (plötzliche Blockade des Gehens v.a. an Engstellen oder Schwierigkeiten bei der Ganginitiierung) zu nennen. Teilweise lassen sich diese Fluktuationen durch Gabe von Retardpräparaten oder durch die Verwendung komplexer Applikationssysteme wie der intraduodenalen Infusion (Nyholm et al., 2005) reduzieren.

### **1.2.2 Tiefe Hirnstimulation**

Bei der tiefen Hirnstimulation (tHS) wird stereotaktisch eine Elektrode in den Nucl. subthalamicus (in Ausnahmefällen auch in den GPi oder den Nucl. ventralis intermedius des Thalamus) implantiert, die elektrische Impulse aussendet und so dessen Aktivität beeinflusst. Für jeden Patienten wird die Stimulationsfrequenz und -amplitude dann individuell so angepasst, dass die motorischen Kardinalsymptome des IPS minimiert werden. Deuschl et al. konnten 2006 in einer kontrollierten Studie zeigen, dass die tHS bei fortgeschrittenen Patienten auch dann noch die Fluktuationen der Motorik und die Lebensqualität verbessert,



wenn die Symptome medikamentös nicht mehr beherrschbar waren. Es gibt allerdings eine Reihe von Kontraindikationen (z.B. schwere Allgemeinerkrankungen, hohe Blutungsneigung, ausgeprägte Hirnatrophie, Demenz, Depression), die viele vor allem ältere Patienten mit längerem Krankheitsverlauf von vornherein nicht für diese Therapie in Frage kommen lassen. Die Letalität oder bleibende schwere Morbidität der Operation liegt in großen spezialisierten Zentren unter 0,5% (Deuschl et al. 2006).

### 1.2.3 Zellersatztherapie

Die Zellersatztherapie verfolgt anders als die vorher beschriebenen Möglichkeiten einen kausalen Ansatz zur Therapie des IPS, indem die zugrunde gegangenen dopaminergen Zellen der SNc ersetzt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es jedoch noch keine Zellersatztherapie die klinisch so validiert ist, dass sie Aufnahme in die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie gefunden hat.

Lindvall und Kokaia haben im Jahr 2009 die bisherigen Ergebnisse klinischer Studien zur Zellersatztherapie an Patienten zusammengefasst: Als vielversprechendste Zellpopulation haben sich Zellen des ventralen Mesenzephalons von humanen Feten (6. bis 9. Schwangerschaftswoche, nach Interruptio) herausgestellt (Hagell und Brundin, 2001; Bauer et al., 2002). Bis jetzt wurden solche Zellen bei ca. 300 bis 400 Parkinson-Patienten in das Striatum transplantiert. Dabei konnte anhand der Aufnahme von  $^{18}\text{F}$ -Fluoro-Dopa gezeigt werden, dass die Zellen die Transplantation überleben (Cohen et al., 2003). Eine dopaminerge Reinnervation erfolgt ebenfalls (Piccini et al., 1999; Mendez et al., 2005). Allerdings sind die bisherigen Ergebnisse hinsichtlich des klinischen Erfolgs uneinheitlich. Teilweise konnte in Studien ohne Kontrollgruppe eine individuelle motorische Verbesserung von 30 – 50% entsprechend dem Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) ein bis drei Jahre nach Transplantation nachgewiesen werden (Hagell et al., 1999; Hauser et al., 1999; Brundin et al., 2000; Mendez et al., 2005). Im Gegensatz dazu zeigten Olanow et al. 2003 in einer doppelblinden Studie, dass nach 24 Monaten kein Unterschied im UPDRS zwischen den beiden Gruppen (transplantiert und scheintransplantiert) nachweisbar war. Laut Lindvall und Kokaia (2009) könnte diese Divergenz der Ergebnisse durch die Auswahlkriterien für die in die jeweiligen Studien eingeschlossenen Patienten, z.B. den Grad der klinischen Ausprägung der Erkrankung, das Alter, sowie die Art und Dauer einer gleichzeitigen Immunsuppression erklärbar sein.

Ein weiterer Aspekt, der den v.a. langfristigen Erfolg einer Zelltransplantation bestimmt, ist die Frage, in wie weit die transplantierten Zellen die bei der Parkinson-Krankheit bestehenden Pathomechanismen von den Wirtszellen übernehmen. In einigen Fällen konnte diese host-to-

graft Übertragung schon nachgewiesen werden (Kordower et al., 2008-1, 2008-2; Li et al., 2008) und betraf in einer Untersuchung 1 – 4% der jeweils transplantierten Zellen (Li et al., nicht publiziert). Bisherige Ergebnisse lassen vermuten, dass es zur Entwicklung von Lewy-Körperchen etwa zehn Jahren nach Transplantation kommen kann (Kordower et al., 2008-1; Mendez et al., 2008). Trotzdem stellt die Zellersatztherapie weiterhin einen sehr vielversprechenden Therapieansatz dar. Es müssen Methoden erforscht werden, um eine Integration der transplantierten Zellen nicht nur morphologisch sondern vor allem funktionell in die bestehenden neuronalen Netzwerke zu bewirken. Auf diese Weise könnte die Ähnlichkeit der Dopaminfreisetzung zur physiologischen, körpereigenen maximiert werden. Die dann erfolgende bedarfsgerechte Freisetzung von Dopamin kann durch keine der zuvor erwähnten anderen Therapiemöglichkeiten (1.2.1 und 1.2.2) erreicht werden, so dass eine erfolgreiche Zelltransplantation sowohl was den Therapieerfolg als auch was das Nebenwirkungspotential angeht die ideale Lösung darstellt.

Es ergaben sich allerdings während der bisher durchgeführten Studien weitere Probleme, die u.a. vom verwendeten Zellmaterial verursacht werden. Zellen des ventralen Mesenzephalons humaner Feten können nur bei Abtreibungen gewonnen werden. Für einen Patienten muss aufgrund der geringen Zellzahl außerdem das Material von mehreren Feten verwendet werden. Eine ethisch vertretbare Gewinnung dieser Zellen für eine größere Anzahl von Patienten ist deshalb nicht möglich. Weitere Nachteile stellen die möglich Kontamination eines Frischpräparats durch Viren oder Bakterien (Björklund und Lindvall, 2000) sowie die nicht mögliche Kultivierung dar. Insbesondere der letzte Punkt zeigt auch die ökonomische Limitierung der bisher angewandten Methode. Als aussichtsreiche Alternative befinden sich z.Z. pluripotente neuronale Stamm- bzw. Progenitorzellen im Fokus der Forschung (Lindvall und Kokaia, 2009), die die Vorläuferzellen der Neurone und Gliazellen des ZNS bilden. Als Stammzellen werden Zellen bezeichnet, die das Potential haben sich in viele verschiedene Zelltypen zu entwickeln. Sie spielen eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung und beim späteren Wachstum eines Organismus. Stammzellen teilen sich asymmetrisch, d.h. eine Tochterzelle weist die Eigenschaften einer Stammzelle auf, während die andere beginnt sich in eine bestimmte Richtung zu differenzieren (vgl. Stem Cell Basics, 2009). Ziel ist es humane (immortalisierte) Stammzelllinien zu generieren und diese dauerhaft in Kultur zu halten. Durch Induktion einer dopaminergen Differenzierung ließen sich dann nahezu unbegrenzt Zellen für Transplantationen gewinnen. Hierfür ist neben der Auswahl geeigneter Stammzellen auch eine genauere Kenntnis der bei der dopaminergen Differenzierung stattfindenden Prozesse beim Menschen aber auch im Tiermodell von großer Bedeutung.

### 1.3 Dopaminerge Differenzierung bei der Ratte

Die relativ geringe Zahl dopaminerger Neurone im ZNS (German und Manaye, 1993) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Funktionen wie der Motorik, der Freisetzung neuroendokriner Hormone, der Kognition, dem Gedächtnis und dem emotionalen Verhalten (Perrone-Capano und di Porzio, 2000). Die v.a. für die Motorik entscheidenden Neurone in der SNc projizieren bei Nagetieren in das dorsale sowie das laterale Striatum und erhalten Affenzen aus verschiedenen Gebieten des Di- und Telenzephalons (Beckstead et al., 1979; van der Kooy, 1979).

Während der embryonalen Entwicklung der Ratte entstehen dopaminerge nigrostriatale Neurone um den Embryonaltag 8,5. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Faktoren Sonic-hedgehog (Shh) und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor 8 (bFGF8) (Perrone-Capano und Di Porzio, 2000). Diese Moleküle werden von Signalzentren entlang der dorso-ventralen und der antero-posterioren Achse sezerniert. Shh und bFGF8 wirken auf proliferierende neuronale Progenitorzellen indem sie deren Position in Bezug auf die beiden Achsen bestimmen und die Expression von Genen induzieren, die zur Entwicklung eines dopaminergen Phänotyps führen (Hynes et al., 1995; Ye et al., 1998; Hynes und Rosenthal, 1999). Hier spielt insbesondere der nukleäre Retinsäurerezeptor Nurr1 eine wichtige Rolle (Wallen et al., 1999). Dieser ist essentiell für die Expression des Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese die Tyrosinhydroxylase (TH) (Zetterström et al., 1997; Saucedo-Cardenas et al., 1998; Bäckmann et al., 1999; Perrone-Capano et al., 1999; Wallen et al., 1999; Eells et al., 2001). Weitere wichtige Marker mesenzephaler dopaminerger Neurone sind Pitx3, Engrailed-1, Lmx1a sowie die Dopadecarboxylase (aromatic l-amino acid decarboxylase = AADC) und der vesikuläre Monoamintransporter 2 (VMAT2). Pitx3 aktiviert die Transkription der Gene des VMAT2 und des Dopamintransporters (Hwang et al., 2009).

### 1.4 Zelllinie CSM14.1

Die untersuchte Zelllinie CSM14.1 wurde durch reversible Immortalisation von Zellen des ventralen Mesenzephalons 14 Tage alter Ratten-Embryonen mit einem retroviralen Vektor (SV40) erzeugt. Dieser Vektor enthält ein Gen für das temperatursensitive Large-T-Antigen und ein Gen für Resistenz gegenüber Neomycin. Werden diese Zellen bei 33° C unter Zugabe von 10% fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert (permissive Bedingungen), proliferieren sie und zeigen eine flache, fibroblasten-ähnliche Morphe (Durand et al., 1990). Unter veränderten Kulturbedingungen (39° C und 1% FCS) verlieren die Zellen ihre Teilungsfähigkeit und beginnen zu differenzieren (Haas und Wree, 2002; adaptiert an das Protokoll von Winkler et

al. 1998). Dabei entstehen Zellen, die morphologisch wie multipolare Nervenzellen erscheinen (Abbildung 3) und es lassen sich in vitro die Enzyme TH und Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2) durch Western-Blot nachweisen. Diese Enzyme sind für dopaminerge Neurone charakteristisch. Des Weiteren konnte das Vorhandensein von Nurr1, einem atypischen Mitglied aus der Superfamilie der Kernrezeptoren in undifferenzierten CSM14.1-Zellen gezeigt werden (Haas und Wree, 2002). Dieser spielt eine zentrale Rolle in einem komplexen Netzwerk von Faktoren, die die dopaminerge Differenzierung von mesenzephalen Zellen steuern. Beispielsweise indem Nurr1 eine Promotoraktivität am TH-Gen entwickelt (Sakurada et al., 1999). In Zellen der Zelllinie CSM14.1 wurde eine Interaktion von Nurr1 mit den Kinasen LIMK1, ERK2 und MEK5/ERK5 (Sacchetti et al., 2006) beobachtet. Diese zur Familie der MAP Kinasen gehörenden Proteine sind für die neuronale Differenzierung und die Signaltransduktion von Neurotrophinen nötig (Vaudry et al., 2002). In Transplantationsexperimenten in das Striatum adulter Hemiparkinsonratten konnte demonstriert werden, dass CSM14.1-Zellen in der Lage sind ca. 300-400  $\mu\text{m}$  aus dem Injektionskanal zu migrieren. Eine dopaminerge Differenzierung oder gar eine dopaminerge Reinnervation konnte in diesem adulten Modell nicht beobachtet werden (Haas, 2009). Bei der intrastriatalen Transplantation in neonatale Hemiparkinsonratten konnten jedoch eine Reinnervation sowie ein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden (Haas et al., 2007-b).

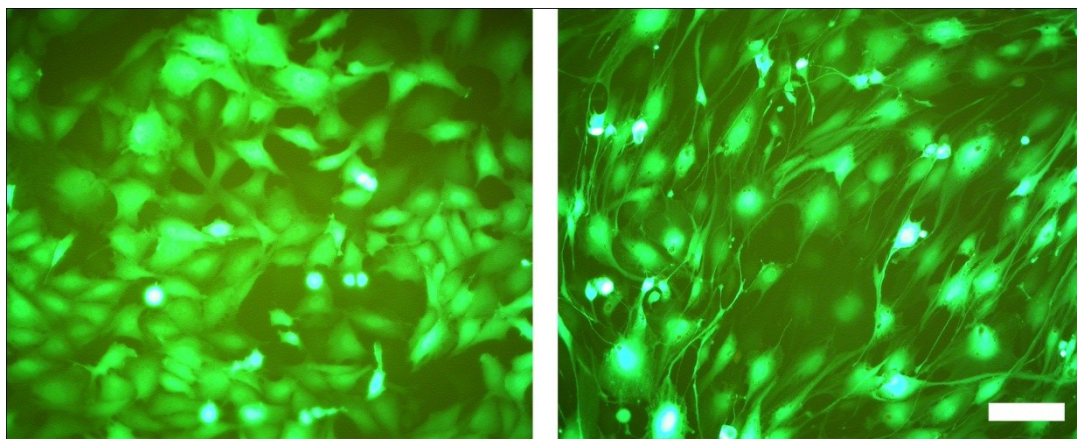


Abbildung 3: **CSM14.1-Zellen transfiziert mit einem GFP (green fluorescent protein)-codierenden adenoviralen Vektor;** (siehe Hildebrandt et al. 2009) links: undifferenzierte Zellen; rechts: Zellen nach 14 Tagen Differenzierung; Messbalken: 200  $\mu\text{m}$ ; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. Stefan Haas).

## 1.5 Fragestellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll das Differenzierungspotential der Zelllinie CSM14.1 in vitro weitergehend charakterisiert werden. Hierfür werden zwei unterschiedliche Methoden genutzt: Immuncytochemie mit stereologischer Auswertung und Proteomics.

Mit der Immuncytochemie soll untersucht werden, ob sich die Proteine Nestin, GFAP, NeuN und TH bei undifferenzierten CSM14.1-Zellen sowie bei CSM14.1-Zellen nach 14- und 28-tägiger Differenzierung nachweisen lassen. Außerdem soll zusätzlich zu diesem qualitativen Ansatz, mittels Zellzählung der Anteil der jeweils positiven Zellen ermittelt werden, um so eine quantitative Aussage treffen zu können.

Durch Proteomics sollen Unterschiede im Proteinexpressionsmuster zwischen undifferenzierten CSM14.1-Zellen und Zellen nach 28 Tagen Differenzierung festgestellt werden. Dabei soll untersucht werden, bei welchen Proteinen sich während der Differenzierung die Expression verändert sowie welche Proteine sich nur in differenzierten CSM14.1-Zellen nachweisen lassen. Besonderes Interesse gilt hierbei Proteinen, die für die neuronale und die dopaminerge Differenzierung eine wichtige Rolle spielen.

Die gewonnenen Ergebnisse sollen mit den bisher vorhandenen Erkenntnissen über die Zelllinie CSM14.1 verglichen werden. Abschließend soll eine erneute Einschätzung der Eignung der Zelllinie CSM14.1 als Modell für die neuronale und dopaminerge Differenzierung der Ratte vorgenommen werden.

## 2 Materialien und Methoden

Die Hersteller aller verwendeten Materialien sind im Anhang aufgeführt.

### 2.1 Kultur der Zelllinie CSM14.1

Die in dieser Arbeit untersuchte Zelllinie CSM14.1 wurde freundlicherweise von Prof. Dale E. Bredesen (Buck Institute for Age Research, Novato, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Die Kultur unter permissiven Bedingungen bei 33° C erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (Heraeus Heracell 240, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mit 5% CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre. Das verwendete Kulturmedium wurde laut Tabelle 1 hergestellt und die Zellen in Gewebekultur-Petrischalen (Nunclon™Δ 100 x 15, Nalge Nunc™ Inc., Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ausgesät. Nach jeweils drei Tagen waren sie konfluent und es erfolgte eine Passage. Dazu wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums einmal mit sterilem PBS gewaschen, dann mit 6 ml Trypsin-EDTA-Lösung pro Petrischale (PS) versetzt und für 15 min bei 33° C inkubiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen (ZR) überführt und für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert (Rotofix 32, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen; Rotor: 1619). Nach einmaligem Waschen mit 5 ml Medium und erneuter Zentrifugation unter denselben Bedingungen wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:5 in neue PS ausgesät. Dabei wurden durchschnittlich 200.000 vitale Zellen pro PS ausgebracht. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem Hämatozytometer (Neubauer-Zählkammer, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen) und Trypanblau-Färbung wie von Lindl (2000) beschrieben. Die Differenzierung der Zellen wurde durch Anheben der Temperatur auf 39° C und Reduktion des FCS-Gehalts im Medium auf 1% induziert (Haas und Wree, 2002).

Tabelle 1: Zusammensetzung Kultur- und Differenzierungsmedium

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kulturmedium	44,5% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 44,5% F12 Nutrient Mixture (Ham) (1x), 1% Antibiotic/Antimycotic Solution (100x), 10% Foetal Bovine Serum
Differenzierungsmedium	49% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 49% F12 Nutrient Mixture (Ham) (1x), 1% Antibiotic/Antimycotic Solution (100x), 1% Foetal Bovine Serum

## 2.2 Immuncytochemie und stereologische Auswertung

Grundlage dieser Technik ist die spezifische Reaktion eines Antikörpers mit einem Antigen. Bei diesen Antigenen kann es sich beispielsweise um Strukturproteine einer Zelle oder um Enzyme handeln. Gegen eine bestimmte Sequenz dieses Antigens (Epitop) wird ein spezifischer monoklonaler Antikörper hergestellt. Dazu wird eine andere Spezies als die, aus der die zu untersuchende Zellen stammen, benutzt (z.B. Antikörper aus Kaninchen für die Markierung von Rattenzellen). Dieser Antikörper (Primärantikörper) bindet spezifisch an sein Ziel-Epitop innerhalb oder auf den Zellen. Um diese Bindung nachzuweisen wird ein Sekundärantikörper verwendet. Dieser ist gegen den speziesspezifischen Teil des Primärantikörpers ( $F_c$ -Teil) gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. In dieser Arbeit wurde als Sekundärantikörper ein Cy3-konjugierter Anti-Maus-Antikörper aus dem Esel (Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Mouse IgG + IgM; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) verwendet. Cy3 ist ein Carbocyanin, das von Licht mit einer Wellenlänge von 550 nm maximal angeregt wird und dann Licht mit einer Wellenlänge von 570 nm emittiert. Es zeigt sich also eine rote Fluoreszenz entsprechend markierter Strukturen.

Eine Schwierigkeit der Immuncytochemie besteht darin, dass der Primärantikörper in der Lage sein muss, an sein Epitop zu binden (Sensitivität), so dass man dies ggf. erst durch die Verwendung von Detergentien zugänglich machen muss. Gleichzeitig sollen unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers mit anderen Zellstrukturen möglichst vermieden werden, um eine hohe Spezifität zu erreichen. Deshalb müssen diese unspezifischen Bindungsstellen vor der Primärantikörperinkubation mit bovinem Serumalbumin (BSA) oder Milchpulver abgeblockt werden.

### 2.2.1 Kultivierung und Differenzierung für die Immuncytochemie

Es wurden Zellkulturgefäße mit 24 Inkubationskammern (Nunc Multidishes Nunclon<sup>TM</sup>Δ 24 Wells, Thermo Fischer Scientific Inc.) verwendet. Je 20 µl einer Zellsuspension (200.000 Zellen / ml) wurden zu je 250 µl Medium in eine Inkubationskammer gegeben. Nach einer Nacht im Brutschrank bei 33° C wurde bei einem Drittel der Well-Platten das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit PFA-Lösung (3,7%) fixiert. Diese Platten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4° C aufbewahrt. In den anderen Wells wurde das Medium gegen das Differenzierungsmedium ausgetauscht und diese in den 39° C-Brutschrank überführt (Tag 0). Alle drei Tage erfolgte ein Wechsel des Mediums. An Tag 14 und 28 wurden dann die entsprechende Anzahl Well-Platten wie beschrieben mit PFA-Lösung

fixiert. Um die Bildung von Ameisensäure bei längerer Lagerung der Zellen in PFA-Lösung zu vermeiden, wurde diese alle 14 Tage durch frisch hergestellte Lösung ersetzt.

