

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

**Differenzierung der immortalisierten mesenzephalen  
Progenitorzelllinie CSM14.1 *in vitro***

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

vorgelegt von  
Mariya Spasova  
aus Sofia, Bulgarien

Rostock 2005

*urn:nbn:de:gbv:28-diss2009-0139-1*

Dekanin: Prof. Dr. Nöldge-Schomburg

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree, Institut für Anatomie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Arndt Rofs, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Hubert Korr, Lehr- und Forschungsgebiet Anatomie und Zellbiologie, Universitätsklinikum Aachen

Verteidigung: 18. 4. 2006

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden als Abstracts publiziert.

Spasova M, Schmitt O, Wree A (2004) *In vitro*-Charakterisierung der mesenzephalen immortalisierten Progenitorzelllinie CSM14.1. Ann Anat 186 (Suppl): 280

Spasova M, Schmitt O, Wree A (2005) Cytokine induced differentiation of the CSM14.1 cell line *in vitro*. Ann Anat 187 (Suppl): 178

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 Stammzellen und CSM14.1-Zellen .....	9
1.2 Fragestellung der vorliegenden Arbeit .....	17
<b>2. Untersuchte Proteine .....</b>	<b>18</b>
2.1 Intermediärfilamente .....	18
2.1.1 Nestin .....	19
2.1.2 GFAP .....	20
2.2 Mikrotubulus-assoziierte Proteine .....	20
2.2.1 MAP2 .....	22
2.2.2 MAP5 .....	22
2.3 Neuronenspezifische Enolase (NSE) .....	24
2.4 Neuronenspezifisches Kernprotein (NeuN) .....	25
2.5 Dopaminerge Differenzierung .....	26
2.5.1 Nukleärer Retinsäurerezeptor (Nurr1) .....	27
2.5.2 Tyrosinhydroxylase (TH) .....	28
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
3.1 Zellkultur .....	31
3.1.1 Behandlung mit DMEM + 10% FCS, Kontrollmedium .....	32



3.1.2 Behandlung mit DMEM + 1% FCS .....	33
3.1.3 Behandlung mit DMEM + 1% FCS + Zytokinen .....	34
3.2 Zellzahlbestimmung .....	35
3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	36
3.4 Western Blot .....	37
3.5 Immunzytochemie .....	38
3.5.1 DAB-Färbung .....	40
3.5.2 Fluoreszenzmarkierung .....	41
3.6 Immunzytochemische Auswertung .....	42
3.7 Morphologie an Zellkulturen .....	43
3.8 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper .....	43
3.8.1 Antikörper für Western Blots .....	43
3.8.2 Antikörper für Immunzytochemie .....	44
3.9 Morphometrie, Stereologie, Bildanalyse und Statistik .....	45
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
4.1 Kulturen bei 33°C + 1%FCS .....	50
4.2 Experimente mit Zytokincocktail .....	63
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>77</b>
5.1 Stammzellen und Transplantation .....	77
5.2 Differenzierungspotential der CSM14.1-Zellen nach Serumreduktion .....	80
5.3 CSM14.1-Zellen und neurotrophe Faktoren .....	82

5.4 CSM14.1-Zellen und Zytokincocktail .....	84
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>7. Thesen .....</b>	<b>134</b>
<b>8. Persönliche Angaben und Dank.....</b>	<b>137</b>
8.1 Erklärung .....	137
8.2 Danksagung .....	138
8.3 Lebenslauf .....	139

## Abkürzungsverzeichnis

AADC	Aromatic L-amino acid decarboxylase
ADH2	Aldehyddehydrogenase 2
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ALD	L-aromatic amino-acid decarboxylase
AMCA	Trans-4-aminomethyl-cyclohexan-1-carbonic acid
BF	Bandenfläche
BSA	Bovines Serumalbumin
CE	Coefficient of error
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
COMT	Catechol-O-methyl transferase
CY3	Cyanin-Farbstoff 3
DA	Dopamin
DAB	Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DAPI	Diamidino-Phenylindol
DAT	Dopamintransporter
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid;
DβH	Dopamin-β-Hydroxylase
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
FCS	Fetales Kälberserum
FGF8	Fibroblastenwachstumsfaktor 8
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial fibrillary acid protein
GFR1-4α	Glycosylphosphatidylinositol-linked cell surface molecule α
HVA	Homovanillinsäure
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
IF	Intermediärfilamente
IL1	Interleukin 1
IL6	Interleukin 6
IL11	Interleukin 11
LIF	Leukemia inhibitory factor