### **2.2.2 Primärantikörper für die Immuncytochemie**

#### ***Nestin***

Das Intermediärfilamentprotein Nestin wird während der frühen Entwicklung in sich teilenden Zellen des ZNS und peripheren Nervensystems (PNS) aber auch in anderen Geweben (z.B. Muskel) exprimiert. Es wurde erstmals durch den monoklonalen Antikörper Rat 401 identifiziert (Hockfield und McKay, 1985). Derselbe Antikörper (Maus Anti-Ratte Nestin, Klon Rat 401, BD Pharmingen™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) wurde auch in dieser Arbeit verwendet. Er bindet an einen Dimer von 198 bis 260 kD und es entsteht eine filamentöse Färbung unter Aussparung des Zellkerns (Hockfield und McKay, 1985). Nestin wird während der Embryonalentwicklung in Stammzellen des ZNS der Ratte exprimiert (Frederiksen und McKay, 1988). Das Vorhandensein von Nestin in Zellen wurde genutzt, um Stammzellen im ZNS von Nagetieren und in immortalisierten Vorläufer-Zelllinien des ZNS zu charakterisieren (Frederiksen et al., 1988; Cattaneo und McKay, 1990; Redies et al., 1991). Nach der Zelldifferenzierung ist die Nestin-Expression im ZNS erniedrigt und andere Intermediärfilamente wie GFAP und Neurofilamente werden vermehrt gebildet (Hockfield und McKay, 1985). Der Vergleich von Expressionsmustern, Übereinstimmungen in der Gensequenz v. A. auch der Position von Introns (Steinert und Liem, 1990) führten zur Einteilung der Intermediärfilamente in sechs Klassen: I und II (basische und saure Keratine), III (Desmin, GFAP, Vimentin u.a.), IV (Neurofilamente u.a.), V (Laminine) und VI (Nestin). Das Nestin-Gen der Ratte und des Menschen hat zwei von drei Intron-Positionen mit drei Neurofilament-Genen gemeinsam, was eine enge evolutionäre Verwandtschaft vermuten lässt (Dahlstrand et al. 1992). Da Nestin nicht ausschließlich in Stammzellen des ZNS exprimiert wird, kann es nicht allein als Marker zur Identifizierung neuronaler Stammzellen dienen. Gemeinsam mit anderen zelltypischen Markern verwendet, lassen sich aber Populationen pluripotenter Vorläuferzellen im ZNS identifizieren (Wernig et al., 2003).

#### ***Glial fibrillary acidic protein (GFAP)***

Das saure fibrilläre Gliaprotein (50 kD) wurde bei der postmortalen Untersuchung der Gehirne von Patienten mit Enzephalitis disseminata (Multipler Sklerose) entdeckt (Eng et al., 1971). Infolge der Erkrankung kommt es in den demyelinisierten Herden u.a. zu einer reaktiven Gliose, die zu einem Großteil aus Astrozyten besteht. Als Bestandteil dieser Zellen wurde das GFAP isoliert. Die Synthese von GFAP beginnt in den Astrozyten mit der



Differenzierung. Die Expression steigt signifikant an, wenn es aufgrund einer (wie auch immer gearteten) Verletzung des Hirngewebes zur Ausbildung einer Glianarbe kommt (Eddleston und Mucke, 1993; Zhu et al. 2007). Das Protein ist im wässrigen Milieu unlöslich und gehört zur Gruppe III der Intermediärfilamente (Steinert und Liem, 1990). Es ist das wichtigste Intermediärfilament von Astrozyten und scheint eine entscheidende Rolle für die Funktionsfähigkeit der Zellen zu spielen, da es die Stabilität der Zellausläufer gewährleistet (Eng et al., 2000).

Der verwendete monoklonale Antikörper Anti-GFAP Klon G-A-5 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) eignet sich zur Markierung von Astrozyten, Bergmann Gliazellen des Kleinhirns, Gliom-Zellen und anderen von Gliazellen abstammender Tumorzellen. Er kreuzreagiert nicht mit Vimentin, einem weiteren Intermediärfilament der Gruppe III und wurde z.B. benutzt um GFAP positive Zellen in Kulturen von menschlichen, aus embryonalen Karzinomen isolierten, pluripotenten Stammzellen nachzuweisen (Stewart et al., 2003). Bei immunocytochemischen Färbungen gegen GFAP muss ein negatives Ergebnis nicht gleichbedeutend mit dem Nichtvorhandensein des Antigens sein, da insbesondere Formalin-fixierte Substrate ggf. zuvor mit Trypsin behandelt werden müssen, um die entsprechenden Epitope freizulegen. Andererseits wird, da diese Epitope sehr spezifisch sind, eine für den Marker GFAP positive Zelle dieses Protein mit größter Wahrscheinlichkeit auch tatsächlich enthalten (Eng et al., 2000). Die Intensität der Immunreaktivität korreliert dabei aber nicht zwangsläufig mit der absoluten Menge an von einer Zelle gebildetem GFAP (Aquino et al., 1988). Die Ursache für diese Beobachtung konnte noch nicht gefunden werden. Trotzdem ist GFAP ein in Forschung und Klinik weit verbreiteter Marker. Relativiert werden konnte außerdem die frühere Annahme, dass GFAP nur in adulten Astrozyten vorkommt. Das Protein wird auch von Zellen der Subventrikulärzone der Seitenventrikel oder des hippocampalen Gyrus dentatus im adulten Gehirn gebildet, die als neuronale Stammzellen fungieren und gleichzeitig durch Schaffung einer speziellen Mikroumgebung eine wichtige Rolle für die Neurogenese nach Gehirnverletzungen spielen (Zhu und Dahlström, 2007).

### ***Neuronal Nuclei (NeuN)***

Das Protein NeuN ist ein neuronenspezifisches lösliches Kernprotein (Molekulargewicht: 46 - 48 kDa) und kommt in den meisten neuronalen Zellen des ZNS und PNS ausschließlich bei Wirbeltieren vor (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996; Sarnat et al., 1998; Todd et al., 1998). Seine Funktion ist noch nicht bekannt. Da NeuN in vitro an DNA bindet wird vermutet, dass es sich um einen Transkriptionsfaktor für eine neuronale Differenzierungsrichtung handelt (Mullen et al., 1992; Sarnat et al., 1998). Nur Neurone, die die ersten Differenzierungsschritte

durchlaufen haben, sind gegen diesen Antikörper immunreaktiv (Sarnat et al., 1998). Der verwendete Antikörper bindet allerdings u.a. an folgende Neuronentypen nicht: Neurone in sympathischen Ganglien, der unteren Olive und des Ncl. dentatus im Cerebellum, Mitralzellen des Bulbus olfactorius, Purkinje-Zellen des Kleinhirns und Photorezeptorzellen der Retina (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996). Ein Grund für diese Ausnahmen ist nicht bekannt (Sarnat et al., 1998; Todd et al., 1998). Trotzdem gilt NeuN als ein Standardmarker für die Identifizierung von postmitotischen Nervenzellen (Gage et al., 1995). Die Immunreaktivität konzentriert sich hauptsächlich auf den Kern der Neurone mit Ausnahme des Nukleolus. Das Zytoplasma reagiert meist schwächer (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996; Todd et al., 1998). Es gibt auch Fälle in denen das Zytoplasma sehr stark, der Kern aber nur schwach immunreaktiv ist (Mullen et al., 1992). Dieses Phänomen lässt sich durch die Verwendung von Antikörpern aus unterschiedlichen Klonen erklären. In dieser Arbeit wurde folgender Antikörper verwendet: Anti-NeuN aus Maus, Klon A60 – monoklonal (Chemicon, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Anders als der ursprüngliche polyklonale Antikörper bindet dieser v.a. an Antigene im Zytoplasma der Zellen. NeuN ist ein sehr guter Marker zum Nachweis von Neuronen in Zellkulturen und wurde auch in einer Studie verwendet, die die Neogenese von Nervenzellen im Gehirn adulter Menschen beschreibt (Eriksson et al., 1998).

### ***Tyrosinhydroxylase (TH)***

Das Enzym Tyrosinhydroxylase katalysiert die Umwandlung von L-Tyrosin in L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Nagatsu et al., 1964). Dies ist der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Biosynthese der Katecholamine (Hess et al., 1961) und somit auch von Dopamin aus dem in weiteren Schritten Noradrenalin und Adrenalin gebildet werden. TH besitzt ein Molekulargewicht zwischen 60 - 68 kDa und besteht aus vier Untereinheiten. Das Enzym kommt in Neuronen vor (Takeshima et al., 1994) und eignet sich als Marker zur Identifizierung dopaminerger Neurone (Andreeva et al., 1996; Cheung et al., 1997). In der Regel ist das gesamte Zytoplasma bis in die Ausläufer der Zellen immunreaktiv. Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper (Anti-TH aus Maus, Klon 2-monoklonal, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) bindet an ein Epitop am N-terminalen Bereich des Enzyms bei Nagetieren und Menschen. Er wurde schon erfolgreich für Charakterisierungsstudien von CSM14.1-Zellen mittels Western Blot verwendet (Haas und Wree, 2002).

### **2.2.3 Durchführung der Immunfluoreszenz an Zellkulturen**

In dieser Arbeit wurden nach dreimaligem Waschen der mit PFA fixierten Well-Platten mit PBS unspezifische Bindungsstellen mit einer BSA-haltigen Abblocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Daraufhin folgte die Inkubation mit den jeweiligen Primäantikörpern über Nacht bei 4° C. Für jeden Antikörper wurden für jeden Zeitpunkt (Tag 0, Tag 14, Tag 28) je vier unabhängige Färbungen durchgeführt. Nach Waschen mit PBS wurde die Sekundäantikörper-Inkubation ebenfalls bei 4° C über Nacht durchgeführt. Die Kernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) erfolgte nach Waschen mit PBS laut Anleitung des Herstellers. Abschließend wurde mit PBS und dann mit A. dest gespült und die Präparate mit Fluoreszenzeindeckmedium und Deckgläschen (Durchmesser 12 mm, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG) eingedeckt. Die Präparate wurden über Nacht getrocknet und dann mikroskopiert.

### **2.2.4 Stereologische Auswertung mit Olympus BX 51**

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzen wurde das Mikroskop BX 51 der Firma Olympus mit dem Objektiv Olympus UPlanFL N 10x/0.30, die Kamera CX 9000 (MBF Biosciences, Williston, VT, USA) sowie das Programm Stereo Investigator (MBF Biosciences) verwendet. Für die Zählung wurde das 10x Objektiv benutzt. In einen definierten Auswertebereich (Fläche unter dem Deckgläschen) wurden durch das Programm Zählquadrate (Kantenlänge 500 µm) mit einem vorgegebenen Abstand (1000 µm) in einem Raster festgelegt (Abbildung 4). Jedes Zählquadrat wurde digital fotografiert und dann nacheinander ausgezählt, wobei die Gesamtzellzahl anhand der DAPI-Färbung ermittelt und dann die Anzahl Cy3-positiver d.h. gegen den jeweiligen Antikörper immunreaktiver Zellen im selben Zählquadrat erfasst wurde. Dabei wurde für jeden Antikörper entsprechend der Fluoreszenzintensität eine andere Belichtungszeit gewählt. Diese wurde aber bei diesem Antikörper für alle Färbungen unabhängig vom Zeitpunkt (Tag 0, Tag 14, Tag 28) beibehalten (Tabelle 2). Der Anteil positiver Zellen wurde auf die ermittelte Gesamtzellzahl bezogen. Für jeden Antikörper wurden die für die entsprechenden Zeitpunkte erstellten vier unabhängigen Färbungen ausgezählt. Zur statistischen Auswertung dieser Werte wurden ein Vierfeldertest und der exakte Signifikanztest nach Fischer herangezogen. Es wurde hierfür das Programm SPSS (SPSS Inc., an IBM Company Headquarters, Chicago, IL, USA) benutzt.

Tabelle 2: Belichtungszeiten für Zellzählung

Primärantikörper	Belichtungszeit Cy3-Fluoreszenz	Belichtungszeit DAPI-Fluoreszenz
Nestin	500 ms	22 ms
GFAP	700 ms	22 ms
NeuN	700 ms	22 ms
TH Klon 2	500 ms	22 ms

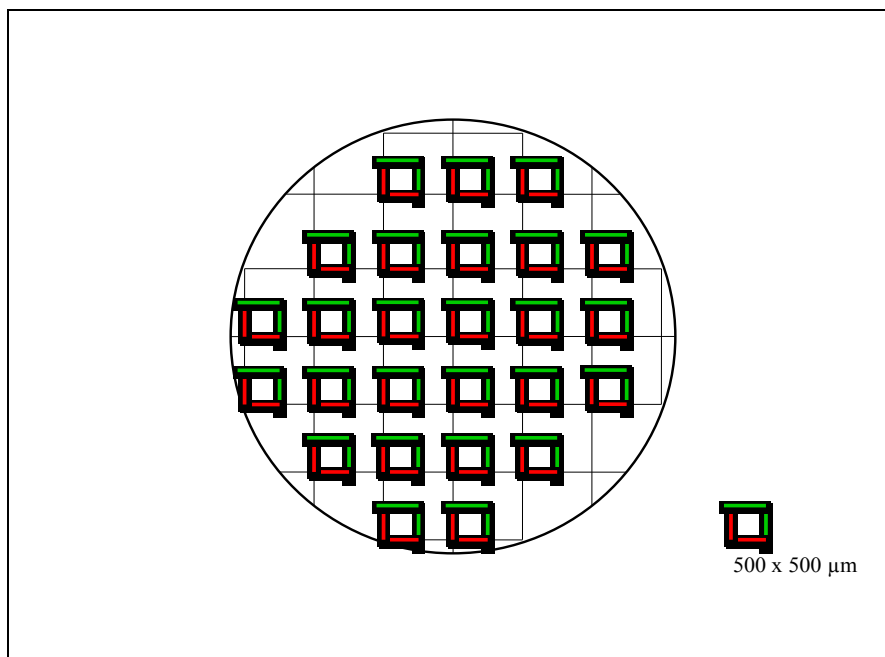


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung eines Zählrasters auf der Fläche eines Objektträgers (nicht maßstabsgetreu)

### 2.2.5 Lösungen für die Immuncytochemie

Tabelle 3: Lösungen zur Fixierung der Zellen

Lösung	Zusammensetzung
PBS 0,1M pH 7.4	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,27 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 l A. dest, pH-Einstellung mit HCl (37%)
PFA 3,7%	37 g PFA, 1 l PBS 0,1 M pH 7.4

Tabelle 4: Lösungen für die Immunfluoreszenz

Bezeichnung	Zusammensetzung
Abblocklösung	PBS, 3% BSA, 0,05% Triton X 100, 3% NHS
Primärantikörperlösung	PBS, 1% BSA, 0,025% Triton X 100, Antikörper in entsprechender Verdünnung
Sekundärantikörperlösung	PBS, 1% BSA, 0,025% Triton X 100, Antikörper in entsprechender Verdünnung
DAPI-Gebrauchslösung	3 µl Stammlösung in 1 ml PBS
Fluoreszenzeindeckmedium	30 ml Glycerol (87%), 12 g Polyvinylalkohol, 30 ml A. dest, 0,5 g Phenol, 60 ml TRIS (0,2 M, pH 8,5)

Tabelle 5: Verdünnungen der Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Nestin	1:500	Cy3 Anti-Maus	1:500
GFAP	1:400	Cy3 Anti-Maus	1:500
NeuN	1:1000	Cy3 Anti-Maus	1:500
TH Klon 2	1:500	Cy3 Anti-Maus	1:500

### 2.3 Proteomics

Das Proteom (von „**protein complement expressed by the genome**“) umfasst die Gesamtheit aller Proteine einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt (Schrattenholz, 2001). Der australische Wissenschaftler Marc Wilkins soll 1994 den Begriff „proteomics“ in Anlehnung an „genomics“ kreiert haben (The University of New South Wales, Australien). Die Kenntnis der DNA-Sequenz (des Genoms) einer Zelle lässt keinesfalls den Schluss auf ihre spezifische Funktion - insbesondere als Teil eines komplexen Organismus - zu. Die DNA bildet vielmehr nur die Basis auf der durch verschiedenste Modifikationsschritte auf den Ebenen der Transkription und Translation von Proteinen und vor allem auch durch posttranslationale Veränderungen die Verschiedenartigkeit von Zellen entsteht. Beispielsweise unterscheiden sich die Hepatozyten der Leber und die Purkinje-Zellen des Kleinhirns eines Menschen schon morphologisch fundamental voneinander, obwohl sie dieselbe genetische Information enthalten. Die qualitative und quantitative Analyse der Proteinexpressionsmuster ermöglicht es diese Unterschiede zu verstehen. Die Entschlüsselung der Aminosäuresequenzen der exprimierten Proteine z.B. mit Hilfe des Edman-Abbaus ist allerdings aufwendig und (relativ) fehleranfällig. Deshalb ist es günstiger das zu untersuchende Proteingemisch zunächst durch eine zweidimensionale Gelelektrophorese aufzutrennen (O'Farrell, 1975). Dabei bildet eine isoelektrische Fokussierung (IEF) die erste und eine darauf folgende Natrium-(Natrium-)dodecylsulfat-(SDS)-Gelelektrophorese die zweite Dimension. In der IEF nutzt man den isoelektrischen Punkt (IEP) eines Proteins und in der SDS-Gelelektrophorese seine Molekülmasse (MW) als Trennparameter. Die Kombination dieser beiden Methoden erlaubt auch die Separation von Proteinen, die in einer dieser beiden Eigenschaften (IEP oder Molekülmasse) übereinstimmen. Die einzelnen Proteine stellen sich idealerweise im SDS-Gel nach Anfärbung mit Coomassie als einzelne Spots dar. Diese können dann aus dem Gel entnommen („gepickt“), proteolytisch verdaut und die entstandenen Fragmente mit Hilfe von MALDI-TOF analysiert werden. Die hierfür häufig verwendete Protease Trypsin spaltet eine Polypeptidkette hinter den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Da sich die Aminosäuresequenzen verschiedener Proteine unterscheiden, entstehen für jedes Protein unterschiedliche Fragmente, die im Idealfall zu einem spezifischen Massenspektrum dieses Proteins führen (Fingerabdruck). Mit Hilfe von Datenbanken wie z.B. Mascot kann diesem Spektrum dann das dazugehörige Protein zugeordnet werden.

### 2.3.1 Kultivierung und Differenzierung für Proteomics

Die für die Differenzierung bestimmten PS mit CSM14.1-Zellen wurden nach einer Passage zunächst über Nacht bei 33° C in kultiviert, um ein Anwachsen zu ermöglichen. Danach befanden sich in einer PS ca. 400.000 undifferenzierte Zellen (Tag 0). Bei der Hälfte der PS wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit kaltem PBS gespült, dann mit Hilfe eines Schabers vom Untergrund abgelöst und in je 1 ml PBS pro PS aufgenommen. Nach Überführung in 15 ml ZR (Leergewicht zuvor bestimmt) wurden die Zellen zentrifugiert (analoge Vorgehensweise zu 2.1) und der Überstand abgenommen. Das Gewicht des entstandenen Pellets wurde ermittelt und durch 150 mg geteilt. Auf diese Weise wurde die Anzahl an möglichen Aliquots mit maximal 150 mg Gewicht bestimmt. Das Zellpellet wurde in einem so großen Volumen PBS gelöst, dass sich die Suspension auf die entsprechende Anzahl 1,5 ml Reaktionsgefäße (RG) verteilen ließ. Zuvor wurde das Leergewicht der entsprechenden RGs bestimmt. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 4° C und 5000 rpm (Heraeus Megafuge 1.0R, Thermo Fisher Scientific Inc.; Rotor: 3041). Der Überstand wurde entfernt, die jeweilige Probenmasse als Differenz zum Leergewicht bestimmt und die Zellpellets bei -80° C gelagert.

In den übrigen PS wurde das Kulturmedium entfernt und gegen Differenzierungsmedium ausgetauscht. Diese Zellen wurden in einen CO<sub>2</sub>-Inkubator (US AutoFlow, NuAire, Inc., Plymouth, MN, USA) mit einer Temperatur von 39° C und ansonsten gleichen Bedingungen wie bei 33° C gebracht. Alle drei Tage erfolgte ein Wechsel des Differenzierungsmediums. Am Tag 28 wurde das Zellmaterial der verbliebenen PS analog zu Tag 0 gewonnen und die Zellpellets ebenfalls bei -80° C eingefroren. Die Zellzahl pro PS betrug zu diesem Zeitpunkt ca. 150.000.

### 2.3.2 Homogenisation des Zellmaterials

Folgende Lösungen wurden entsprechend der Probenmasse zur Lyse auf die gefrorene Probe gegeben: Lysepuffer (Masse Zellpellet x 9 µl), Complete (Masse x 0,4 µl), PMSF (Masse x 0,1 µl) und PepA (Masse x 0,1 µl). Nach dem Auftauen wurde für 10 s bei 1500 rpm mit einem Vortexer (Reax control, Heidolph Instruments, Schwabach) durchmischt. Darauf folgte ein Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff. Die wieder aufgetaute Probe wurde dann bei 0 °C für 5 min in ein Ultraschallbad (Sonorex RK 31, Bandelin, Berlin) gegeben. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 15.000 rpm für 20 min (Megafuge 1.0R, Rotor Nr. 3041). Die entstandenen Überstände wurden jeweils entsprechend der Zeitpunkte 33° C/Tag 0 und 39° C/Tag 28 vereinigt, je 20 µl zur Proteinbestimmung

abgenommen und die übrigen Probenvolumina zu je 100 µl aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80° C aufbewahrt.

### **2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der entstandenen Proben erfolgte nach der 1976 von Bradford entwickelten Methode. Es wurde eine Bradfordlösung der Firma Sigma-Aldrich verwandt. Die Proteine der Probe reagieren dabei mit dem Farbstoff der Lösung Brilliant Blue G zu einem Komplex. Dabei kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der Lösung von 465 nm zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm korreliert mit der Menge an gebildetem Protein-Farbstoff-Komplex und somit mit der Proteinkonzentration der vermessenen Probe. Die Absorption wurde in dieser Arbeit durch ein Photometer (Ultrospec 1100, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) bei 595 nm bestimmt. Zuvor wurde mit Hilfe von BSA-Lösungen festgelegter Konzentrationen eine Eichgerade erstellt. Vor jeder Probenmessung wurden Standardkonzentrationen von 4 µg/µl und 6 µg/µl gemessen. Dabei wurden Abweichungen zu den Eichwerten von maximal 10% toleriert. Jede Probe wurde zweimal unabhängig voneinander gemessen und der Mittelwert der bestimmten Werte gebildet.

### **2.3.4 Erste Dimension – Isoelektrische Fokussierung**

Für die IEF in dieser Arbeit wurde der nötige pH-Gradient durch Immobiline™ DryStrip pH 3-10NL, 18 cm (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) erzeugt. Diese verfügen über einen immobilisierten pH-Gradienten (IPG), der durch Kopolymerisation von exakt definierten Acrylamidderivaten mit unterschiedlich puffernden Gruppen – den sogenannten Immobilinen™ – mit den Acrylamidmonomeren der Matrix entsteht. Diese Methode wurde von Bjellquist et al. 1982 entwickelt und zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus: sehr gute Stabilität des pH-Gradienten während der gesamten Fokussierung, Auflösung bis in den Bereich von 0,01 pH-Einheiten, einheitliche Leitfähigkeit und Pufferkapazität sowie relative Unabhängigkeit von der Salzkonzentration der Probe (Görg et al., 1983). Außerdem hat bei Verwendung eines solchen IPG nur die Temperatur Einfluss auf den IEP und z.B. nicht die Konzentration von 7 M Harnstoff im Lysepuffer (Bjellquist et al., 1993). Im Folgenden wurden deshalb alle IEFs bei einer konstanten Temperatur von 20° C durchgeführt.

Der pH-Bereich 3-10 NL wurde gewählt, da in dieser Arbeit ein möglichst umfassender Überblick über das Proteinmuster der CSM14.1-Zellen im undifferenzierten und differenzierten Zustand gewonnen werden sollte. Auf diesen Strips ist der pH-Gradient nicht linear verteilt, sondern die extremen pH-Bereiche an den beiden Enden eines Strips sind



verhältnismäßig zur Gesamtstriplänge weniger repräsentiert als der Bereich pH 5-8. Dieser nimmt ca. 60% der Strip-Länge ein.

Vor Beginn einer IEF müssen die bestehenden Quervernetzungen durch Cystinbrücken innerhalb der Proteine reduziert werden, so dass je zwei freie Cysteinreste entstehen. Deshalb wurden die Proben in dieser Arbeit mit DL-Dithiothreitol (DTT) inkubiert. Die auf diese Weise reduzierten Sulfhydrylgruppen reoxidieren jedoch im Verlauf einer IEF insbesondere im basischen Bereich spontan. Dabei entstehen Artefaktbanden und „falsche“, d.h. in der Probe gar nicht vorhandene Proteinspots durch unkontrollierte Bildung von Cystinbrücken innerhalb eines Proteins und zwischen verschiedenen Proteinen (Herbert et al., 2001). Um die freien Sulfhydrylgruppen durch Alkylierung zu schützen sowie überschüssiges DTT zu binden wurde hier 2-Vinyl-Pyridin (2-VP) benutzt. Diese Substanz stellt eine Alternative zum häufig verwendeten Jodacetamid dar und führt zu weniger Artefakten vor allem im basischen Bereich (Bai et al., 2005; Righetti, 2006).

Vor einer IEF wurden die Strips laut Anleitung des Herstellers für 20 Stunden bei 20° C passiv mit Rehydrationspuffer rehydriert. Danach erfolgte nach Inkubation der Proben mit 20 mM 2-VP für 90 min und mit einer äquimolaren Menge DTT (20 mM) für 30 min, um überschüssiges 2-VP zu binden. Anschließend wurden die Strips mittels der Cup-loading-Technik an Anode und Kathode mit je 500 µg Protein pro Strip beladen. Die Fokussierung erfolgte in einer Protean® IEF Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Im ersten Schritt erfolgte ein linearer Spannungsanstieg innerhalb von 30 min auf 250 V, in dem die Proteine aus den Cups in die Matrix der Strips übertreten. Danach folgte ein exponentieller Anstieg auf 8000 V in drei Stunden. Der eigentliche Fokussierungsschritt erfolgte bei 8000 V bis zum Erreichen von 99.999 Vh. Anschließend wurden die Strips bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.3.5 Zweite Dimension – SDS-Gelelektrophorese**

Die Acrylamid-Gele für die zweite Dimension wurden mit Hilfe einer Protean® Plus Multi Casting Chamber (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) von Hand hergestellt. In dieser Arbeit wurde eine Acrylamidkonzentration von 12% gewählt. In diesen Gelen lassen sich Proteine mit einem MW von ca. 150 kD bis 15 kD auftrennen. Größeren Proteinen gelingt es nicht nennenswert, in das Acrylamidnetzwerk einzudringen, während kleinere so schnell hindurch wandern, dass sie das Gel am Ende der Elektrophorese schon wieder verlassen haben.

Die Strips wurden vor Beginn der SDS-Gelelektrophorese zunächst equilibriert um zwitterionische Detergentien wie z.B. CHAPS, die für die vorherigen Schritte notwendig waren, zu entfernen und die Ausbildung von SDS-Protein-Komplexen zu ermöglichen. Außerdem mussten ggf. erneut entstandene Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten reduziert werden. Hierfür wurde der erste Equilibrierungspuffer mit 64,8 mM DTT versetzt. Der zweite Equilibrierungsschritt erfolgte mit 20 mM 2-VP zur Stabilisierung.

Nach Auflegen eines Strips auf ein Trenngel wurde dieser mit Agarose überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte in einer Protean Plus Dodeca Cell (Bio-Rad) bei konstant 125 V und 12° C. Die maximal zulässige Stromstärke wurde bei 12 parallel gefahrenen Gelen auf 500 mA begrenzt. Es erfolgte jeweils eine Elektrophorese von 12 Gelen mit Proben von den Zeitpunkten Tag 0 und Tag 28. Nach je ca. 16 Stunden wurden diese beendet. Anschließend wurden die Gele für 24 Stunden fixiert und 48 Stunden in Coomassie-Lösung gefärbt. Nach dem Entfernen überschüssigen Farbstoffs in Reinstwasser für 24 Stunden erfolgte das Digitalisieren der Gele mit 300 dpi und 16 bit (Heidelberg Nexscan F4100, Heidelberger Druckmaschinen AG, Heidelberg). Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Gele in 0,02%-Na-Acetat-Lösung aufbewahrt.

### **2.3.6 Auswertung der digitalisierten Gele**

Die Auswertung der digitalisierten Gele erfolgte mit Hilfe des Programms Progenesis PG 200 Version 2006 (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle, Großbritannien). Für einen Vergleich zwischen Tag 0 (undifferenzierte Zellen) und Tag 28 (differenzierte Zellen) wurden diese innerhalb des Programms zu einem Experiment zusammengefasst. Aus den Gelen vom Zeitpunkt Tag 0 wurde ein Referenzgel (33-ref) für dieses Experiment bestimmt. Auf dieses Gel wurden je 6 Experimentalgele (33-1 bis 33-6) vom Zeitpunkt Tag 0 und vom Zeitpunkt Tag 28 (39-1 bis 39-6) bezogen. Dazu wurden in allen Gelen die Spots manuell markiert. Jedes Experimentalgel wurde einzeln mit dem Referenzgel überlagert. Gleiche Spots in beiden Gelen wurden durch einen Mustervergleich ermittelt und markiert („matchen“).

Anschließend wurden die Intensitäten der einzelnen gematchten Spots statistisch verglichen, um eine differentielle Analyse der Proteinexpression zwischen undifferenzierten CSM14.1-Zellen (Tag 0) und differenzierten Zellen (Tag 28) durchzuführen. Dabei wurden die technisch bedingt nicht genau gleiche Färbung der einzelnen Gele sowie die jeweilige Hintergrundfärbung berücksichtigt. Es wurden folgende Festlegungen getroffen, um den danach noch bestehenden Variationen zwischen den Gelen eines Zeitpunktes gerecht zu werden und so den Einfluss zufälliger Fehler klein zu halten:

Ein Spot wurde bei differenzierten CSM14.1-Zellen als hochreguliert („UP“) angesehen, wenn eine Zunahme der Spotintensität in 5 bzw. 6 Gelen der Tag 28-Gruppe auftrat. Außerdem musste der gleiche Spot in 5 bzw. 6 Gelen der Tag 0-Gruppe vorhanden sein. Spots, die in weniger als 5 Gelen einer Gruppe vorkamen, wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Analog wurde bei der Bestimmung der herunter regulierten Spots („DOWN“) verfahren. Als dritte Gruppe wurden die Spots ermittelt, die in 5 oder 6 Gelen der Tag 28-Gruppe vorhanden waren, aber nicht im 33-ref-Gel („absent spots“). Zusätzlich wurde kontrolliert, dass ein vergleichbarer Spot nicht in einem anderen Gel der Tag 0-Gruppe vorhanden war.

Für die weitere Auswertung mittels MALDI-TOF war es außerdem nötig Spots festzulegen, die in allen Gelen der beiden Gruppen vorhanden sind. Diese dienen bei der weiteren technischen Ausführung des Spot-Pickens durch einen Roboter als Orientierungspunkte („landmark“).

### **2.3.7 MALDI-TOF, Peptid-Massen-Fingerabdruck**

Die weitere Identifikation der ausgewählten Spots wurde freundlicherweise vom Proteom-Zentrum Rostock, Abteilung für Proteomforschung (Direktor: Prof. Dr. Michael O. Glocker) im Institut für Immunologie der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock durchgeführt. Eine Darstellung der durchgeführten Prozesse findet sich in Lessner et al., 2010.

Nähere Informationen über die identifizierten Proteine wurden anschließend durch Abfrage in der Proteindatenbank UniProtKB/Swiss-Prot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) gewonnen.

### 2.3.8 Lösungen Proteomics

Tabelle 6: Lösungen für die Proteinaufreinigung

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS 0,1 M pH 7.4	8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,27 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , in RW lösen, pH-Einstellung mit HCl (37%), mit RW auf 1 l auffüllen
Lysepuffer	42,04 g Harnstoff (7 M), 15,22 g Thioharnstoff (2 M), 1,08 g DTT (70 mM), 4 g CHAPS (4% (w/v)), 250 µl 40%-Ampholyte (0,5%), mit RW auf 100 ml auffüllen
Complete®	1 Tablette Complete, 1,5 ml RW
PMSF	174,2 mg Phenylmethansulfonylfluorid, 10 ml 96%-Ethanol
PepA	0,96 mg PepstatinA, 10 ml 96%-Ethanol

Tabelle 7: Lösungen für die Isoelektrische Fokussierung

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Rehydrationspuffer	1,903 g Thioharnstoff (2 M), 9,009 g Harnstoff (6 M), 0,3 g CHAPS (2% (w/v)), 62,5 mg DTT (16mM), 125 µl Ampholyte, mit RW auf 25 ml auffüllen

Tabelle 8: Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Trenngelpuffer pH 8.8	181,65 g TRIS, 4 g SDS, in RW lösen, pH-Einstellung mit HCl (37%), mit RW auf 1 l auffüllen
1,5 M TRIS-HCl pH 8.8	18,17 g TRIS, in RW lösen, pH-Einstellung mit HCl (37%), mit RW auf 100 ml auffüllen
Equilibrierungspuffer	6,67 ml 1,5 M TRIS-HCl pH 8.8, 72,07 g Harnstoff, 69 ml Glycerol, 4 g SDS, 200 ml RW, einige Kristalle Bromphenolblau
DTT (64,8 mM) – Equilibrierungslösung	30 ml Equilibrierungspuffer, 300 mg DTT
2-VP (20 mM) - Equilibrierungslösung	30 ml Equilibrierungspuffer, 65,1 µl 2-VP
Elektrophoresepuffer (10x)	30,3 g TRIS, 144 g Glycin, 10 g SDS, in RW lösen, mit RW auf 1 l auffüllen
Trenngel 12% (2 x 6 Stück, 20 cm x 20 cm)	564 ml Trenngelpuffer, 422 ml RW, 424 ml Acryamid 40% (29:1), 7 ml APS 10% (w/v), 500 µl TEMED
1% Overlay-Agarose	13,6 ml Trenngelpuffer pH 8.8, 4 g Agarose NEE0, 6,4 g SDS, 120 ml Glycerol, in RW lösen, mit RW auf 400 ml auffüllen

Tabelle 9: Lösungen zum Fixieren, Färben und Aufbewahren der SDS-Gele

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Fixierer	450 ml Methanol, 10 ml Essigsäure, 550 ml RW
Coomassie-Färbelösung	200 g Ammoniumsulfat, in 1 l RW lösen, 23,5 ml O-Phosphorsäure zugeben. 2 g Coomassie G250, in 200 ml RW lösen. Zusammengießen, mit RW auf 2 l auffüllen. 500 ml Methanol zugeben.
0,02% - Na-Acetat - Lösung	200 mg Na-Acetat, 1 l RW

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Immuncytochemie und stereologische Auswertung

Nachfolgend werden die Ergebnisse der immuncytochemischen Experimente vorgestellt.

##### 3.1.1 Nestin

Nestin wird als Marker zur Darstellung neuronaler Progenitorzellen verwendet. Während der Differenzierung nimmt der Nestingehalt der CSM14.1-Zellen ab (Abbildung 5).

In dieser Arbeit lassen sich an allen drei Zeitpunkten (Tag 0, Tag 14, Tag 28) Nestin-positive Zellen nachweisen. Sie zeigen eine filamentöse Färbung im Zytoplasma unter Aussparung des Zellkerns (Abbildung 6). Diese Beobachtung entspricht dem typischen Färbemuster für Nestin wie von Hockfield und McKay 1985 beschrieben. Zum Zeitpunkt Tag 0, d.h. im undifferenzierten Zustand, liegt ein Anteil von im Mittel 38,74% ( $\pm 0,62$ ) Nestin-positiver Zellen vor (Tabelle 11, Anhang). Nach 14 Tagen Differenzierung (Tag 14) nimmt dieser Wert signifikant auf im Mittel 11,46% ( $\pm 0,53$ ) ab (p-Wert  $< 0,001$ ). Zum Zeitpunkt Tag 28 nach weiteren zwei Wochen Differenzierung sind im Mittel 15,09% ( $\pm 3,72$ ) der Zellen Nestin-positiv. Dieser Anstieg zwischen den Zeitpunkten Tag 14 und Tag 28 ist statistisch nicht signifikant (p-Wert  $> 0,5$ ). Die Abnahme des Anteils Nestin-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl zwischen Tag 0 und Tag 28 ist hingegen signifikant (p-Wert  $< 0,001$ ).

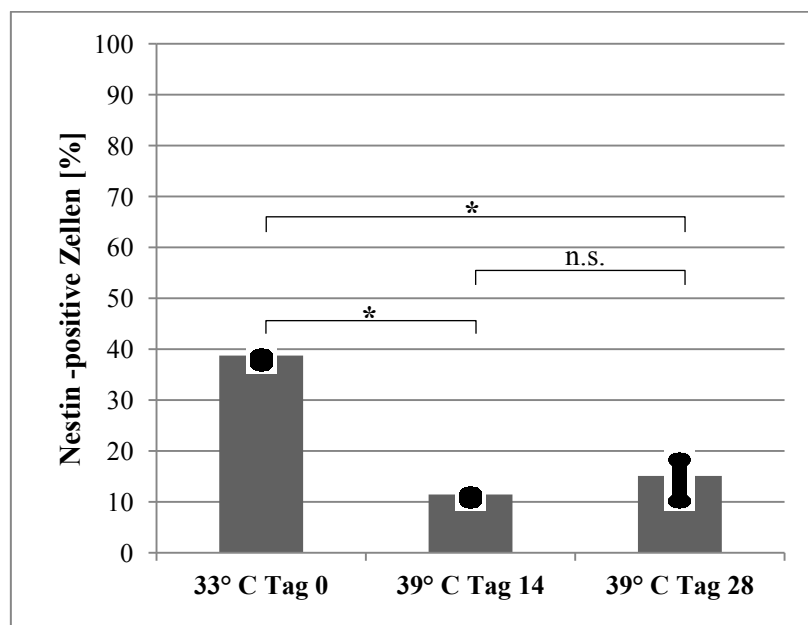


Abbildung 5: **Nestin-positive Zellen in Prozent an der Gesamtzellzahl**; 33° C (Tag 0), 39° C (Tag 14), 39° C (Tag 28); \* = p-Wert  $< 0,001$ ; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

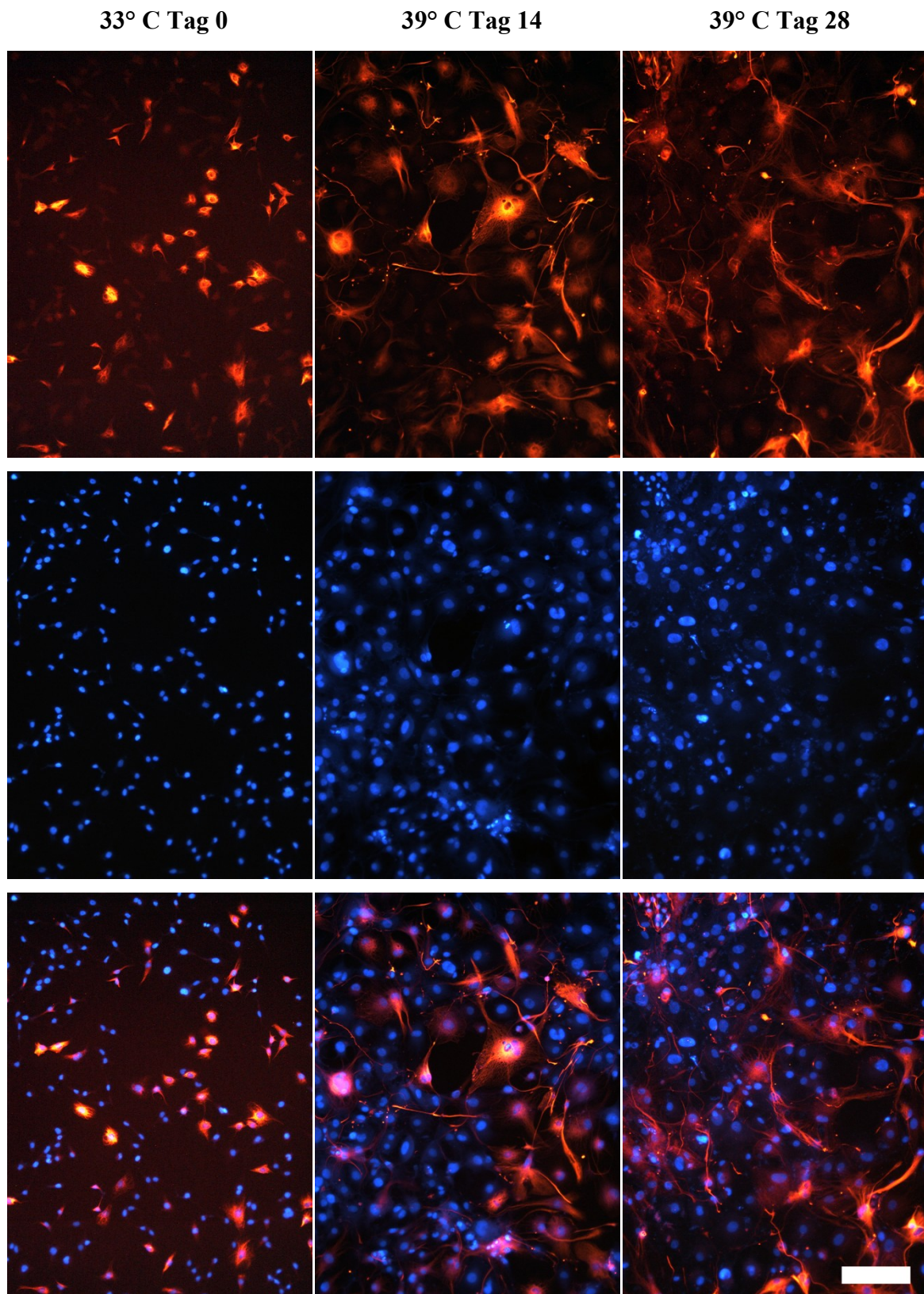


Abbildung 6: **CSM14.1-Zellen gefärbt gegen den Progenitorzellmarker Nestin (rot) und den Kernfarbstoff DAPI (blau)**; erste Reihe: Nestin-positive Zellen, zweite Reihe: Zellkerne aller Zellen, dritte Reihe: digitale Überlagerung; Messbalken: 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.2 Glial fibrillary acidic protein (GFAP)

GFAP spielt eine entscheidende Rolle für die Funktionsfähigkeit von Astrozyten, in dem es die Stabilität der Zellfortsätze gewährleistet. Es stellt somit das wichtigste Intermediärfilament der Astrozyten dar (Eng et al., 2000) und gehört zur Gruppe III der Intermediärfilamente (Steinert und Liem, 1990). Mit der Differenzierung zu einem Astrozyten beginnt die Synthese von GFAP und die Expression steigt auch bei Ausbildung einer Glianarbe nach Hirngewebsverletzung signifikant an (Eddleston und Mucke, 1993; Zhu et al. 2007).

Undifferenzierte CSM14.1-Zellen (Tag 0) zeigen keinerlei Immunreaktivität bzw. Fluoreszenz und sind für die Expression von GFAP negativ (Abbildungen 7 und 8). Nach zwei Wochen Differenzierung bei 39 ° C und FCS-Reduktion auf 1% (Tag 14) sind im Mittel 18,72% ( $\pm 2,54$ ) der Zellen positiv für GFAP (Tabelle 12, Anhang). Es zeigt sich ähnlich wie bei Nestin eine filamentöse Färbung bis in die Enden der Zellausläufer ohne Beteiligung des Kerns (Abbildung 8). Nach insgesamt vier Wochen Differenzierung sind im Mittel 19,66% ( $\pm 2,04$ ) der CSM14.1-Zellen GFAP-positiv. Zwischen diesen beiden Zeitpunkten kommt es zu keiner signifikanten Zunahme des Anteils GFAP-exprimierender Zellen ( $p > 0,05\%$ ). Allerdings fällt eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität zwischen den Zeitpunkten Tag 14 und Tag 28 auf (Abbildung 8).