M	Metanephrin
MAO	Monoamin oxidase
MAP	Mikrotubulus-assoziiertes Protein
MFL	Mittlere Fortsatzlänge
MHPG	3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglycol
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-Tetrahydropyridin
ms	Anti-Maus Antikörper
3MT	3- <i>O</i> -methyldopa
MW	Mittelwert
Nestin	Neuronales Stammzellprotein (neuronal stem cell protein)
NeuN	Neuronenspezifisches Kernprotein (neuron-specific nuclear protein)
NGS	Normal goat serum (Ziegenserum)
NM	Normetanephrin
NSE	Neuronenspezifische Enolase
Nurr1	Nukleärer Retinsäurerezeptor
OD	Optische Dichte
OSM	Oncostatin M
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PNM	Phenylethanolamine N-methyltransferase;
PNS	Peripheres Nervensystem
rb	Anti-Kaninchen Antikörper
Ret	Rezeptorprotein Tyrosinkinase
RT	Raumtemperatur
SA	Standardabweichung
SF	Standardfehler
Shh	Sonic hedgehog
SV40	Simian-Virus-40
TH	Tyrosinhydroxylase
TRIS	TRIS-hydroxymethylaminomethan (Puffersubstanz)
VMA	Vanillylmandelic acid
ZD	Zelldichte
ZNS	Zentrales Nervensystem

# **1. Einleitung**

## **1.1 Stammzellen und CSM14.1-Zellen**

In die Nutzung von Stammzellen als Grundlage zukünftiger neurologischer Therapieoptionen setzt man große Erwartungen. Die Vorstellung, einen Verlust von Neuronen durch gezielte Transplantation von Nervenzellen ausgleichen zu können, ist konzeptionell unmittelbar einsichtig und dem Ideal einer kausalen Therapie sehr nahe. Theoretisch gibt es kaum eine neurologische Erkrankung, die, wenn sie mit Zellverlust oder Zelldegeneration einhergeht, nicht potentiell direkt oder indirekt von einem Zellersatz profitieren könnte. Dabei reicht das Spektrum einer theoretisch denkbaren Zellersatztherapie von relativ umschriebenen Neuronenverlusten wie bei Morbus Parkinson oder Chorea Huntington über komplexere Ausfälle wie bei Morbus Alzheimer bis hin zu diffusen Ausfällen im Rahmen von Hypoxien und Ischämien. Schließlich gibt es Möglichkeiten, die Kompatibilität transplanterter neuronaler Stammzellen mit der zellulären Umgebung eines Empfängergehirns zu nutzen, um sie als genetisch modifizierte Zellen, die Wachstumsfaktoren oder andere wünschenswerte Faktoren produzieren, in das erkrankte Gehirn einzubringen.

Es bestehen heute schon Erfahrungen mit der Transplantation von unreifem fetalen Gewebe aus dem ventralen Mesenzephalon in das Corpus striatum von Parkinson-Patienten (Brundin et al. 1998), und erste experimentelle Therapien dieser Art sind auch mit einigem Erfolg bei Patienten mit Chorea Huntington durchgeführt worden (Bachoud-Levi et al. 2000). Der Therapieerfolg bei diesen Studien war zwar weder einheitlich noch durchschlagend, der Beweis der grundsätzlichen Machbarkeit wurde jedoch geführt. Es ist zu vermuten, dass die im Transplantat enthaltenen neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen hierbei die für den therapeutischen Effekt verantwortlichen Zellen sind.

Das therapeutische Wissen über den Einsatz definierter Stammzellpopulationen stammt zur Zeit noch weitergehend aus Tierversuchen. Experimentelle Transplantationsstudien bei Tiermodellen des M. Parkinson wurden in den letzten 30 Jahren durchgeführt. An Nagetieren und nichtmenschlichen Primaten, bei denen zuvor experimentell ein Morbus Parkinson induziert wurde, wurden die Effekte der Transplantation an einem breiten Spektrum von Zellen untersucht: chromaphine Zellen aus dem Nebennierenmark (Freed et al. 1990; Aebischer et al. 1991), zervikale Sympathikusganglien-Zellen (Itakura et al. 1994), humane Neuroblastomazellen (Manaster et al. 1992), Sertoli-Zellen aus dem Hoden (Sanberg et al. 1997; Liu et al.