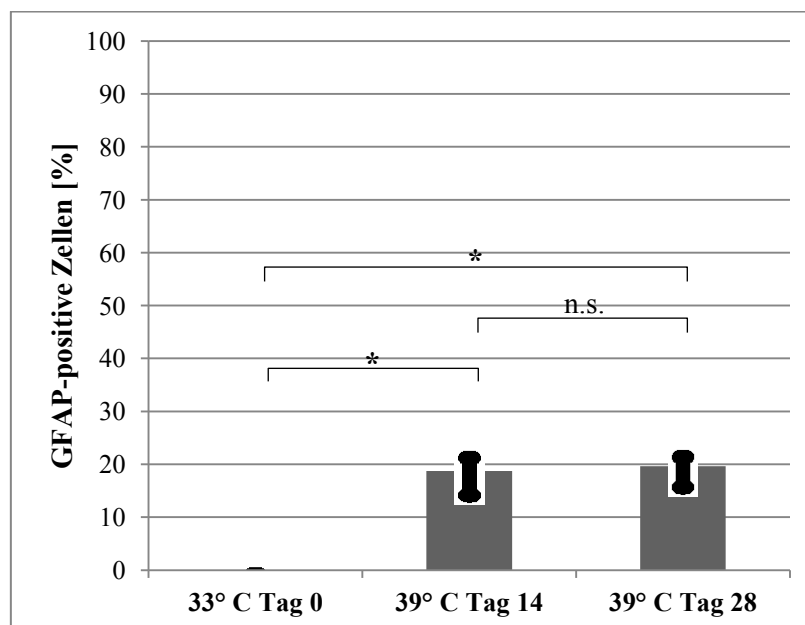


Abbildung 7: **GFAP-positive Zellen in Prozent an der Gesamtzellzahl**; 33° C (Tag 0), 39° C (Tag 14), 39° C (Tag 28); \* = p-Wert < 0,001; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.



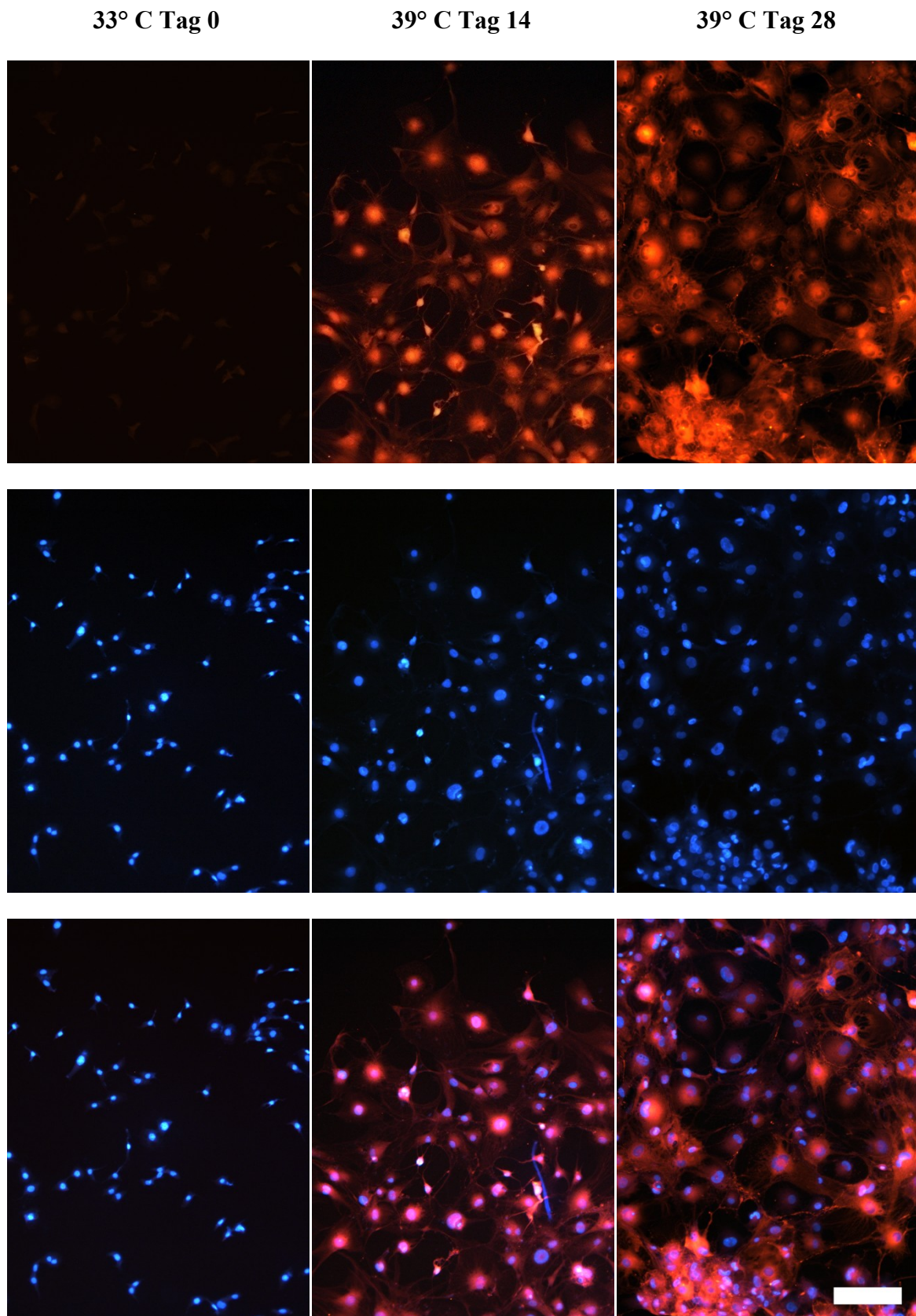


Abbildung 8: **CSM14.1-Zellen gefärbt gegen den Astrozytenmarker GFAP (rot) und den Kernfarbstoff DAPI (blau)**; erste Reihe: GFAP-positive Zellen, zweite Reihe: Zellkerne aller Zellen, dritte Reihe: digitale Überlagerung; Messbalken: 200  $\mu\text{m}$

### 3.1.3 Neuronal Nuclei (NeuN)

NeuN gilt als Standardmarker für die Identifizierung postmitotischer Nervenzellen im ZNS sowie in der Zellkultur (Gage et al., 1995). Es ist ein lösliches Kernprotein mit unbekannter Funktion. Der in dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper Anti-NeuN aus Maus, Klon A60 bindet hauptsächlich an Epitope im Zytoplasma der Zellen (Mullen et al., 1992).

Die untersuchten Zellen der Zelllinie CSM14.1 zeigen im undifferenzierten Zustand (Tag 0) keine Immunreaktivität für den Antikörper gegen NeuN (Abbildungen 9 und 10). Zum Zeitpunkt Tag 14, d.h. nach zwei Wochen Differenzierung sind im Mittel 27,56% ( $\pm 3,31$ ) der Zellen positiv für NeuN (Tabelle 13, Anhang) und es liegt eine feingranuläre Immunfärbung der gesamten Zelle unter weitgehender Aussparung der Zellkerne vor (Abbildung 10). Nach weiteren zwei Wochen Differenzierung (Tag 28) sind im Mittel 64,06% ( $\pm 2,74$ ) der Zellen immunreaktiv für NeuN. Diese Zunahme ist statistisch signifikant (p-Wert < 0,001).

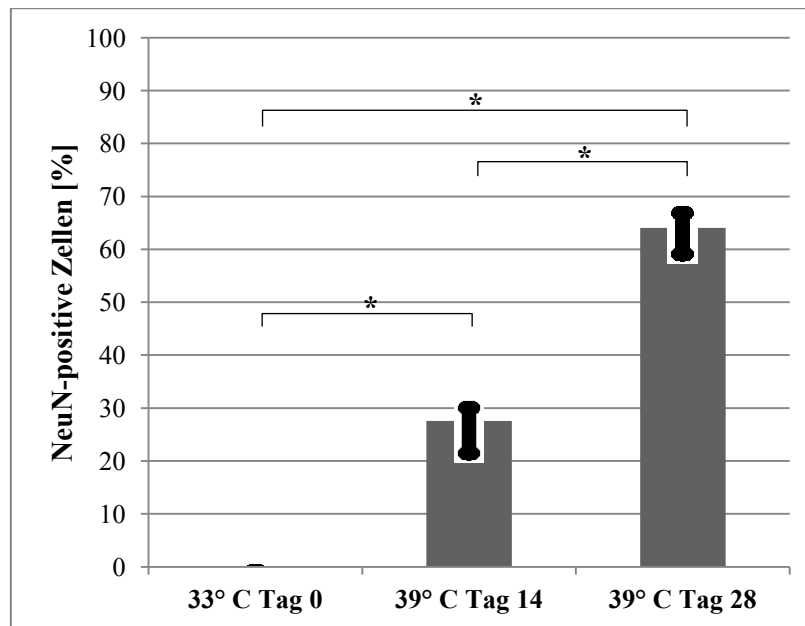


Abbildung 9: **NeuN-positive Zellen in Prozent an der Gesamtzellzahl**; 33° C (Tag 0), 39° C (Tag 14), 39° C (Tag 28); \* = p-Wert < 0,001; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

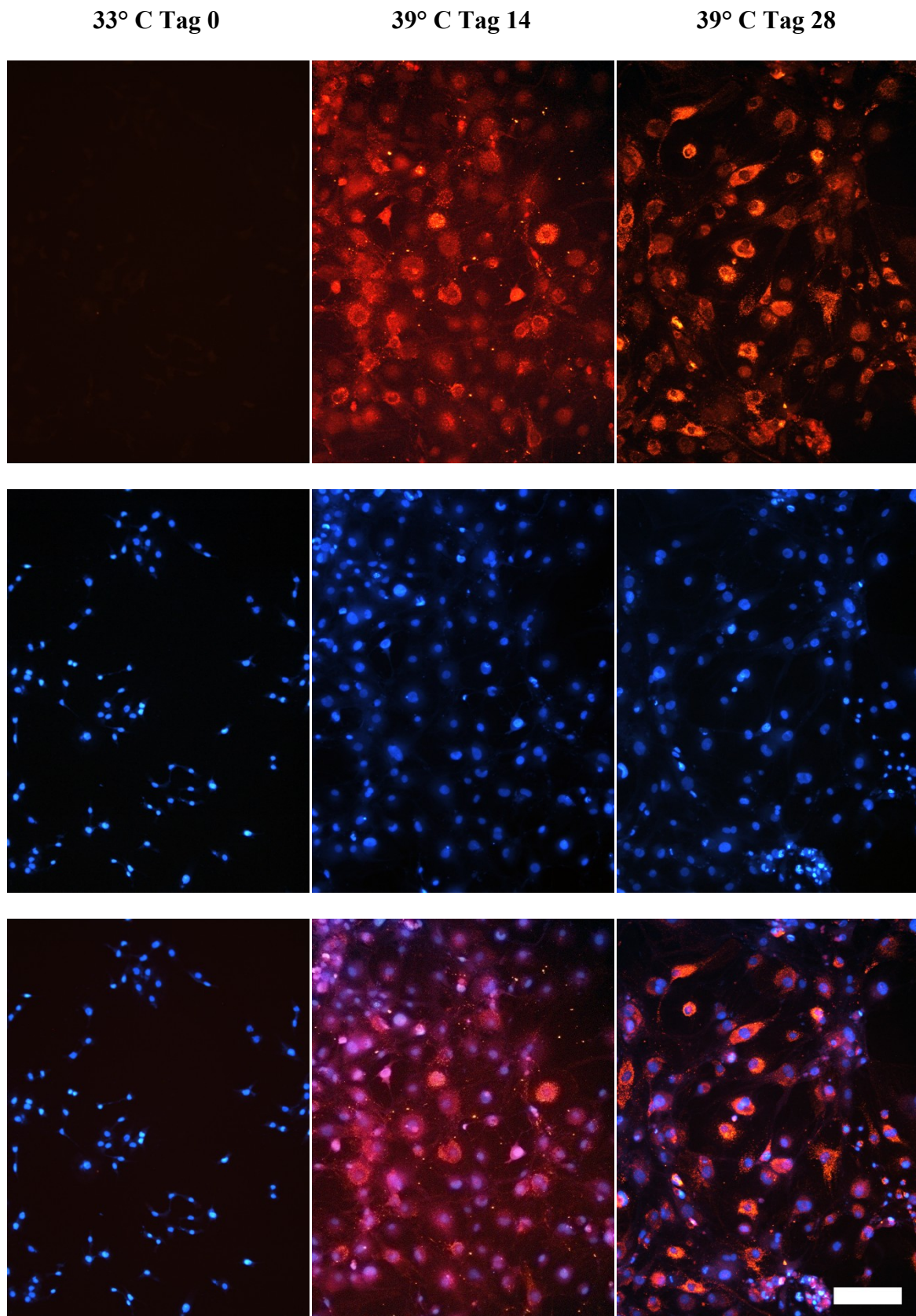


Abbildung 10: **CSM14.1-Zellen gefärbt gegen den Neuronenmarker NeuN (rot) und den Kernfarbstoff DAPI (blau)**; erste Reihe: NeuN-positive Zellen, zweite Reihe: Zellkerne aller Zellen, dritte Reihe: digitale Überlagerung; Messbalken: 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.4 Tyrosinhydroxylase (TH)

Das Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese TH kann zur Identifizierung dopaminerger Neurone genutzt werden (Andreeva et al., 1996; Cheung et al., 1997). In der Regel ist das gesamte Zytoplasma bis in die Ausläufer der Zellen immunreaktiv. Der verwendete monoklonale Antikörper Anti-TH aus Maus wurde schon erfolgreich für die Charakterisierung der Zelllinie CSM14.1 mittels Western-Blot verwendet (Haas und Wree, 2002).

In dieser Arbeit sind die undifferenzierten Zellen (Tag 0) nicht immunreaktiv für den verwendeten Antikörper gegen TH (Abbildungen 11 und 12). Nach zwei Wochen Differenzierung (Tag 14) hingegen sind im Mittel 12,07% ( $\pm 1,71$ ) der Zellen positiv für TH (Tabelle 14, Anhang). Die Färbung ist granulär im Zytoplasma und konzentriert sich um den Zellkern (Abbildung 12). Zum Zeitpunkt Tag 28 sind im Mittel 55,69% ( $\pm 2,92$ ) der CSM14.1-Zellen TH-immunreaktiv. Diese Zunahme ist statistisch signifikant ( $p$ -Wert  $< 0,001$ ). In den einzelnen Zellen sind mehr TH-positive Granula vorhanden. Diese verteilen sich außerdem mehr in Richtung Zellausläufer.

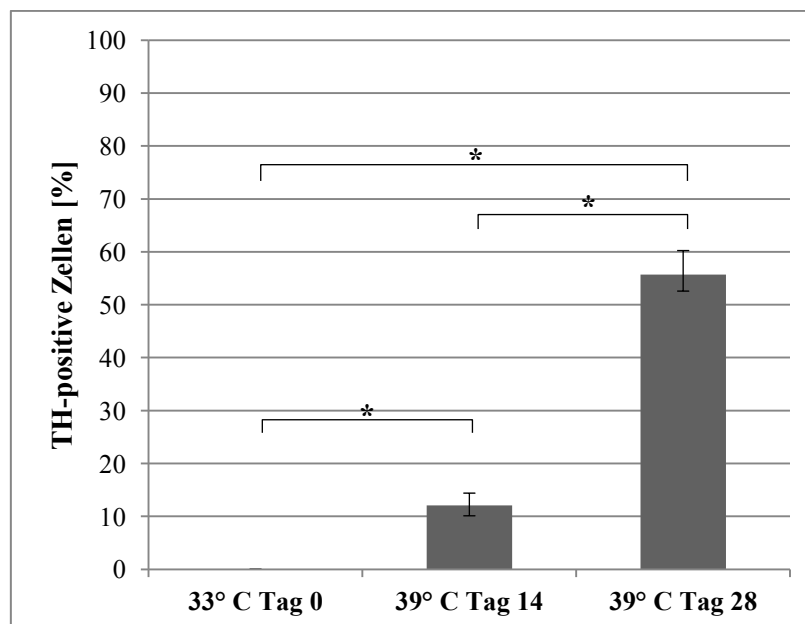


Abbildung 11: **TH-positive Zellen in Prozent an der Gesamtzellzahl; 33° C (Tag 0), 39° C (Tag 14), 39° C (Tag 28); \* = p-Wert  $< 0,001$ ; Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.**

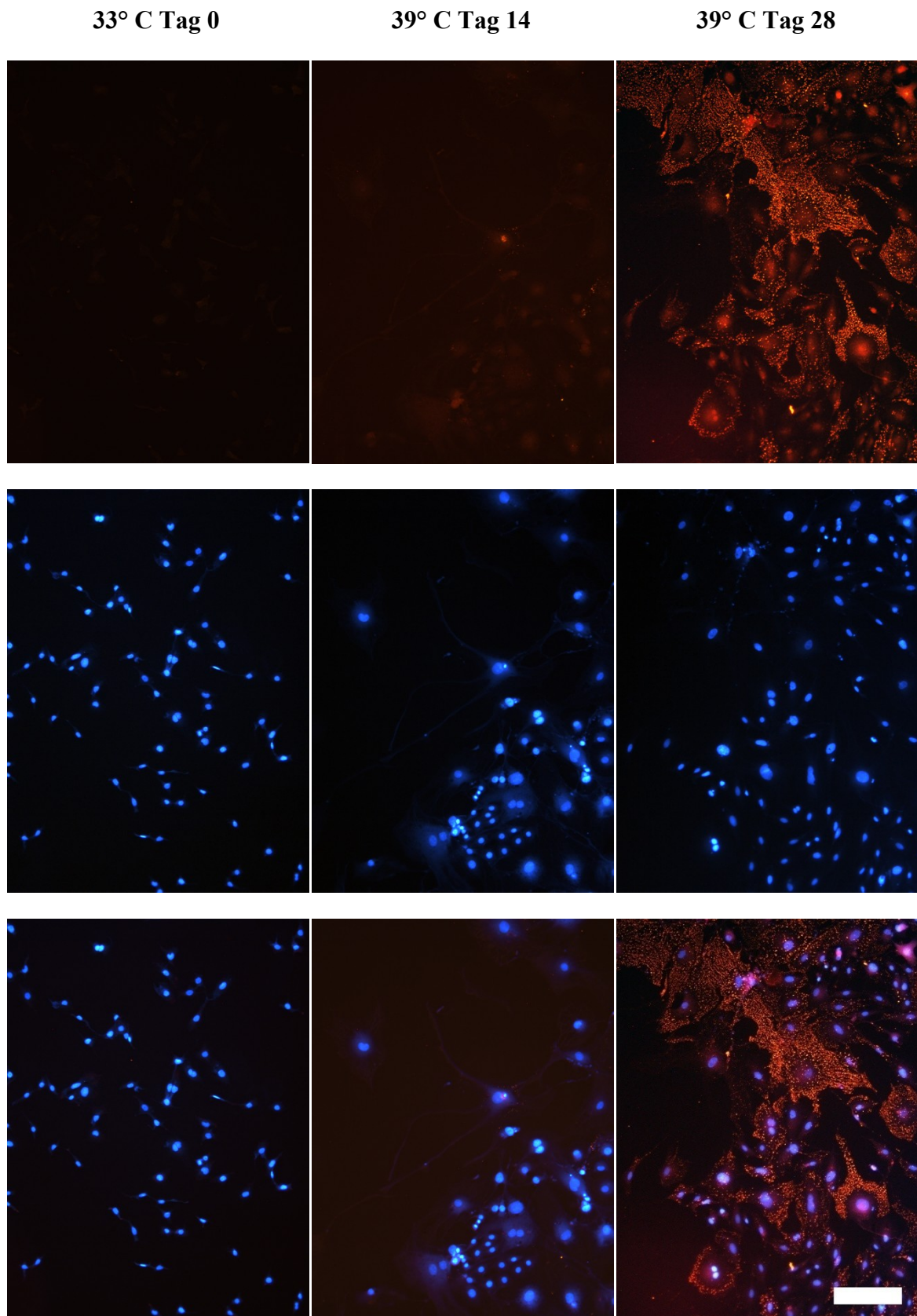


Abbildung 12: CSM14.1-Zellen gefärbt gegen den dopaminergen Marker TH (rot) und den Kernfarbstoff DAPI (blau); erste Reihe: TH-positive Zellen, zweite Reihe: Zellkerne aller Zellen, dritte Reihe: digitale Überlagerung; Messbalken: 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.2 Proteomics

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vergleichenden Charakterisierung der Zelllinie CSM14.1 im undifferenzierten Zustand (Tag 0) und nach 4 Wochen Differenzierung (Tag 28) mittels Proteomics präsentiert. Die Anzahl der manuell im Programm Progenesis 2.0 ermittelten Spots, die Anzahl der von diesen auf das Referenzgel gematchten Spots sowie der Anteil der gematchten Spots an der Gesamtspotanzahl eines Gels ist im Anhang (Tabelle 15) aufgeführt.

In den Gelen vom Zeitpunkt Tag 0 konnten im Mittel 70,20% ( $\pm 5,30$ ) der Spots auf das Referenzgel gematcht werden. Bei den Gelen vom Zeitpunkt Tag 28 betrug dieser Anteil im Mittel nur 49,20% ( $\pm 3,37$ ). Abbildung 13 und 14 zeigen das Referenzgel sowie ein exemplarisch ausgewähltes Gel vom Zeitpunkt Tag 28.

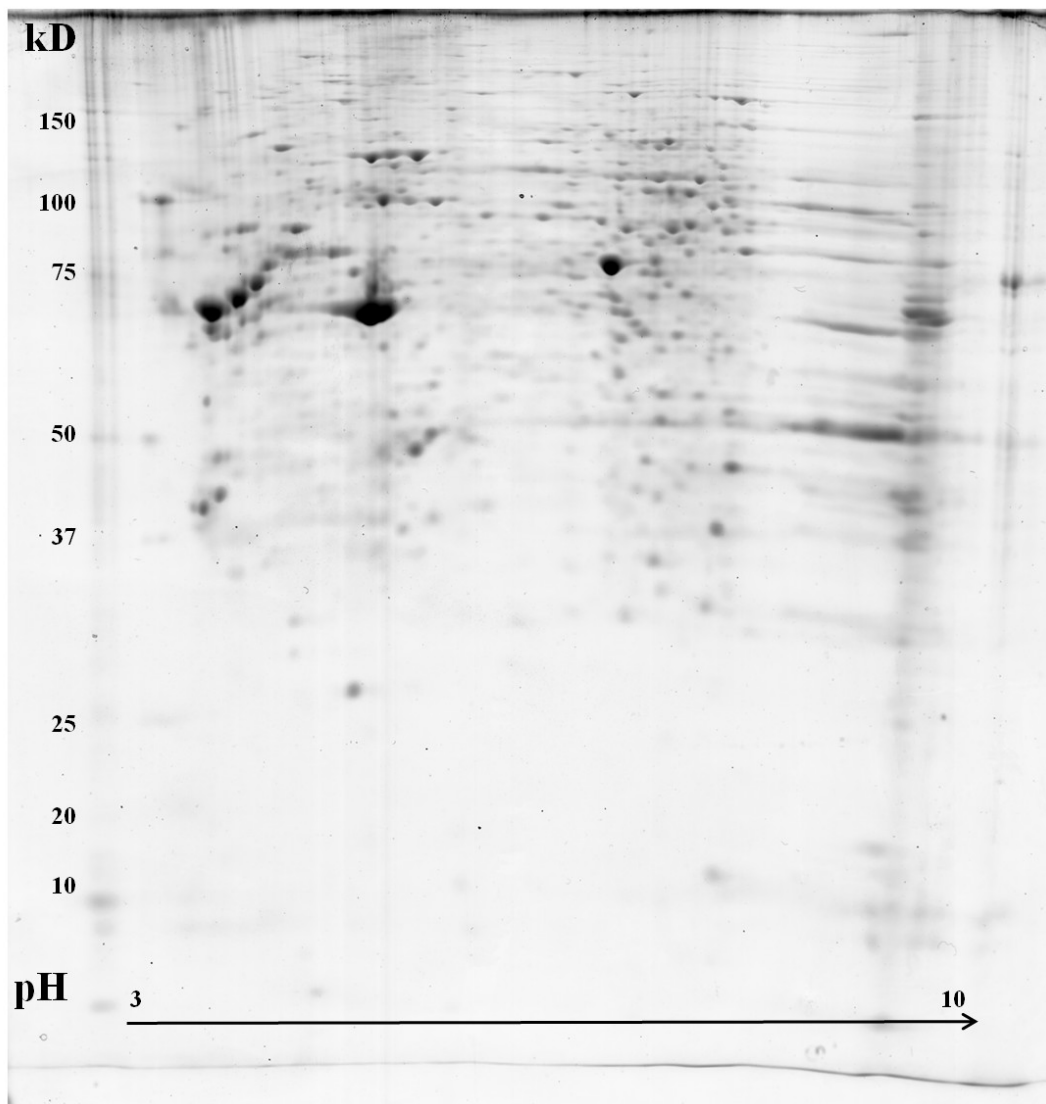


Abbildung 13: **Referenzgel**; Zeitpunkt Tag 0, pH-Bereich 3 bis 10 nicht-linear, Massenbereich in kD (näherungsweise)

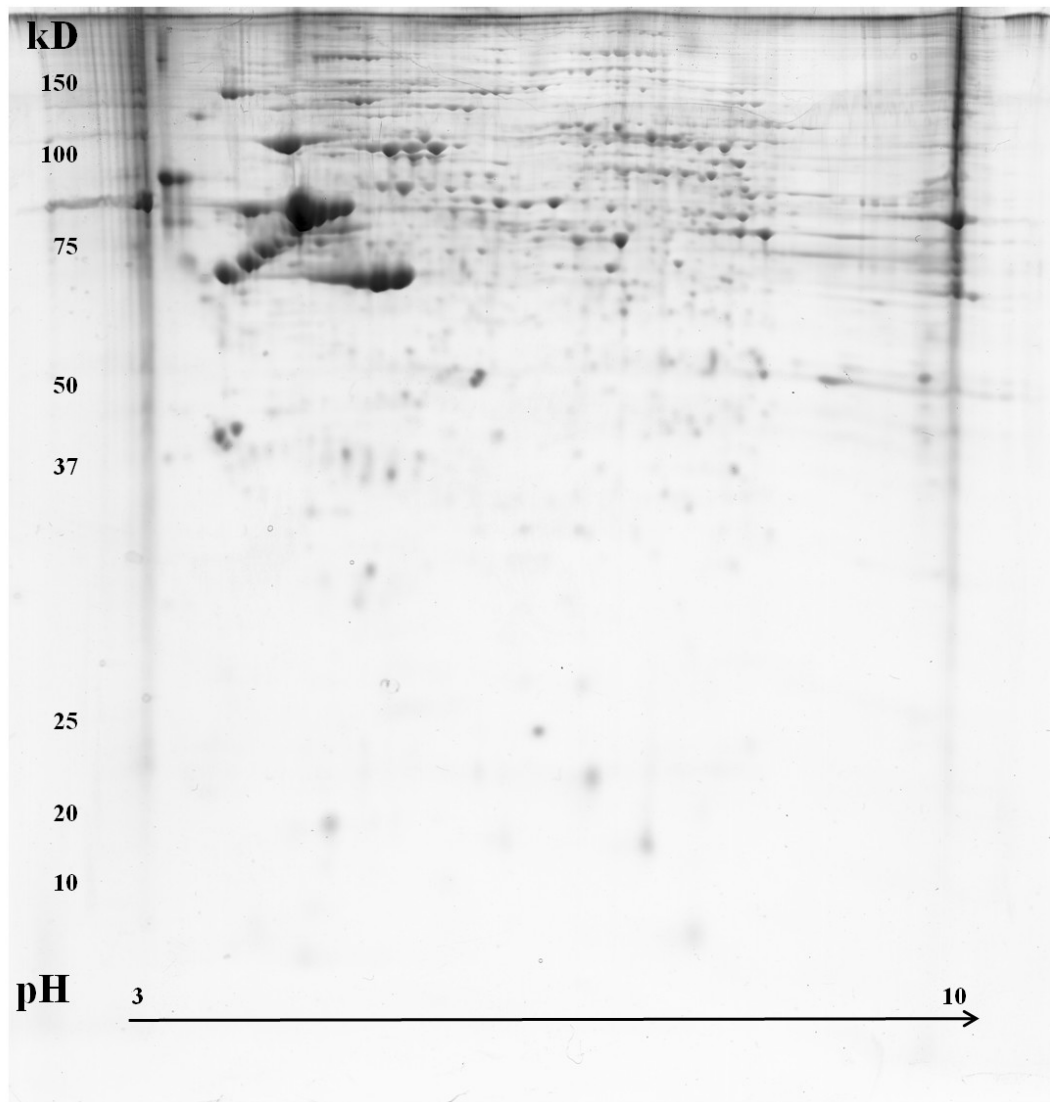


Abbildung 14: **Experimental-Gel Tag 28 (Beispiel)**; pH-Bereich 3 bis 10 nicht-linear, Massenbereich in kD (näherungsweise)

Es folgen die Ergebnisse der differentiellen Prüfung einer Zu- bzw. Abnahme der Proteinexpression (UP bzw. DOWN) sowie einer Neuexpression (absent) bei der Differenzierung der CSM14.1-Zellen. Insgesamt wurden 97 Spots anhand der beschriebenen Kriterien (siehe 2.3.6) zur Analyse mittels MALDI-TOF ausgewählt: 27 Spots UP, 24 Spots DOWN und 46 absent Spots. Hinzu kamen noch 19 sogenannte landmark-Spots.

Durch das Proteomzentrum konnten insgesamt 64 Proteine identifiziert werden, wobei einige Proteine durch mehrere Spots abgebildet wurden. Die identifizierten Proteine sind zur übersichtlicheren Darstellung in Tabelle 10 aufgeführt und soweit möglich nach Funktionsbereichen innerhalb der Zelle sortiert. Alle grau unterlegten Spots weisen eine Expressionsänderung auf.

Tabelle 10: Ergebnisse der Proteinidentifikation; aufgeführt sind Acc. No. (Identifikation in der Datenbank Mascot) sowie Entry name (Identifikation in der Datenbank Swiss-Prot), der internationale Proteinname, die Expression (landmark-Spots sind farblich nicht unterlegt), Score (Mascot-Score), MW (theoretische Proteinmasse in Da), pI (theoretischer isoelektrischer Punkt), Qm (Query matches, Anzahl der detektierten und identifizierten massenspektrometrischen Signale), Sc (Sequence covery, Anteil der durch detektierte Peptidfragmente abgedeckten Aminosäuresequenz in Prozent), mixed (gemischter Spot +/-).

<b>Strukturproteine</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
Q6AYZ1	TBA1C_RAT	Tubulin alpha 1C-chain	absent	56	50590	4,96	4	11	-
P31000	VIME_RAT	Vimentin	UP	205	53757	5,06	24	36	-
P70615	LMNB1_RAT	Lamin-B1	UP	188	66794	5,16	21	33	-
P60711	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1	UP	110	42052	5,29	9	25	-
Q4V7C7	ARP3_RAT	Actin related protein 3	UP	168	47783	5,61	15	36	-
P85108	TBB2A_RAT	Tubulin beta 2A chain	UP	92	50274	4,78	14	40	+
P48679	LMNA_RAT	Lamin-A	landmark	401	74564	6,54	48	51	-
Q63610	TPM3_RAT	Tropomyosin- alpha 3 chain	landmark	202	29217	4,75	18	43	-
P09495	TPM4_RAT	Tropomyosin-alpha 4 chain	landmark	253	28549	4,66	19	47	-

<b>Regulationsproteine</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
Q5BKC9	NGEF_RAT	Ephexin-1	absent	55	81527	5,85	6	9	-
P62142	PP1B_RAT	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	absent	66	37961	5,84	5	19	-
O35763	MOES_RAT	Moesin	absent	88	67868	6,16	10	16	-
P14668	ANXA5_RAT	Annexin A5	UP	288	35779	4,93	20	54	-
Q68FP1	GELS_RAT	Gelsolin	UP	227	86413	5,76	24	31	-
O35814	STIP1_RAT	Stress induced phosphoprotein 1	DOWN	160	63158	6,4	14	22	-
B3GNI6	SEP11_RAT	Septin-11	DOWN	102	50005	6,24	8	21	-
P38983	RSSA_RAT	40S ribosomal protein SA, Laminin receptor 1, LRP/LR; Laminin-binding protein precursor p40	DOWN	51	32917	4,8	4	17	-
P85515	ACTZ_RAT	Alpha-centractin	DOWN	158	42701	6,19	11	40	-
Q99MZ8	LASP1_RAT	Lim & SH3 domain protein 1	landmark	126	30351	6,61	9	28	-

<b>Transportproteine</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
Q9Z2L0	VDAC1_RAT	Voltage dependent anion selective channel protein 1	absent	61	30851	8,62	4	19	-
P02793	FRIL1_RAT	Ferritin light chain 1	absent	140	20793	5,99	11	58	-



### Chaperone

Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
Q5XHZ0	TRAP1_RAT	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial	absent	118	80639	6,56	12	18	-
P28480	TCPA_RAT	T-complex protein 1 subunit alpha	absent	115	60835	5,86	9	17	-
P52555	ERP29_RAT	Endoplasmatic reticulum protein ERp29	absent	127	28614	6,23	8	31	-
Q66HD0	ENPL_RAT	Endoplasmic, Heat shock protein 90 kDa beta member 1	UP	190	92998	4,72	25	31	-
P06761	GRP78_RAT	78 kDa glucose-regulated protein, Heat shock 70 kDa protein 5	UP	307	72473	5,07	38	56	-
P18418	CALR_RAT	Calreticulin	landmark	192	48137	4,33	18	46	-
P63018	HSP7C_RAT	Heat shock cognate 71kDa protein	landmark	157	71055	5,37	22	39	+
P63039	CH60_RAT	60kDa heat shock protein, mitochondrial	landmark	200	61088	5,91	20	42	-
P48721	GRP75_RAT	Stress 70 protein	landmark	161	74097	5,97	25	41	+
Q68FQ0	TCPE_RAT	T-complex protein 1 subunit epsilon	landmark	119	59955	5,51	18	28	-

### Apoptose

Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
Q9QZA2	PDC6I-RAT	Programmed cell death 6-interacting protein	landmark	299	97141	6,15	28	32	-

### Signaltransduktion

Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
P62260	1433E_RAT	14-3-3 Protein epsilon	landmark	127	29326	4,63	13	48	+

### Transkription

Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
Q8VHV7	HNRH1_RAT	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	UP	72	49442	5,7	11	28	-
P60123	RUVB1_RAT	RuvB like 1, 49 kDa TATA box-binding protein-interacting protein	DOWN	88	50524	6,02	6	19	-
Q9JMJ4	PRP19_RAT	Pre-mRNA-processing factor 19	DOWN	129	55661	6,14	13	28	-

### Translation

Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
Q4KM49	SYYC_RAT	Tyrosyl-tRNA synthetase	DOWN	175	59420	6,57	16	29	-
P38983	RSSA_RAT	40S ribosomal protein SA, Laminin receptor 1, LRP/LR; Laminin-binding protein precursor p40	DOWN	51	32917	4,8	4	17	-
P05197	EF2_RAT	Elongation factor 2	landmark	135	96192	6,41	18	22	-
Q6P9U8	EIF3H_RAT	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	landmark	132	40051	6,2	10	36	-

<b>Enzyme</b>									
<b>1. Energiestoffwechsel</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
P10719	ATPB_RAT	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	absent	146	56318	5,19	24	56	+
P50516	VATA_MOUSE	Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	UP	196	68625	5,42	23	36	-
P62815	VATB2_RAT	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform	UP	118	56857	5,57	13	28	-
P13803	ETFA_RAT	Electrone transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	landmark	49	35272	8,62	4	13	-
<b>2. Kohlenhydratstoffwechsel</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
P11980	KPYM_RAT	Pyruvat kinase isoenzyme M1/M2	absent	175	58294	6,63	15	25	-
O88989	MDHC_RAT	Malat dehydrogenase, cytoplasmic	DOWN	69	36631	6,16	5	14	-
P07943	ALDR_RAT	Aldose reductase	DOWN	103	36230	6,26	10	26	-
P04797	G3P_RAT	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	landmark	111	36090	8,14	9	31	-
P04764	ENOA_RAT	Alpha enolase	landmark	233	47440	6,16	24	58	-
<b>3. Aminosäurestoffwechsel</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
P0C2X9	AL4A1_RAT	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial	absent	166	62286	7,14	13	25	-
Q01205	ODO2_RAT	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	absent	84	49236	8,89	9	21	-
Q9JLJ3	AL9A1_RAT	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase	UP	69	54530	6,57	9	21	-
P10860	DHE3_RAT	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial	landmark	192	61719	8,05	27	36	-
<b>4. Fettstoffwechsel</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
P35571	GPDM_RAT	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, mitochondrial	absent	123	81549	6,18	12	19	-
P15650	ACADL_RAT	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	UP	90	48242	7,63	10	18	-
<b>5. Antioxidativer Stoffwechsel</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
P07632	SODC_RAT	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	absent	134	16073	5,88	8	48	-
Q63081	PDIA6_RAT	Protein disulfid isomerase A6	absent	109	48542	5	8	23	-
Q8R4A1	ERO1A_RAT	ERO1-like protein alpha	absent	92	54839	5,83	7	19	-
P35704	PRDX2_RAT	Peroxiredoxin 2	landmark	91	21941	5,34	7	31	-
P11598	PDIA3_RAT	Protein disulfid isomerase 3	landmark	320	57044	5,88	33	56	-
P54001	P4HA1_RAT	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	landmark	237	61202	5,63	20	36	-
<b>6. Proteasom, Ubiquitinsystem</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
Q9JHW0	PSB7_RAT	Proteasome subunit beta type-7	absent	61	30250	8,13	5	12	-
Q6AXR4	HEXB_RAT	Beta-hexosaminidase subunit beta	UP	92	61888	8,02	11	23	+

<b>Unbekannte Funktion</b>									
Acc. No.	Entry Name	Protein Title	Expression	Score	MW	pI	Qm	Sc	mixed
Q4FZT0	STML2_RAT	Stomatin like protein 2	UP	85	38504	8,74	6	21	-

Der Anteil dieser geschaffenen Protein-Gruppen an den Änderungen der Proteinexpression (absent, UP, DOWN) zwischen undifferenzierten CSM14.1-Zellen (Tag 0) und differenzierten CSM14.1-Zellen (Tag 28) ist in den Abbildungen 15, 16 und 17 dargestellt.

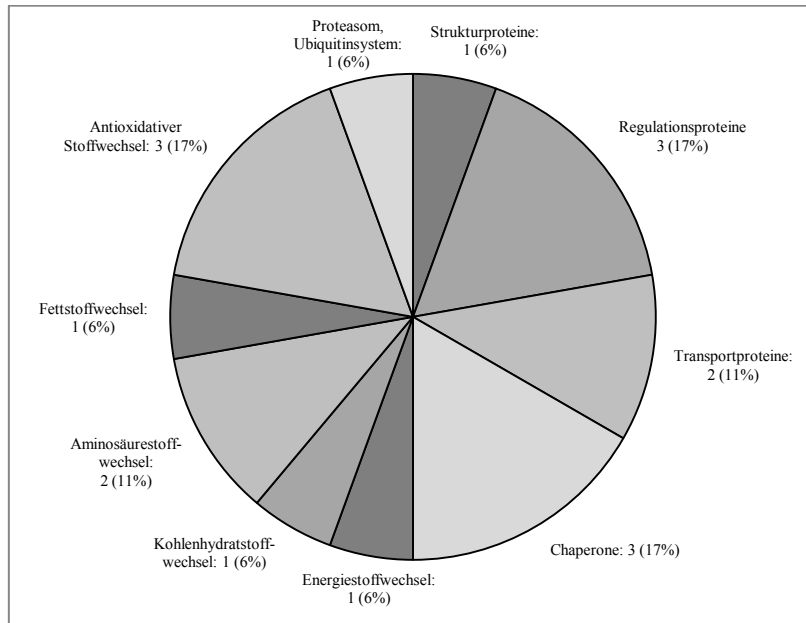


Abbildung 15: **Quantitative Verteilung der nur bei differenzierten CSM14.1-Zellen exprimierten Proteine (absent).** Bezeichnung der Protein-Gruppe, absolute Anzahl, prozentualer Anteil an allen absent-Proteinen.

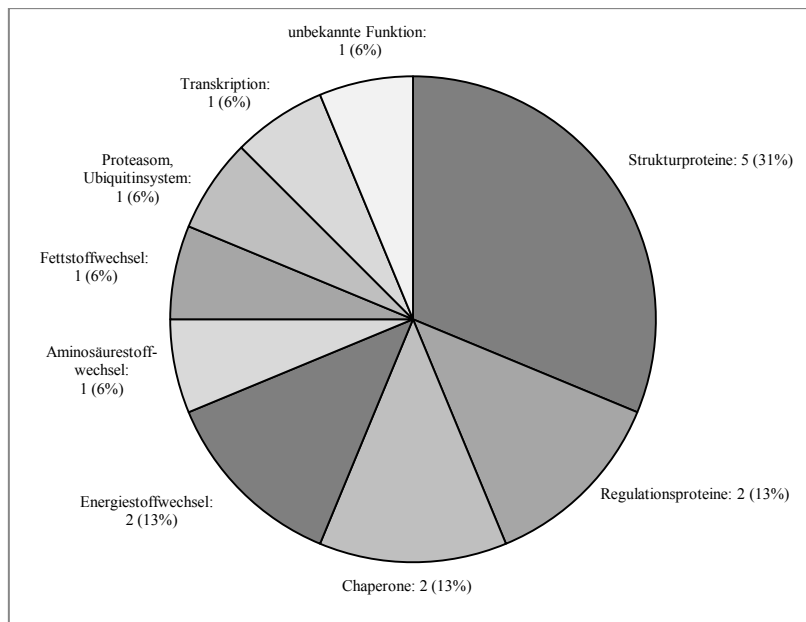


Abbildung 16: **Quantitative Verteilung der bei differenzierten CSM14.1-Zellen höher exprimierten Proteine (UP).** Bezeichnung der Protein-Gruppe, absolute Anzahl, prozentualer Anteil an allen UP-Proteinen.

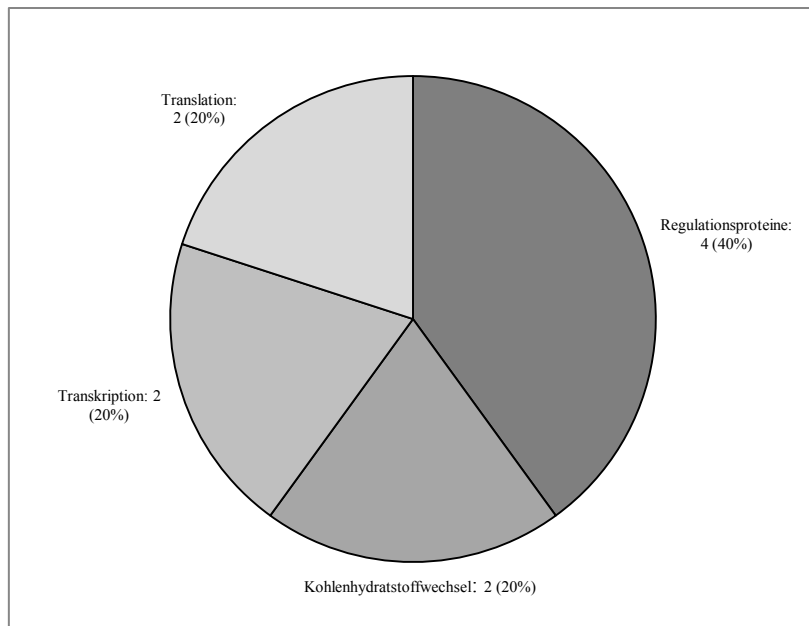


Abbildung 17: **Quantitative Verteilung der bei differenzierten CSM14.1-Zellen geringer exprimierten Proteine (DOWN)**. Bezeichnung der Protein-Gruppe, absolute Anzahl, prozentualer Anteil an allen DOWN-Proteinen

## 4 Diskussion

### 4.1 Immuncytochemie und stereologische Auswertung

Nachfolgend werden die mit der Immuncytochemie gewonnenen Ergebnisse diskutiert. Ein besonderer Schwerpunkt wird hierbei auf den Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sowie den bisherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe mit der Zelllinie CSM14.1 gelegt.