1999), humane retinale Pigmentepithelzellen (Subramanian et al. 1998), Glomus caroticum-Zellen (Espejo et al. 1998; Luquin et al. 1999), humane Amnionepithelzellen (Kakishita et al. 2000), um nur einige Beispiele anzuführen. Die besten Ergebnisse in diesen präklinischen Studien wurden mit Transplantaten von dopaminergem Gewebe aus dem ventralen Mesenzephalon von unterschiedlichen Spezies erzielt (Herman und Arous 1984; Björklund und Lindvall 2000).

Trotz voreiliger klinischer Einsätze zeigen die heutigen Ergebnisse, dass die Zeit für die Klinik noch nicht reif ist, aber sich ihr mit großer Geschwindigkeit nähert. Einige grundsätzliche Fragen sind noch zu klären, bevor Stammzellen wirklich klinisch einsetzbar werden. Man muss sich genaue Kenntnisse davon verschaffen, was Stammzellen können, was mit ihnen nicht möglich ist, welches ihre physiologische Funktion ist und wie weit sich diese therapeutisch einsetzen läßt.

Der größte Teil der neurobiologischen Stammzellforschung hat sich bislang auf die Zellkultur konzentriert, die darauf basierenden neuen Therapieformen zielen in der Regel primär auf eine Transplantation von neuronalen Stammzellen in das erkrankte Gehirn ab. Neuronale Stammzellen lassen sich aus embryonalem und adultem Hirngewebe verschiedener Spezies gewinnen und beliebig in Kultur bringen (Gage 2000).

Unter einer Stammzelle versteht man nach der Definition eine undifferenzierte Zelle, aus der durch Zellteilung entweder zwei neue Stammzellen hervorgehen können (symmetrische Teilung) oder aber eine neue Stammzelle und eine Zelle, die Ausgangspunkt für eine Ausdifferenzierung ist (asymmetrische Teilung). Im frühen Embryonalstadium entstehen Stammzellen, die noch totipotent sind, da sie alle Zell- und Organtypen hervorbringen können, jedoch kein vollständiges Individuum. Die sogenannten „embryonalen Stammzellen“ sind pluripotent. Im weiteren Verlauf der Entwicklung entstehen in den einzelnen Geweben gewebespezifische Stammzellen, aus denen die Zellen des betreffenden Gewebes hervorgehen können. Diese Zellen werden als multipotent bezeichnet. Der Begriff der „Vorläuferzelle“ wird in der Regel dann verwendet, wenn unklar ist, ob eine Zelle die Kriterien einer Stammzelle erfüllt. Gleichzeitig kann unter einer Vorläuferzelle ein Zelltyp verstanden werden, der aus einer multipotenten Stammzelle hervorgegangen ist, teilungsfähig, aber nur noch unipotent ist. Diese Zellen werden häufig auch als Progenitoren oder „Precursors“ bezeichnet.

Neuronale Stammzellen sind unreife Zellen des Zentralnervensystems und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, sich zeitlebens zu teilen, sich selbst zu erneuern und reife Nerven- und Gliazellen hervorzubringen. Obwohl das Gehirn traditionell als Organ mit sehr geringer regenerativer Fähigkeit angesehen wurde, konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass selbst im erwachsenen Nervensystem neuronale Stammzellen existieren (Reynolds und Weiss 1992; Richards et al. 1992). Neuronale Stammzellen des fetalen und des erwachsenen Gehirns sind in der Lage, in der Zellkultur (*in vitro*) und nach Transplantation (*in vivo*) die neuronalen Anteile des Gehirns (Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten) zu bilden. Deshalb werden sie als mögliches Ausgangsmaterial für die Zellersatztherapie bei neurologischen Erkrankungen angesehen.

Neuronale Stammzellen wurden erstmals 1992 aus dem Vorderhirn der erwachsenen Maus extrahiert (Reynolds und Weiss 1992; Richards et al. 1992). Während die ursprüngliche Publikation von Reynolds und Weiss (1996) noch von Zellen aus dem Striatum spricht, wurde später klar, dass es sich genaugenommen um Zellen der subventrikulären Zone handelte. Hier befindet sich eine Population von Stamm- und Vorläuferzellen, die auch im Erwachsenenalter noch in größerer Zahl neue Nervenzellen produziert. *In vitro* zeigten diese Zellen die Charakteristika der Multipotenz (Reynolds und Weiss 1996).