#### *Nestin*

Das Protein Nestin gehört zur Gruppe VI der Intermediärfilamente (Steinert und Liem, 1990). Es wird von proliferierenden Zellen des ZNS und PNS während der frühen Entwicklung exprimiert. Deshalb wurde Nestin vielfach genutzt, um Stammzellen im ZNS von Nagetieren und in immortalisierten Vorläufer-Zelllinien des ZNS zu charakterisieren (Frederiksen et al., 1988; Cattaneo und McKay, 1990; Redies et al., 1991). Da Nestin nicht nur von Stammzellen und Progenitorzellen des ZNS, sondern im Laufe der Entwicklung auch von anderen Zelltypen (z.B. Muskelzellen) exprimiert wird, sollte es nur in Kombination mit anderen Zellmarkern zur Charakterisierung von Progenitorzellen eingesetzt werden. 2002 wurde von unserer Arbeitsgruppe (Haas und Wree, 2002) durch Immuncytochemie gezeigt, dass undifferenzierte CSM14.1-Zellen eine starke Immunreaktivität für Nestin aufweisen und dass nach 7 bzw. 14 Tagen Differenzierung diese Reaktion nur noch gering ausgeprägt ist. In dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Zusätzlich konnte durch die Auswertung der Immunreaktivität mittels Zellzählung auch eine quantitative Aussage über den Anteil der Nestin-positiven Zellen getroffen werden. Auffällig ist, dass im undifferenzierten Zustand nur ungefähr 39% der Zellen immunreaktiv für Nestin sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Zellen dieser Zelllinie trotz ihres klonalen Ursprungs (Durand et al., 1990) nicht alle über die gleichen Eigenschaften verfügen bzw. nicht eindeutig in ihrer Differenzierungsrichtung festgelegt sind. Es ist aber auch denkbar, dass sich die Zellen nicht alle gleichzeitig in derselben Phase des Zellzyklus befinden und so die unterschiedliche Immunreaktivität in einer homogenen Zellpopulation erklärt werden kann. Wie erwartet kam es nach 14 Tagen Differenzierung zu einer signifikanten Abnahme des Anteils Nestin-positiver Zellen. Auch nach 28 Tagen Differenzierung blieb dieser Anteil etwa konstant. Laut Svendsen et al. (2001) ist Nestin in ausdifferenzierten, postmitotischen Zellen nicht mehr nachweisbar. Die hier gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Differenzierung der CSM14.1-Zellen zum Zeitpunkt Tag 28 noch nicht abgeschlossen ist.

***Glial fibrillary acidic protein (GFAP)***

Antikörper gegen das Intermediärfilament GFAP werden vielfältig genutzt, um Astrozyten in Hirnschnitten oder in Zellkulturen zu charakterisieren. Von GFAP ist bekannt, dass es nie gemeinsam mit Neurofilamenten in einer Zelle vorkommt (Eng, 1980) und sich deshalb zur Unterscheidung zwischen Astrozyten und Neuronen in Geweben und in der Zellkultur eignet.

Haas und Wree konnten 2002 weder im Western Blot noch mittels Immunocytochemie eine Immunreaktivität undifferenzierter oder differenzierter CSM14.1-Zellen für GFAP nachweisen. Im Jahr 2005 gelang jedoch der Nachweis von GFAP mittels Western-Blot in undifferenzierten Zellen sowie während der Differenzierung (Vernon und Griffin, 2005). Es wurde außerdem gezeigt, dass nach drei Wochen Differenzierung das Maximum der Immunreaktivität vorlag. In der Immunocytochemie waren undifferenzierte und differenzierte Zellen ebenfalls für GFAP immunreaktiv. Die Autoren verwendeten jedoch in ihrer Arbeit einen polyklonalen Antikörper gegen GFAP während in unserer Arbeitsgruppe (so auch in dieser Arbeit) ein monoklonaler Antikörper benutzt wurde. In einem Experiment, bei dem CSM14.1-Zellen in die Substantia nigra von Hemiparkinsonratten transplantiert wurden, konnten mit diesem monoklonalen Antikörper in der Nähe des Injektionskanals GFAP-positive CMS14.1-Zellen nachgewiesen werden (Haas et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit gelang es GFAP mittels Immunocytochemie in CSM14.1-Zellen am Tag 14 und Tag 28 der Differenzierung nachzuweisen und die Immunreaktivität stereologische auszuwerten. Der Anteil GFAP-positiver Zellen betrug nach 14 Tagen Differenzierung fast 19%. Dieser Wert änderte sich auch nach weiteren zwei Wochen Differenzierung nicht signifikant. Allerdings kam es zu einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität (bei gleicher Belichtungszeit) zwischen Tag 14 und Tag 28. Die Ursache könnte in einem gestiegenen GFAP-Gehalt der einzelnen Zellen liegen. Bei GFAP besteht jedoch keine zwingende Korrelation zwischen der Fluoreszenzintensität und der absoluten GFAP-Menge einer Zelle (Aquino et al., 1988). Undifferenzierte CSM14.1-Zellen zeigten erneut keine Immunreaktivität für GFAP. Ein Grund für den Unterschied zu den Ergebnissen von Vernon und Griffin könnte sein, dass diese einen polyklonalen und damit weniger spezifischen Antikörper verwendet haben. Eine weitere Ursache könnte ein (zufällig) unterschiedlicher Gehalt an Ciliary neurotrophic factor (CNTF) in den jeweils verwendeten Chargen des FCS sein. CNTF wird *in vitro* genutzt um eine gliale Differenzierung von Stammzellen zu induzieren (Sun et al., 2001; Barberi et al., 2003). Undifferenzierte CSM14.1-Zellen zeigen keine CNTF-Expression (Haas et al., 2008). Zukünftig sollte eine gezielte Untersuchung differenzierter Zellen auf CNTF-Expression erfolgen.

### ***Neuronal Nuclei (NeuN)***

NeuN gilt als ein Standardmarker für die Identifizierung postmitotischer Nervenzellen (Gage et al., 1995). Zumindest die ersten Differenzierungsschritte müssen Zellen durchlaufen haben, um eine Immunreaktivität für NeuN aufzuweisen (Sarnat et al., 1998). Bekannt ist, dass differenzierte Zellen der Zelllinie CSM14.1 in vitro das neuronenspezifische, lösliche Kernprotein NeuN in deutlich höherem Maße exprimieren als undifferenzierte Zellen dieser Zelllinie (Vernon und Griffin, 2005). In vivo konnten NeuN-positive CSM14.1-Zellen nach Transplantation in das Striatum neonataler Ratten nachgewiesen werden (Haas et al., 2007-b). Unter der Annahme, dass CSM14.1-Zellen bei permissiven Kulturbedingungen (33° C, 10% FCS) nicht differenziert sind, sollten diese Zellen keine Immunreaktivität für NeuN aufweisen. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Außerdem waren nach 14 Tagen Differenzierung ungefähr 27,5% aller Zellen NeuN-positiv. Nach weiteren 28 Tagen Differenzierung kam es zu einem signifikanten Anstieg der Immunreaktivität für NeuN auf ca. 64%. Diese Ergebnisse deuten auf eine zunehmende Differenzierung in neuronale Richtung im Zeitverlauf hin.

### ***Tyrosinhydroxylase (TH)***

Die Tyrosinhydroxylase ist das Schrittmacherenzym der Katecholaminbiosynthese (Nagatsu et al., 1964) und wird zur Identifizierung dopaminergener Neurone verwendet (Andreeva et al., 1996; Cheung et al., 1997). In differenzierten CSM14.1-Zellen konnte TH durch Western Blot nachgewiesen werden (Haas und Wree, 2002; Vernon und Griffin, 2005). Vernon und Griffin gelang dies auch mittels Immunocytochemie allerdings unter Verwendung eines polyklonalen Antikörpers. In beiden Arbeiten war ebenfalls eine schwache Immunreaktivität für TH von undifferenzierten Zellen in der Immunocytochemie bzw. im Western Blot nachweisbar. In vivo konnten TH-positive CSM14.1-Zellen nach intrastriatler Transplantation in neonatale Ratten nachgewiesen werden (Haas et al., 2007-b).

In dieser Arbeit zeigten undifferenzierte CSM14.1-Zellen keine Immunreaktivität für TH. Dieses Ergebnis ist kongruent zu den Ergebnissen von NeuN und GFAP, die beide ebenfalls erst in den differenzierten Zellen dieser Zelllinie nachweisbar sind. Auch für TH zeigt sich eine signifikante Zunahme des Anteils immunreaktiver Zellen im Zeitverlauf (ca. 12% an Tag 14 und ca. 56% an Tag 28). TH katalysiert die erste Reaktion bei der Bildung von Dopamin. Dopamin kann aber auch zu den Katecholaminen Noradrenalin und Adrenalin weiter verstoffwechselt werden (Udenfriend et al., 1953; Udenfriend und Wyngaarden, 1956; Levin et al., 1960). Katecholamin-produzierende Zellen sind also auch TH-positiv, sodass die Zelllinie CSM14.1 durch den Nachweis von TH allein nicht als dopaminerg zu

charakterisieren ist. Die Expression des Enzyms ALDH2 durch differenzierte CSM14.1-Zellen macht eine dopaminerge Differenzierung aber äußerst wahrscheinlich, da ALDH2 zum Nachweis eines differenzierten dopaminergen Phänotyps herangezogen wird (McCaffery und Dräger, 1994; Haque et al., 1997; Wagner et al., 1999; Wallen et al., 1999). Trotzdem sollte zukünftig der Nachweis des Dopamintransporters und des VMAT2 erfolgen.

### *Zusammenfassung und Ausblick*

Die durchgeführten immunocytochemischen Experimente zeigen, dass die neuronale Progenitorzelllinie CSM14.1 ein in vitro Differenzierungspotential sowohl in neuronaler (dopaminerge) als auch in glialer Richtung besitzt. Dieses Ergebnis deckt sich mit in vivo Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe. Nach Transplantation in das intakte und das durch Injektion von 6-OHDA-läsionierte Striatum adulter Ratten fanden sich bei allen Tieren sowohl eine große Anzahl GFAP-positiver CSM14.1-Zellen als auch eine geringe Zahl Zellen, die positiv für den postmitotischen Nervenzellmarker Neurofilament 200 waren (Haas, 2009). Der Nachweis von NeuN oder TH gelang in diesem Versuchsansatz nicht. Nach orthotoper Transplantation in die intakte und läionierte Substantia nigra von adulten Ratten konnten aber auch NeuN-positive CSM14.1-Zellen außerhalb des Injektionskanals nachgewiesen werden (Haas et al., 2008). Nach intrastriataler Transplantation in neonatale Ratten fanden sich NeuN- und TH-positive CSM14.1-Zellen. Im läionierten, neonatalen Striatum wurde nach Transplantation der CSM14.1-Zellen wieder ein TH-Gehalt erreicht, der dem der Kontrolltiere entsprach (Haas et al., 2007-b). Alle diese Ergebnisse (intrastriatale vs. intranigrale Transplantation bei adulten Ratten sowie intrastriatale Transplantation bei adulten vs. neonatalen Ratten) lassen den Schluss zu, dass die Differenzierungsrichtung der Zelllinie CSM14.1 stark von der jeweiligen Zellumgebung – dem Mikroenvironment – beeinflusst wird.

Weiterführende immunocytochemische Versuche sollten durch Fluoreszenz-Doppelmarkierungen z.B. gegen TH und NeuN (mit Primärantikörpern aus zwei verschiedenen Spezies) und stereologischer Auswertung mit einem konfokalen Mikroskop klären, ob die Gruppe der NeuN-positiven Zellen gleichzeitig für TH positiv ist oder ob es sich um unterschiedliche Zellpopulationen handelt. Außerdem wäre ein vergleichbares Experiment mit NeuN und GFAP als Doppelmarkierung denkbar. Unter der Annahme, dass beide Proteine nur in jeweils fortgeschritten differenzierten Zellen vorkommen, wäre eine Kolokalisation von GFAP und NeuN in differenzierten CSM14.1-Zellen nicht zu erwarten. In einer aktuellen Veröffentlichung wird allerdings das Vorhandensein von GFAP-positiven neuronalen Progenitorzellen im Hippocampus der Maus beschrieben (Liu Y et al., 2010).



Zumindest bei diesen Progenitorzellen schließt sich eine Immunreaktivität für neuronale Marker und GFAP also nicht aus. Es wäre sicherlich interessant zu untersuchen, ob sich diese Beobachtung auch für die Zelllinie CSM14.1 und den neuronalen Marker NeuN zeigen ließe.

Zukünftig sollte ebenfalls z.B. durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) überprüft werden, ob differenzierte CSM14.1-Zellen den Transmitter Dopamin ausschütten. Dies wäre die Voraussetzung für einen kausalen - d.h. im Sinne der Dopamin-Mangel-Theorie therapeutischen - Effekt bei Hemiparkinson-Ratten. In einem in vitro Experiment fehlen allerdings die für die Transmitterfreisetzung (eventuell) nötige Zellumgebung oder Zellstimulation. Die Dopaminausschüttung kann experimentell durch Zugabe von 50 mM KCl in das Zellmedium herbeigeführt werden (Chung et al., 2002).

Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Zellersatztherapie ist außerdem die Integration der transplantierten Zellen in die bestehenden neuronalen Netzwerke des Empfängers. In einem hier nicht präsentierten Experiment gelang der Nachweis des Proteins Synaptophysin in differenzierten CSM14.1-Zellen (Tag 14 und Tag 28) durch Immuncytochemie. Synaptophysin ist ein präsynaptisches Protein, dass zur Charakterisierung dieser Nervenendigungen während der Differenzierung von neuronalen Stammzellen verwendet wurde (Liebau et al., 2007). CSM14.1-Zellen scheinen also (Prä-)Synapsen während der Differenzierung auszubilden.

Die mittels Immuncytochemie in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstreichen die Eignung der Zelllinie CSM14.1 als Modell für die Untersuchung der neuronalen (und dopaminergen) Differenzierung der Ratte.

## 4.2 Proteomics

Zur weiteren in vitro Charakterisierung der Zelllinie CSM14.1 wurde in dieser Arbeit neben der Immuncytochemie auch die Methode Proteomics für eine differentielle Analyse von undifferenzierten und differenzierten Zellen benutzt.

In den Gelen vom Zeitpunkt Tag 0 im Mittel 70,20% ( $\pm 5,30$ ) der Spots auf das Referenzgel 33-ref gematcht werden, in den Gelen vom Zeitpunkt Tag 28 jedoch im Mittel nur 49,20% ( $\pm 3,37$ ). An diesen Werten wird schon an diesem frühen Punkt der Analyse erkennbar, dass deutliche Unterschiede im Spotmuster zwischen den Gelen der beiden Zeitpunkte vorliegen müssen. Auch wenn dies bei visuellem Vergleich eines exemplarisch ausgewählten Gels vom Zeitpunkt Tag 28 mit dem Referenzgel wenig offensichtlich ist (Abbildung 13 und 14). An der im Mittel nur erreichbaren Übereinstimmung der Spots der Gruppe Tag 0 mit dem

Referenzgel zeigt sich außerdem, dass auch die Gele innerhalb einer Gruppe heterogen sind. Es wird somit deutlich, dass ein direkter Vergleich zwischen einzelnen Gelen – auch wenn das gleiche Material verwendet wurde und die Gele parallel und somit unter identischen Bedingungen gefahren wurden – nicht sinnvoll ist. Um solche Varietäten zu berücksichtigen, werden deshalb wie in dieser Arbeit immer mehrere Gele einer Gruppe zusammen als repräsentativ angesehen. In dem hier durchgeführten Experiment wurden wie beschrieben nur solche Spots zur Identifizierung ausgewählt, die in mindestens 5 der 6 Gele vom Zeitpunkt Tag 28 absent-, UP- oder DOWN verändert waren. Dieses strenge Auswahlkriterium führt einerseits zu einer Reduzierung der in die Analyse eingeschlossenen Proteine, da z.B. auch die Proteine nicht berücksichtigt wurden, die nur in 4 der 6 Gele verändert waren. Auf der anderen Seite bedingt dieses restriktive Kriterium aber auch eine hohe Reliabilität der erhaltenen Ergebnisse. Trotzdem sollte zur Verifizierung der Nachweis der entsprechenden Proteine mittels Western-Blot oder Immuncytochemie angestrebt werden.

Nachfolgend werden einige besonders interessante Proteine diskutiert, die einen engen Bezug zur neuronalen Differenzierung, zum Stoffwechsel von Nervenzellen insbesondere bei der Reaktion auf Zellstress und zu den zuvor mittels Immuncytochemie gewonnenen Ergebnissen aufweisen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression des Proteins Annexin A5 durch die Zelllinie CSM14.1 zwischen Tag 0 (undifferenzierte Zellen) und Tag 28 (differenzierte Zellen) hochreguliert wird. Das gleiche Ergebnis konnte auch für die neuronale Progenitorzelllinie ST14A aus der Ratte gezeigt werden (Hoffrogge et al., 2007). Annexin A5 ist ein 35 kD großes Protein und wurde als ein antikoagulatorisch-wirkendes Protein in Blutgefäßen entdeckt (Reutelingsperger et al., 1985). Es wird auch als Annexin-5 bzw. Annexin V oder Lipocortin V bezeichnet (UniProtKP/Swiss-Prot). Die Annexine bilden eine Superfamilie von Kalziumionen- und Phospholipid-bindenden Proteinen. Ihre Bindungsdomänen sind hochkonserviert (Flower und Rothwell, 1994; Perretti, 1994; Raynald und Pollard, 1994). Annexin I, III und V inhibieren die Aktivität der Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Die PLA<sub>2</sub> umfasst eine Enzymfamilie, die als Schlüsselenzym für Entzündungsprozesse und Zytotoxizität auch im ZNS fungieren (Bonventre, 1997; Farooqui et al., 1997). Die aktivierte PLA<sub>2</sub> spaltet Membranphospholipide und führt so zum Zelluntergang (Klein, 2000). Gleichzeitig werden Vorläufermoleküle von Eicosanoiden und Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) frei, welche die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies fördern. Es existieren über 27 Isoformen der PLA<sub>2</sub> in Säugetieren, die sich in vier Hauptgruppen unterteilen lassen: zytosolische PLA<sub>2</sub>, sekretorische PLA<sub>2</sub>,

Kalziumionen-unabhängige PLA<sub>2</sub> und PAF-Acetylhydrolasen (Titsworth et al., 2008). Vor allem die lösliche PLA<sub>2</sub> scheint – wie Untersuchungen an Tiermodellen zeigen – eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Moses et al., 2006), Multipler Sklerose (Marusic et al., 2005; Pinto et al., 2003) und dem IPS (Hayakawa et al., 2001; Tariq et al., 2001) sowie bei der Reaktion auf Rückenmarksverletzungen (Liu N et al., 2004) zu haben.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Annexin V eine wichtige Rolle als Regulator bei der Apoptose von Zellen spielt (Reutelinsperger und van Heerde, 1997). Apoptotische Zellen zeigen an der äußeren Seite der Zellmembran Phosphatidylserin-Reste, die dann als Signal für die Phagozytose durch Makrophagen dienen (Fadok et al., 1992). Allerdings ist dieser Vorgang nicht ausschließlich auf apoptotische Zellen beschränkt, sondern tritt auch im Rahmen nicht-apoptotischer Zelltod-Programme (Leist und Jaattela, 2001) sowie bei der Alterung von Erythrozyten und der Aktivierung von Thrombozyten auf (Zwaal und Schroit, 1997). Gesunde Zellen verhindern durch energieabhängige Prozesse die Exposition von Phosphatidylserin-Resten an ihrer Zelloberfläche. Annexin V bindet in der Anwesenheit von Kalziumionen mit hoher Affinität an die stark negativ geladenen Phosphatidylserin-Reste (Reutelinsperger und van Heerde, 1997). Annexin A5 wird deshalb vielfältig genutzt als Marker für die Untersuchung von Apoptose in vitro, im Tiermodell und sogar in vivo bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen oder Krebserkrankungen. Aktuell wird intensiv an der therapeutischen Verwendung von Annexin A5 zum selektiven Transport von Medikamenten an Phosphatidylserin-exponierende Zellen gearbeitet (Schutters und Reutelingsperger, 2010).

Die Annexine I und V zeigten darüber hinaus neurotrophe Effekte auf kultivierte Neurone (Takei et al., 1994; Mizuno et al., 1998). Im Jahr 2004 untersuchten Han et al. die Effekte der Annexine II und V auf das Überleben von Neuronen und Astrozyten in vitro. Sie konnten zeigen, dass diese beiden Proteine essentiell sind für das Überleben und das Wachstum der Neuronen sich entwickelnder kortikaler Neurone, für das Überleben von Gliazellen und als Schutz von Neuronen und Gliazellen gegen Peroxide und hypoxische Schädigung. Ob diese Beobachtung mit der Inhibition der PLA<sub>2</sub> durch Annexin A5 zusammenhängt muss noch geklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit nimmt die absolute Zellzahl der CSM14.1-Zellen pro PS während der Differenzierung um mehr als die Hälfte ab. Die gezeigte Zunahme von Annexin A5 während der Differenzierung der Zelllinie CSM14.1 deutet darauf hin, dass dieser

Zelluntergang durch Apoptose geschieht. Interessant ist diese Zunahme auch unter Berücksichtigung des Effekts von Annexin A5 auf die Entwicklung und das Überleben von Neuronen und Gliazellen. Die Anhebung der Temperatur und die Reduktion des FCS-Gehalts im Medium für die Differenzierung erzeugen Stress für die Zellen, der vermutlich zum beschriebenen Absterben vieler Zellen führt (vgl. auch Haas, 2008). Die Zelllinie CSM14.1 scheint in der Lage zu sein, auf diese Einwirkungen von außen durch die erhöhte Expression von Annexin A5 zu reagieren, so dass für einige Zellen die Differenzierung und das Überleben ermöglicht wird.

Ein weiteres Protein mit erhöhter Expression in differenzierten CSM14.1-Zellen ist zytoplasmatisches Actin, ein globuläres Protein (G-Actin), das in Gegenwart von Magnesium- und Kalziumionen aus Monomeren ein Mikrotubuli-unabhängiges Zytoskelett ausbildet und Grundbestandteil des kontraktiven Apparats der Muskelzellen ist. Auch in Nicht-Muskelzellen kommt es in hohen Konzentrationen vor (Hatano und Oosawa, 1966). Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen monomerem und polymerem (filamentösem) Actin (F-Actin). Die Polymerisierung erfolgt am Plus-Ende eines Actinfilaments durch Anlagerung mit ATP komplexiertem G-Actins. Die Spaltung erfolgt vom Minus-Ende ausgehend (nach Löffler und Petrides, 2003). Die Struktur des Actinfilaments wurde 1990 von Holmes et al. beschrieben. Verschiedene Proteine regulieren durch Stabilisierung des F-Actins oder Förderung der Spaltung in G-Actin das dynamische Gleichgewicht. Eines dieser Proteine ist das 86 kD große Gelsolin, das ebenfalls eine erhöhte Expression in differenzierte CSM14.1-Zellen ausweist. Es wurde erstmals aus Makrophagen in der Kaninchenlunge isoliert (Yin und Stossel, 1979) und spielt eine wichtige Rolle bei der Actin-abhängigen Zellmotilität. Abhängig von Kalziumionen trennt Gelsolin Actin-Filamente ab und verhindert durch Abdeckung der Plus-Enden der Actinfilamente die weitere Filamentanlagerung (Yin und Stossel, 1979; Yin et al., 1981; Lamb et al., 1993; Robinson et al., 1999; Burtnick et al., 2004). Auf der anderen Seite kann es aber auch die Bildung von Filamenten fördern, wenn es durch Bindung zweier Monomere als Keimzelle fungiert und dann abgespalten wird, sodass ein freies Plus-Ende vorliegt (Tellam et al., 1982). Die Bindung von Phosphatidylinositol-4-phosphat oder Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat an Gelsolin löst dessen Bindung an das Plus-Ende eines Actin-Filaments, so dass eine schnelle Anlagerung weiterer Monomere an dieses Filament möglich ist (Janmey et al., 1987; Janmey und Stossel, 1987, 1989). Gelsolin spielt durch seine Regulatorfunktion bei der Actinpolymerisation auch eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Neuriten. PC12-Zellen, die Gelsolin überexprimieren, entwickeln längere Neuriten mit einer größeren Motilitätsrate als PC12-Wildtypzellen (Furnish et al., 2001).

Gelsolin scheint die Stabilität der Actinfilamente zu gewährleisten (Star et al., 2002). Dong et al. zeigten im Jahr 2006, dass es nach entorhinaler Deafferentierung des Hippocampus dort zu einer signifikanten Zunahme der Gelsolinexpression in aktivierten Mikrogliazellen und Astrozyten kommt. Ebenfalls eine erhöhte Expression in differenzierten CSM14.1-Zellen weist das 48 kD große Protein Actin related protein 3 (Arp3) auf. Ein Komplex aus Arp3 und Actin related protein 2 (Arp2/3) führt durch Erzeugung einer „Keimzelle“ zur Bildung von F-Actins aus G-Actinen und ermöglicht die Ausbildung verzweigter Filamente (Mullins et al., 1998).

Physiologisch eng mit Actin verknüpft ist das 68 kD große Protein Moesin (*membrane-organizing extension spike protein*), das ausschließlich in differenzierten CSM14.1-Zellen nachweisbar ist. Moesin gehört zusammen mit Ezrin und Radixin zur Familie der ERM (*ezrin-radixin-moesin*)-Proteine, die wie Sequenzvergleiche zeigen, evolutionär hochkonserviert ist (Lankes et al., 1988; Lankes und Furthmayr, 1991). Die ERM-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellform, beim Wachstum und der Motilität von Zellen (Mangeat et al., 1999; Bretscher et al., 2002). Die C-terminale Domäne dieser Proteine bindet an Actin (Algrain et al., 1993; Turunen et al., 1994; Henry et al., 1995; Martin et al., 1995; Pestonjamas et al., 1995) und die N-terminale Domäne, FERM genannt (band 4.1, ezrin, radixin, moesin homology domain; Chishti et al., 1998) bindet an die zytoplasmatische Domäne zahlreicher integraler Membranproteine. Durch die intramolekulare Verbindung von N- und C-Terminus entsteht eine inaktive Konformation, die die Bindung an andere Proteine wie F-Actin verhindert (Turunen et al., 1994). Am C-Terminus befindet sich ein konservierter Threonin-Rest, dessen Phosphorylierung zu einer Konformationsänderung führt und so die Assoziation mit anderen Proteinen ermöglicht (Hirao et al., 1996). Diese Phosphorylierung erfolgt z.B. durch die Rho-Kinase (Matsui et al., 1998). Das Verhältnis zwischen phosphorylierten ERM-Proteinen (pERM) und nicht-phosphorylierten ist bedeutsam bei der Ausbildung von Neuriten durch Neurone. Dabei kommt neben der Rho-Kinase auch der LRRK2 (Leucin-rich repeat protein kinase 2) eine große Bedeutung zu. Mutationen dieses Enzyms bilden die Ursache für eine autosomal-dominante Form des M. Parkinson (Zimprich et al., 2004; Paisan-Ruiz et al., 2004). 2006 konnte gezeigt werden, dass diese Kinase eng mit der Erhaltung und dem Auswachsen von Neuriten und somit auch mit der Entwicklung von Neuronen verknüpft ist (MacLeod et al., 2006). Als einer der zugrunde liegenden Mechanismen wurde die Phosphorylierung der ERM-Proteine durch die LRRK2 ermittelt. Eine Überexpression dieser Kinase führt über eine verstärkte Phosphorylierung der ERM-Proteine zu einem erhöhten Anteil von F-Actin in den

Filopodien und so zu einem verminderten Neuritenwachstum. Eine Deletion der LRRK2 führte hingegen über einen erniedrigten Gehalt an pERM und folglich geringeren F-Actin-Gehalt der Filopodien zu einer verstärkten Neuritogenese (Parisiadou et al., 2009). Die erfolgreiche Bildung eines Axons und somit die Polarisierung eines Neurons benötigt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen F-Actin und Mikrotubuli (Bridgman und Dailey, 1989; Baas et al., 1989). Es wird angenommen, dass sich aus einem Neurit ein Axon ausbildet, wenn die Stabilität des F-Actins abnimmt und die Stabilität der Mikrotubuli zunimmt (Bradke und Dotti, 1999; 2000). Eine Inhibition der Rho-Kinase *in vitro* führt außerdem zu einer signifikanten Abnahme der Motilität von Neuronen, so dass von einer wichtigen Rolle der ERM-Proteine auch für die Migration von Neuronen ausgegangen wird (Haas et al., 2007-a).

### ***Fazit***

Die Änderungen im Expressionsverhalten der zuvor diskutierten Proteine sind konform mit den bisherigen Erkenntnissen über die Zelllinie CSM14.1. Es ist weiterhin anzunehmen, dass die erhöhte Expression von Actin, Arp3 und Gelsolin sowie die Neuexpression von Moesin bei differenzierten CSM14.1-Zellen in Zusammenhang stehen und für ein neuronentypisches Entwicklungsverhalten dieser Zellen sprechen. Es konnte auf der Ebene der Proteine eine mögliche Ursache für die Veränderung der Morphe der Zellen (siehe 1.4) während der Differenzierung gefunden werden.

Der direkte Nachweis der Proteine Nestin (Dimer: 198-260 kD), GFAP (50 kD), NeuN (46-48 kD) und TH (60-68 kD) gelang mit dem gewählten differentiellen Versuchsansatz nicht. Somit ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse beider in dieser Arbeit verwendeter Methoden nicht möglich. Weitere Untersuchungen im Sinne eines Proteinmappings von undifferenzierten und differenzierten CSM14.1-Zellen für zukünftige Arbeiten erscheinen sinnvoll, da in diesem Fall alle Spots eines Gels analysiert werden und nicht wie hier eine Auswahl anhand von Kriterien getroffen wird. Zukünftig sollte ebenfalls eine fraktionierte Analyse der einzelnen Zellkompartimente mittels Proteomics erfolgen, wobei hierbei sicherlich der Membranfraktion mit den in die Zellmembran integrierten Proteinen in Hinblick auf die neuronale Differenzierung besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden sollte.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen die Eignung der Zelllinie CSM14.1 als Modell für die Untersuchung der neuronalen und dopaminergen Differenzierung der Ratte.

## 5 Thesen

Die Zelllinie CSM14.1 zeigt im Verlauf der Differenzierung eine signifikante Abnahme der für den Progenitorzellmarker Nestin positiven Zellen.

Ein Teil der differenzierten CSM14.1-Zellen exprimiert das Intermediärfilament GFAP.

Für das Protein NeuN als Marker postmitotischer Neurone sind nur differenzierte CSM14.1-Zellen immunreaktiv und es kommt im Verlauf der Differenzierung zu einer signifikanten Zunahme.

Die Tyrosinhydroxylase – das Schrittmacherenzym der Dopaminbiosynthese – ist in differenzierten CSM14.1-Zellen nachweisbar und der Anteil der dieses Enzym exprimierenden Zellen steigt während der Differenzierung signifikant.

Durch Proteomics lassen sich zahlreiche weitere nur bei differenzierten CSM14.1-Zellen vorhandene Proteine identifizieren.

Zu diesen Proteinen zählt Moesin aus der Familie der ERM-Proteine, die eine wichtige Rolle bei der Neuritenausbildung von Neuronen spielen.

Differenzierte CSM14.1-Zellen bilden vermehrt das Apoptose-assoziierte Protein Annexin A5, welches außerdem neurotrope Effekte auf kultivierte Neurone zeigen soll.

Proteine der Transkription und Translation sowie Regulationsproteine zeigen bei differenzierten CSM14.1-Zellen eine verminderte Expression.

Auf Proteinebene lassen sich Korrelate für die beobachtete Änderung der Zellmorphologie der CSM14.1-Zellen im Verlauf der Differenzierung finden.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse bestätigen die Eignung der Zelllinie CSM14.1 als Modell für die neuronale und dopaminerge Differenzierung der Ratte.

## 6 Literaturverzeichnis

Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Loik A, Kragh-Sorensen P (2003) Prevalence and characteristics of dementia in Parkinson's disease: an 8- year prospective study. *Arch Neurol*, 60: 387-392.

Algrain M, Turunen O, Vaheri A, Louvard D, Arpin M (1993) Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J Cell Biol*, 120: 129-140.

Andreeva N, Ungethüm U, Heldt J, Marschhausen G, Altmann Th, Andersson K, Gross J (1996) Elevated potassium enhances glutamate vulnerability of dopaminergic neurons developing in mesencephalic cell cultures. *Exp Neurol*, 137: 255-262.

Aquino DA, Chiu FC, Brosnan CF, Norton WT (1988) Glial fibrillary acidic protein increases in the spinal cord of Lewis rats with acute experimental autoimmune encephalitis. *J Neurochem*, 51: 1085-1096.

Baas PW, Black MM, Banker GA (1989) Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol*, 109: 3085-3094.

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.

Bai F, Liu S, Witzmann FA (2005) A "de-streaking" method for two-dimensional electrophoresis using the reducing agent tris(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride and alkylating agent vinylpyridine. *Proteomics*, 5: 2043-2047.

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.

Beal MF (2001) Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 2: 325-334.

Bhattacharyya S, Schapira AH, Mikhailidis DP, Davar J (2009) Drug-induced fibrotic valvular heart disease. *Lancet*, 374: 577-585.



- Biggins CA, Boyd JL, Harrop FM, Madeley P, Mindham RH, Randall JI, Spokes EG (1992) A controlled, longitudinal study of dementia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 55: 566-571.
- Bjellqvist B (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, 6: 317-339.
- Bjellqvist B, Pasquali C, Ravier F, Sanchez JC, Hochstrasser D (1993) A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis*, 12: 1357-1365.
- Björklund A, Lindvall O (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature Neurosci*, 3: 537-544.
- Bonventre JV (1997) Roles of phospholipases A2 in brain cell and tissue injury associated with ischemia and excitotoxicity. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 17: 71-79.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24: 197-211.
- Braak H, Rub U, Del Tredici K, Jansen Steur EN, de Vos RA (2005) Cognitive status with neuropathologic stage in Parkinson Disease. *Neurology*, 64: 1404-1410.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254.
- Bradke F, Dotti CG (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science*, 283: 1931-1934.
- Bradke F, Dotti CG (2000) Changes in membrane trafficking and actin dynamics during axon formation in cultured hippocampal neurons. *Microsc Res Tech*, 48: 3-11.
- Bray D, White JG (1988) Cortical flow in animal cells. *Science* 239: 883-888.
- Bretscher A, Edwards K, Fehon RG (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3: 586-599.
- Bridgman PC, Dailey ME (1989) The organization of myosin and actin in rapid frozen nerve growth cones. *J Cell Biol*, 108: 95-109.
- Brundin P, Pogarell O, Hagell P, Piccini P, Widner H, Schrag A, Kupsch A, Crabb L, Odin P, Gustavii B, Björklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Oertel WH, Quinn NP, Rehncrona S,

- Lindvall O (2000) Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarooids in Parkinson's disease. *Brain*, 123: 1380-1390.
- Buchta M, Höper DW, Sönnichsen A (2008) *Das Hammerexamen*. 2. Aufl., Elsevier, München - Amsterdam.
- Burtnick LD, Urosev D, Irobi E, Narayan K, Robinson RC (2004) Structure of the N-terminal half of gelsolin bound to actin: roles in severing, apoptosis and FAF. *EMBO J*, 23: 2713-2722.
- Cheung NS, Hickling YM, Beart PM (1997) Development and survival of rat embryonic mesencephalic dopaminergic neurones in serum free, antioxidant-rich primary cultures. *Neurosci Lett*, 233: 13-16.
- Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, Chasis JA, Conboy JG, Gascard P, Takakuwa Y, Huang SC, Benz EJ Jr, Bretscher A, Fehon RG, Gusella JF, Ramesh V, Solomon F, Marchesi VT, Tsukita S, Tsukita S, Arpin M, Louvard D, Tonks NK, Anderson JM, Fanning AS, Bryant PJ, Woods DF, Hoover KB (1998) The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci*, 23: 281-282.
- Chung S, Sonntag KC, Andersson T, Bjorklund LM, Park JJ, Kim DW, Kang UJ, Isacson O, Kim KS (2002) Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by *Nurr1* enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci*, 16: 1829-1838.
- Cochen V, Ribeiro MJ, Nguyen JP, Gurruchaga JM, Villafane G, Loc'h C, Defer G, Samson Y, Peschanski M, Hantraye P, Cesaro P, Remy P (2003) Transplantation in Parkinson's disease: PET changes correlate with the amount of grafted tissue. *Mov Disord*, 18: 928-932.
- Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U (1992) Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci*, 103: 589-597.
- de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5: 525-535.
- Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schäfer H, Bötzel K, Daniels C, Deuschländer A, Dillmann U, Eisner W, Gruber D, Hamel W, Herzog J, Hilker R, Klebe S, Kloss M, Koy J, Krause M, Kupsch A, Lorenz D, Lorenzl S, Mehdorn HM, Moringlane JR, Oertel W, Pinski MO, Reichmann H, Reuss A, Schneider GH, Schnitzler A, Steude U, Sturm V, Timmermann L, Tronnier V, Trottenberg T, Wojtecki L, Wolf E, Poewe W, Voges J;

- German Parkinson Study Group, Neurostimulation Section (2006) A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 355: 896-908.
- Dong JH, Ying GX, Liu X, Wang WY, Wang Y, Ni ZM, Zhou CF (2006) Lesion-induced gelsolin upregulation in the hippocampus following entorhinal deafferentation. *Hippocampus*, 16: 91-100.
- Dooneief G, Mirabello E, Bell K, Marder K, Stern Y, Mayeux R (1992) An estimate of the incidence of depression in idiopathic Parkinson's disease. *Arch Neurol*, 49: 305-307.
- Durand MM, Chugani DC, Mahmudi M, Phelps ME (1990) Characterization of neuron-like cell line immortalized from primary rat mesencephalon cultures. *Soc Neurosci Abstr*, 16: 40.
- Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes; implications for their role in neurologic diseases. *Neurosci*, 54: 15-36.
- 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.
- Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B (1971). An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res*, 28: 351-354.
- 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.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years. *Neurochem Res*, 25: 1439-1451.
- Eriksson P, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Nat Med*, 4: 1313-1317.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148: 2207-2216.
- Flower RJ, Rothwell NJ (1994) Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance. *Trends Pharmacol Sci*, 15: 71-76.
- Franck Z, Gary R, Bretscher A (1993) Moesin, like ezrin, colocalizes with actin in the cortical cytoskeleton in cultured cells, but its expression is more variable. *J Cell Sci*, 105: 219-231.
- Frederiksen K, McKay R (1988) Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci*, 8: 1144-1151.

- Frederiksen K, Jat JS, Valtz N, Levy D, McKay R (1988) Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron*, 1: 439-448.
- 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.
- Furnish EJ, Zhou W, Cunningham CC, Kas JA, Schmidt CE (2001) Gelsolin overexpression enhances neurite outgrowth in PC12 cells. *FEBS Lett*, 508: 282-286.
- 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*, 92: 11879-11883.
- Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (2007) *Die Parkinson-Krankheit*. 4. Aufl., Springer Verlag, Wien-New York.
- German DC, Manaye KF, White CL, Woodward DJ, McIntire DD, Smith WK, Kalaria RN, Mann DMA (1992) Disease-specific patterns of locus coeruleus loss. *Ann Neurol*, 32: 667-676.
- 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.
- Giasson BI, Lee VM (2000) A new link between pesticides and Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3: 1227-1228.
- Görg A, Weser J, Westermeier R, Postel W, Weidinger S, Patutschnick W, Cleve H (1983) Isoelectric focusing with immobilized pH gradients for the analysis of transferrin (Tf) subtypes and variants. *Hum Genet*, 64: 222-226.
- Haas MA, Vickers JC, Dickson TC (2007-a) Rho kinase activates ezrin-radixin-moesin (ERM) proteins and mediates their function in cortical neuron growth, morphology and motility in vitro. *J Neurosci Res*, 85: 34-46.
- Haas SJP, Wree A (2002) Dopaminergic differentiation of the nurr1-expressing immortalized mesencephalic cell line CSM14.1 in vitro. *J Anat*, 201: 61-69.
- Haas SJP, Beckmann S, Petrov S, Andresen C, Wree A, Schmitt O (2007-b) 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, Wree A (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.

Haas SJP (2009) 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.

Hagell P, Schrag A, Piccini P, Jahanshahi M, Brown R, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, Rothwell JC, Odin P, Wenning GK, Morrish P, Gustavii B, Björklund A, Brooks DJ, Marsden CD, Quinn NP, Lindvall O (1999) Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain*, 122: 1121-1132.

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

Han S, Zhang KH, Lu PH, Xu XM (2004) Effects of annexins II and V on survival of neurons and astrocytes in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 25: 602-610.

Halliday GM, Li YW, Blumbergs PC, Joh TH, Cotton RG, Howe PR, Blessing WW, Geffen LB (1990) Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 27: 373-385.

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.

Hatano S, Oosawa F (1966) Isolation and characterization of plasmodium actin. *Biochim Biophys Acta*, 127: 488-498.

Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M, Gauger L, Kordower JH, Olanow CW (1999) Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol*, 56: 179-187.

Hayakawa T, Chang MC, Rapoport SI, Appel NM (2001) Selective dopamine receptor stimulation differentially affects [<sup>3</sup>H]arachidonic acid incorporation, a surrogate marker for phospholipase A<sub>2</sub>-mediated neurotransmitter signal transduction, in a rodent model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 296: 1074-1084.

- Henry, M. D., Gonzalez Agosti, C. and Solomon, F. (1995). Molecular dissection of radixin: Distinct and interdependent functions of the amino and carboxyl-terminal domains. *J Cell Biol* 129: 1007-1022.
- Herbert B, Galvani M, Hamdan M, Olivieri E, MacCarthy J, Pedersen S, Righetti PG (2001) Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: why, when, and how? *Electrophoresis*, 22: 2046-2057.
- Hess SM, Connamacher RH, Ozaki M, Udenfriend S (1961) The effect of  $\alpha$ -methyl-dopa and  $\alpha$ -methyl-meta-tyrosine on the metabolism of norepinephrine and serotonin in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 134: 129-138.
- Hildebrandt S, Haas SJP, Andressen C, Wree A (2009) A rapid and easy method to clean and concentrate adenoviruses for in vitro and in vivo applications. *TIJM*, 2: 218-220.
- Hockfield S, McKay RDG (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci*, 5: 3310-3328.
- Hoffrogge R, Beyer S, Hübner R, Mikkat S, Mix E, Scharf C, Schmitz U, Pauleweit S, Berth M, Zubrzycki IZ, Christoph H, Pahnke J, Wolkenhauer O, Uhrmacher A, Völker U, Rolfs A (2007) 2-DE profiling of GDNF overexpression-related proteome changes in differentiating ST14A rat progenitor-cells. *Proteomics*, 7: 33-46.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347: 44-49.
- Huppelsberg J, Walter K (2005) *Kurzlehrbuch Physiologie*. 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
- 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.
- Hwang DY, Hong S, Jeong JW, Choi S, Kim H, Kim J, Kim KS (2009) Vesicular monoamine transporter 2 and dopamine transporter are molecular targets of Pitx3 in the ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurochem*, 111: 1202-1212.
- Janmey PA, Stossel TP (1987) Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature*, 325: 362-364.

- Janmey PA, Iida K, Yin HL, Stossel TP (1987) Polyphosphoinositide micelles and polyphosphoinositide-containing vesicles dissociate endogenous gelsolin-actin complexes and promote actin assembly from the fast-growing end of actin filaments blocked by gelsolin. *J Biol Chem*, 262: 12228-12236.
- Janmey PA, Stossel TP (1989) Gelsolin-polyphosphoinositide interaction. Full expression of gelsolin-inhibiting function by polyphosphoinositides in vesicular form and inactivation by dilution, aggregation, or masking of the inositol head group. *J Biol Chem*, 264: 4825-4831.
- Jellinger KA (2002) Recent developments in the pathology of Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 62: 347-376.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392: 605-608.
- Klein J (2000) Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *J Neural Transm*, 107: 1027-63.
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW (2008-1) Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med*, 14: 504-506
- Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Olanow CW, Freeman TB (2008-2) Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov Disord*, 23: 2303-2306.
- Lamb JA, Allen PG, Tuan BY, Janmey PA (1993) Modulation of gelsolin function. Activation at low pH overrides Ca<sup>2+</sup> requirement. *J Biol Chem*, 268: 8999-9004.
- Leist M, Jaattela M (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2: 589-598.
- Lessner G, Schmitt O, Haas SJ, Mikkat S, Kreutzer M, Wree A, Glocker MO (2010) Differential proteome of the striatum from hemiparkinsonian rats displays vivid structural remodeling processes. *J Proteome Res*, 9: 4671-4687.
- Levin EY, Levenberg B, Kaufman S (1960) The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J Biol Chem*, 235: 2080-2086.
- Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehnroos S, Björklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P (2008) Lewy bodies in grafted

neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med*, 14: 501-503.

Liebau S, Vaida B, Storch A, Boeckers TM (2007) Maturation of Synaptic Contacts in Differentiating Neural Stem Cells. *Stem Cells*, 25: 1720-1729.

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

Lindvall O, Kokaia Z (2009) Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 30, 5: 260-267.

Liu N, Han S, Lu PH, Xu XM (2004) Upregulation of annexins I, II, and V after traumatic spinal cord injury in adult rats. *J Neurosci Res*, 77: 391-401.

Liu Y, Namba T, Liu J, Suzuki R, Shioda S, Seki T (2010) Glial fibrillary acidic protein-expressing neural progenitors give rise to immature neurons via early intermediate progenitors expressing both glial fibrillary acidic protein and neuronal markers in the adult hippocampus. *Neuroscience*, 166: 241-251.

Lüllmann H, Mohr K, Hein L (2006) *Pharmakologie und Toxikologie*. 16. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.

MacLeod D, Dowman J, Hammond R, Leete T, Inoue K, Abeliovich A (2006) The familial Parkinsonism gene LRRK2 regulates neurite process morphology. *Neuron*, 52: 587-593.

Mangeat P, Roy C, Martin M (1999) ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol*, 9: 187-192.

Marsden CD (1982) Basal ganglia disease. *Lancet*, 2: 1141-1147.

Martin, M., Andréoli, C., Sahuquet, A., Montcourrier, P., Algrain, M. and Mangeat, P. (1995). Ezrin NH2-terminal domain inhibits the cell extension activity of the COOH-terminal domain. *J Cell Biol*, 128: 1081-1093.

Marusic S, Leach MW, Pelker JW, Azoitei ML, Uozumi N, Cui J, Shen MW, DeClercq CM, Miyashiro JS, Carito BA, Thakker P, Simmons DL, Leonard JP, Shimizu T, Clark JD (2005) Cytosolic phospholipase A2 alpha-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 202: 841-851.

Masuhr KF, Neumann M (2007) *Duale Reihe Neurologie*. 6. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.



- Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S, Tsukita S (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol*, 140: 647-657.
- 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.
- Mendez I, Sanchez-Pernaute R, Cooper O, Viñuela A, Ferrari D, Björklund L, Dagher A, Isacson O (2005) Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Brain*, 128: 1498-1510.
- Mendez I, Viñuela A, Astradsson A, Mukhida K, Hallett P, Robertson H, Tierney T, Holness R, Dagher A, Trojanowski JQ, Isacson O (2008) Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med*, 14: 507-509.
- Mizuno H, Asai K, Fujita K, Uemura K, Wada Y, Moriyama A, Ogawa H, Kimura S, Kato T (1998) Neurotrophic action of lipocortin 1 derived from astrocytes on cultured rat cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res*, 60: 28-39.
- Moses GS, Jensen MD, Lue LF, Walker DG, Sun AY, Simonyi A, Sun GY (2006) Secretory PLA2-IIA: a new inflammatory factor for Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 3: 28.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992) NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116: 201-211.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfried S (1964) Tyrosine hydroxylase, the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem*, 239: 2910-2917.
- Nyholm D, Nilsson Remahl AI, Dizdar N, Constantinescu R, Holmberg B, Jansson R, Aquilinius SM, Askmark H (2005) Duodenal levodopa infusion monotherapy vs oral polypharmacy in advanced Parkinson disease. *Neurology*, 64: 216-223.
- Oertel WH, Wolters E, Sampaio C, Gimenez-Roldan S, Bergamasco B, Dujardin M, Grosset DG, Arnold G, Leenders KL, Hundemer HP, Lledó A, Wood A, Frewer P, Schwarz J (2006) Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients. *Mov Disord*, 21: 343-353.
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 250: 4007-4021.

- 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.
- Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, López de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martínez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Martí-Massó JF, Pérez-Tur J, Wood NW, Singleton AB (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44: 595-600.
- Parkinson J (1817) *An essay on the shaking palsy*. Whittingam and Rowland, London.
- Parkinson Study Group (2004) Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 351: 2498-2508.
- Perretti M (1994) Lipocortin-derived peptides. *Biochem Pharmacol*, 47: 931-938.
- Perrone-Capano C, Di Porzio U (2000) Genetic and epigenetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Int J Dev Biol*, 44: 679-687.
- Pestonjamas K, Amieva MR, Strassel CP, Bauseef WM, Furthmayr H, Luna EJ (1995) Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Mol Biol Cell*, 6: 247-259.
- Piccini P, Brooks DJ, Björklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehncrona S, Widner H, Lindvall O (1999) Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*, 2: 1137-1140.
- Pinto F, Brenner T, Dan P, Krinsky M, Yedgar S (2003) Extracellular phospholipase A2 inhibitors suppress central nervous system inflammation. *Glia*, 44: 275-282.
- Poewe WH (1993) Die Neuropsychologie der Parkinson-Krankheit. In: Stern GM, Madeja UD, Poewe WH (Hrsg) *Trends in Diagnostik und Therapie des Morbus Parkinson*. Berlin: de Gruyter, 43-49.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E (1997) Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276: 2045-2047.
- Raynal P, Pollard HB (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1197: 63-93.

- Reutelingsperger CP, Hornstra G, Hemker HC (1985) Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem*, 151: 625-629.
- Reutelingsperger CP, van Heerde WL (1997) Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 53: 527-532.
- Righetti PG (2006) Real and imaginary artefacts in proteome analysis via two-dimensional maps. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 841: 14-22.
- Robinson RC, Mejillano M, Le VP, Burtnick LD, Yin HL, Choe S (1999) Domain movement in gelsolin: a calcium-activated switch. *Science*, 286: 1939-1942.
- Sacchetti P, Carpentier R, Ségard P, Olivé-Cren C, Lefebvre P (2006) Multiple signaling pathways regulate the transcriptional activity of the orphan nuclear receptor NURR1. *Nucleic Acids Res*, 34: 5515-5527.
- Sakura K, Ohshima-Sakurada M, Palmer TD, Gage FH (1999) Nurr1, an orphan nuclear receptor, is a transcriptional activator of endogenous tyrosine hydroxylase in neural progenitor cells derived from the adult brain. *Development*, 126: 4017-4026.
- Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004) Parkinson's disease. *Lancet*, 363: 1783-1793.
- Sarnat HB, Nochlin D, Born DE (1998) Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain Dev*, 20: 88-94.
- 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.
- Schrattenholz A (Hrsg.) (2001) *Methoden der Proteomforschung: molekulare Analyse der Proteinexpression*. 1. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- Schutters K, Reutelingsperger C (2010) Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases. *Apoptosis* 15: 1072-1082.
- Skalnikova H, Vodicka P, Gadher SJ, Kovarova H (2008) Proteomics of neural stem cells. *Exp Rev Proteomics*, 5(2): 1-12.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 338: 839-840.
- Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci*, 5: 239-246.

- Steinert PM, Liem RKH (1990) Intermediate filament dynamics. *Cell*, 60: 521-523.
- Stewart R, Christie VB, Przyborski SA (2003) Manipulation of human pluripotent embryonal carcinoma stem cells and the development of neural subtypes. *Stem Cells*, 21: 248-256.
- 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, Bhattacharyya A, Tai YT (2001) Neurons from stem cells: preventing an identity crisis. *Nat Rev Neurosci*, 2: 831-834.
- Takei N, Ohsawa K, Imai Y, Nakao H, Iwasaki A, Kohsaka S (1994) Neurotrophic effects of annexin V on cultured neurons from embryonic rat brain. *Neurosci Lett*, 171: 59-62.
- Takeshima T, Shimoda K, Sauve Y, Commissiong JW (1994) Astrocyte-dependent and -independent phases of the development and survival of rat embryonic day 14 mesencephalic, dopaminergic neurons in culture. *Neuroscience*, 60: 809-823.
- Tariq M, Khan HA, Al Moutaery K, Al Deeb S (2001) Protective effect of quinacrine on striatal dopamine levels in 6-OHDA and MPTP models of Parkinsonism in rodents. *Brain Res Bull*, 54: 77-82.
- Titsworth WL, Liu NK, Xu XM (2008) Role of Secretory Phospholipase A2 in CNS Inflammation: Implications in Traumatic Spinal Cord Injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 7: 254-269.
- Todd AJ, Spike RC, Polgár E (1998) A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience*, 85: 459-473.
- Turunen, O., Wahlstrom, T. and Vaheri, A. (1994). Ezrin has a COOHterminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J Cell Biol* 126, 1445-1453.
- Udenfriend S, Cooper JR, Clark CT, Baer JE (1953) Rate of turnover of epinephrine in the adrenal medulla. *Science*, 117: 663-665.
- Udenfriend S, Wyngaarden JB. (1956) Precursors of adrenal epinephrine and norepinephrine in vivo. *Biochim Biophys Acta*, 20: 48-52.
- Van der Kooy D (1979) The organisation of the thalamic, nigral and raphe cells projecting to the medial vs. lateral caudate-putamen in rat. A fluorescent retrograde double-labeling study. *Brain Res*, 169: 381-387.

- Vaudry D, Strork PJS, Lazarovici P, Eiden LE (2002) Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science*, 296: 1648-1649.
- 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.
- Warner TT, Schapira AH (2003) Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 (Suppl 3): 16-23.
- Wernig M, Scheffler B, Brüstle O (2003) Medizinische Perspektiven der Stammzellforschung. In: Ganten M, Ruckpaul K (eds.) *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Springer, Berlin : 680-710.
- 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.
- Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blümcke I (1996) NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*, 44: 1167-1171.
- 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.
- Yin HL, Stossel TP (1979) Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature*, 281: 583-586.
- Yin HL, Hartwig JH, Maruyama K, Stossel TP (1981) Ca<sup>2+</sup> control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. *J Biol Chem*, 256: 9693-9697.
- Zetterström RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science*, 276: 248-250.
- Zhu H, Dahlström A (2007) Glial fibrillary acidic protein-expressing cells in the neurogenic regions in normal and injured adult brains. *J Neurosci Res*, 85: 2783-2792.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F,

Müller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron*, 44: 601-607.

Zwaal RF, Schroit AJ (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*, 89: 1121-1132.

## **6.1 Internet-Quellen**

Stem Cell Basics: Introduction. In Stem Cell Information [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services, 2009 [zitiert: Montag, 22. 03. 2010] <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1>

UniProtKB/Swiss-Prot ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))

The University of New South Wales, Australien [zitiert: Freitag, 21. 05. 2010]

(<http://www.babs.unsw.edu.au/directory.php?personnelID=12>)

## 7 Anhang

### 7.1 Ergebnisse der Zellzählungen

Tabelle 11: Ergebnisse der Zellzählungen für Nestin

Antikörper	Zeitpunkt	well-Nr.	Zellzahl	Cy3-pos.	Prozent	Mittelwert [%]
<b>Nestin</b>	Tag 0	1	816	320	39,22	38,74
		2	914	347	37,96	
		3	838	321	38,31	
		4	451	178	39,47	
	Tag 14	1	822	93	11,31	11,46
		2	1287	142	11,03	
		3	672	83	12,35	
		4	925	103	11,14	
	Tag 28	1	264	50	18,94	15,09
		2	573	63	10,99	
		3	177	33	18,64	
		4	731	86	11,76	

Tabelle 12: Ergebnisse der Zellzählungen für GFAP

Antikörper	Zeitpunkt	well-Nr.	Zellzahl	Cy3-pos.	Prozent	Mittelwert [%]
<b>GFAP</b>	Tag 0	1		negativ	0,00	0,00
		2		negativ	0,00	
		3		negativ	0,00	
		4		negativ	0,00	
	Tag 14	1	377	69	18,30	18,72
		2	415	91	21,92	
		3	208	41	19,71	
		4	288	43	14,93	
	Tag 28	1	512	105	20,51	19,66
		2	444	73	16,44	
		3	499	110	22,04	
		4	565	111	19,64	

Tabelle 13: Ergebnisse der Zellzählungen für NeuN

Antikörper	Zeitpunkt	well-Nr.	Zellzahl	Cy3-pos.	Prozent	Mittelwert [%]
NeuN	Tag 0	1		negativ	0,00	0,00
		2		negativ	0,00	
		3		negativ	0,00	
		4		negativ	0,00	
	Tag 14	1	260	58	22,30	27,56
		2	755	226	29,93	
		3	172	53	30,81	
		4	136	37	27,20	
	Tag 28	1	120	78	65,00	64,06
		2	182	123	67,58	
		3	340	204	60,00	
		4	256	163	63,67	

Tabelle 14: Ergebnisse der Zellzählungen für TH

Antikörper	Zeitpunkt	well-Nr.	Zellzahl	Cy3-pos.	Prozent	Mittelwert [%]
TH Klon 2	Tag 0	1		negativ	0,00	
		2		negativ	0,00	
		3		negativ	0,00	
		4		negativ	0,00	
	Tag 14	1	340	49	14,41	12,07
		2	563	57	10,12	
		3	297	32	10,77	
		4	324	42	12,96	
	Tag 28	1	368	198	53,80	55,69
		2	322	194	60,24	
		3	405	213	52,59	
		4	376	211	56,11	



## 7.2 Ergebnisse der manuellen Spot-Detektion

Tabelle 15: Ergebnisse der manuellen Spot-Detektion: Anzahl der Spots im Referenzgel und in den Experimentalgelen, Anzahl der pro Gel auf das Referenzgel gematchten Spots sowie der Anteil der gematchten Spots an der Gesamtspotanzahl eines Gels.

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Gel- Nummer</b>	<b>Spot- Anzahl</b>	<b>Gematchte Spots</b>	<b>Anteil der gematchten Spots in [%]</b>
33 °C (Tag 0)	33-ref	506	—	—
	33-1	389	286	73,52
	33-2	417	319	76,50
	33-3	429	320	74,60
	33-4	439	305	69,48
	33-5	449	295	65,70
	33-6	422	259	61,37
39 °C 4 Wochen (Tag 28)	39-1	433	228	52,66
	39-2	395	202	51,14
	39-3	406	196	48,28
	39-4	695	295	42,45
	39-5	434	224	51,61
	39-6	483	237	49,07

### 7.3 Verwendete Materialien

Tabelle 16: Verzeichnis der für die Zellkultur verwendeten Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Bestell-Nr. (12/2008)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), liquid - with GlutaMAX™, 1000mg/L D-Glucose, Sodium Pyruvat	GIBCO Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, USA	21885
Antibiotic/Antimycotic Solution (100x)	GIBCO Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, USA	15240
Dishes Nunclon™Δ 100 x 15	Nalge Nunc™ Inc., Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA	150350
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	D5652
F12 Nutrient Mixture (Ham) (1x), liquid - with L-Glutamine	GIBCO Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, USA	21765
Foetal Bovine Serum "GOLD" defined FBS EU approved	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria	A15-151
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen	06 401 10
Rotofix 32; Rotor: 1619	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen	1206
Trypan Blau	Fluka, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	93595
Trypsin-EDTA (1x), liquid- 0,05% Trypsin, 0,53mM EDTA·4 Na	GIBCO Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, USA	25300

Tabelle 17: Verzeichnis der für die Immuncytochemie verwendeten Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Bestell-Nr. (12/2008)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt	1.065.801.000
4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	6335.1
Bovines Serum Albumin Fraktion V, ph 7.0	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11930.02
Cy™3-conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Mouse IgG + IgM (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA	715-166-151
Deckgläschen 10mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen	01 115 00
Deckgläschen 12mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen	01 115 20
Glycerol (87%)	Merck KGaA, Darmstadt	1.040.941.000
HCl - Salzsäure rauchend 37%	Merck KGaA, Darmstadt	1.003.171.000
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	6781.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt	1.048.731.000
mouse Anti-GFAP	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	G3893
mouse Anti-NeuN	CHEMICON, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA	MAB377

mouse Anti-Nestin	BD Pharmingen™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA	MAB353
mouse Anti-TH-clone 2	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	T 1299
Natriumchlorid	J.T. Baker Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA	0278
Normal horse serum	GIBCO Invitrogen™ Corporation, Carlsbad, CA, USA	16050-130
Nunc Multidishes Nunclon™Δ 24 wells	Nalge Nunc™ Inc., Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA	142485
Paraformaldehyd reinst	Merck KGaA, Darmstadt	1.040.051.000
Phenol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	P1037
Polyvinylalkohol (MW: 30000-70000)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	P8136-G250
TRIS Pufferan >99,9% p.a.	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	4855.2
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	T8787

Tabelle 18: Verzeichnis der für Proteomics verwendeten Materialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestell.-Nr. (07/2009)</b>
Acrylamid 40% (29:1)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg	10680
2-Vinylpyridin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	132292
Agarose NEEO	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	2267.2
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	3746.4
Ampholyte high resolution pH 3-10	BioChemika, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	39878
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	B6916
Brillant-Blau Coomassie G250	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	9598.2
Bromphenolblau Natriumsalz	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	A512.1
CHAPS ≥98% (TLC)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	C3023
Complete®	Roche Diagnostics GmbH, F.Hoffmann - La Roche Ltd., Basel, Schweiz	11836153001
DL-Dithiothreitol ≥98% (TLC), ≥99% (titration)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	D0632
Essigsäure	J.T. Baker Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA	6052
Glycerol	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	G9012
Glycin PUFFERAN® ≥ 99%, p.a.	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	3908.3
Harnstoff	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	U6540
HCl - Salzsäure rauchend 37%	Merck KGaA, Darmstadt	1.003.171.000
Heraeus® Multifuge® 1.0R; Rotor: 3041	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA	9945816

Immobiline™ DryStrip pH 3-10NL, 18cm	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden	17-1235-01
Methanol	J.T. Baker Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA	8045
Mineralöl	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA	163-2129
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine for electrophoresis, ~99%	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	T9281
O-Phosphorsäure	Merck KGaA, Darmstadt	1.005.731.000
PepA	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	P4265
pH-Meter Schott Instruments Lab 850	SI Analytics GmbH, Mainz	285201300
PMSF >99% (T)	BioChemika, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	78830
Protean Plus™ Dodeca™ Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA	165-4150/4151
Protean Plus™ Multi Casting Chamber	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA	165-4160
Protean® IEF Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA	165-400
Reagensglasschüttler Reax control	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach	541.11000.00
Reinstwasser Leitwert 0,05µS	Reinstwasseranlage im Institut für Anatomie, Rostock	
SDS Pellets ≥ 99%	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	CN30.3
Thiourea	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA	T7875
TRIS PUFFERAN® ≥ 99,9%, p.a.	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	4855.3
Ultraspec 1100	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden	nicht mehr erhältlich

## **7.4 Publikationen**

### **7.4.1 Veröffentlichungen**

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.

Klonierung und funktionelle Charakterisierung der Kdo-Transferase von *Arabidopsis thaliana* in *E. coli*. Bachelorarbeit, Universität zu Lübeck (2004).

### **7.4.2 Posterbeitrag**

Eckhoff BC, Haas SJP, Lessner G, Schmitt O, Wree A (2009) Dopaminergic differentiation of immortalized neural progenitors of the cell line CSM14.1 in vitro. Eight Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society.

## 7.5 Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Oliver Schmitt für die Bereitstellung des Themas sowie für die kompetente und freundliche Betreuung bedanken. Ich bin ihm außerdem sehr dankbar für die Durchführung der statistischen Auswertungen in beiden Teilen dieser Arbeit, für die Anleitung zur stereologischen Zellzählung und die Unterstützung bei der Auswertung der Ergebnisse im Proteomicsteils.

Herrn Professor Dr. med. Andreas Wree danke ich sehr herzlich für die freundliche Unterstützung und für die Möglichkeit meine Ergebnisse auf der 8. Göttinger Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft vorstellen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Stefan Jean-Pierre Haas für die umfassende, kompetente Betreuung bei allen Teilen dieser Arbeit, die Einführung in die Immunocytochemie und für die vielen aufmunternden Worte.

Frau Grit Lessner danke ich sehr herzlich für die Einführung in die Methode Proteomics und unermüdliche Hilfe bei allen Fragen.

Ohne die methodische Anleitung und tatkräftige Hilfe von Frau Antje Schümann (BTA) wäre der Proteomics-Teil dieser Arbeit nicht zustande gekommen. Dafür möchte ich mich herzlich bei ihr bedanken.

Für die Durchführung der Proteinidentifizierung durch das Proteom-Zentrum Rostock danke ich besonders Herrn Professor Dr. rer. nat. Michael O. Glocker und Herrn Dr. rer. nat. Stefan Mikkat sowie Herrn Michael Kreutzer.

Bei allen anderen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Anatomie der Universität Rostock bedanke ich mich für die immer freundliche und zuvorkommende Hilfe bei großen und kleinen Problemen.