Die neuronalen Stammzellen haben nur ein beschränktes Potential sich *in vitro* zu teilen. Die Immortalisierung von Vorläuferzellen des Zentralnervensystems bietet eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen. Durch die Immortalisierung bleiben die Zellen in einem kontinuierlichen Zellzyklus. Darüber hinaus ist es möglich, die Zellen genetisch so zu verändern, dass sie in der Lage sind, verschiedene Wachstumsfaktoren oder Enzyme zu produzieren. Zur Immortalisierung wurden die Zellen am häufigsten mit Genen verschiedener Isoformen von myc, neu, p3, adenoviralem E1A und SV40 Large-T-Antigen transfiziert. Diese Gene kodieren Onkoproteine, die temperatursensitiv sind und für die Eigenschaft der Zellen, sich uneingeschränkt zu vermehren, verantwortlich sind (Bartlett et al. 1988; Frederiksen et al. 1988). Die von uns verwendeten Progenitorzellen der Zelllinie CSM14.1 (Durand et al. 1990) sind aus dem ventralen Mesenzephalon von E14-Ratten gewonnen und temperatursensitiv immortalisiert. Für die Immortalisierung wurden sie mit einem retroviralen Vektor transfiziert (Durand et al. 1990). Er enthält das Gen für die temperatursensitive Expression des Large-T-Antigens des Simian-Virus-40 (SV40). SV40 ist ein kleines

Virus mit doppelsträngiger DNS. Large-T-Antigen ist ein multifunktionales Phosphoprotein, 85 kDa schwer, und notwendig für die Replikation des SV40-Virus. Es ist als Inaktivator des Tumorsuppressorproteins bekannt und wird auch für die Untersuchung der Kontrolle der Zellvermehrung und Transformation benutzt.

Das Proliferationspotenzial der so veränderten Zellen kann man leicht steuern. Bei der sogenannten permissiven Temperatur von 33° C + 10% FCS im Kulturmedium sind die Zellen in der Lage, sich uneingeschränkt zu vermehren (Martinez-Serano und Björklund 1997; Cattaneo und Conti 1998; Whittemore und Onifer 2000). Mit der Erhöhung der Temperatur auf 39° C, die sogenannte nicht permissive Temperatur, und Serumreduktion (1% FCS) (Winkler et al. 1998) wird das Large-T-Antigen inaktiviert. Die Zellen verlieren ihr Potenzial sich ungehindert zu vermehren, aber erwerben die Möglichkeit für eine gliale oder neuronale Differenzierung. CSM14.1-Zellen exprimieren das antiapoptotische Gen Bcl-2 (Anton et al. 1995) und das mit ihm verbundene Bag-1 Protein (Kermer et al. 2002). Bcl-2 beeinflusst das Überleben immortalisierter mesenzephaler neuronaler Zelllinien nach der Transplantation und spielt eine protektive Rolle gegen viele Tod-induzierende Stimuli (Zhong et al. 1993; Anton et al. 1995). Bag-1 ist ein Regulator der neuronalen Differenzierung *in vitro* und ein Marker der neuronalen Differenzierung *in vivo* im reifenden Nervensystem von Mäusen.

In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass CSM14.1-Zellen *in vitro* ein neurogenes Potenzial besitzen (Haas und Wree 2002). Die Zellen wurden 14 Tage kultiviert. Nach der Temperaturerhöhung (von 33° C auf 39° C) und einer Serumreduktion (von 10% FCS auf 1% FCS) veränderten sich die kleinen, epitheloiden Zellen morphologisch. Nach einer Woche in Kultur besaßen sie multipolare Perikarya und ähnelten reifen Neuronen. Am 14. Kulturtag, dem letzten Tag der Kultivierung, waren die Fortsätze länger geworden und bildeten ein Netzwerk. Zu diesem Zeitraum wurden die Zellen immunzytochemisch und mittels Western Blot untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression des Markes unreifer Progenitorzellen (Nestin) stark abnahm. Die Expression der untersuchten neuronalen Marker (NeuN, NSE, MAP5) stieg gegenüber den bei 33° C kultivierten Zellen in der Konzentration an. Die Zellen wurden auch auf ihr dopaminerges Differenzierungspotenzial untersucht. Nach Kultivierung bei 39° C waren sie deutlich positiv für Nurr1, für das Schrittmacherenzym der Dopaminsynthese Tyrosinhydroxylase (TH) und für den Marker dopaminerges Neurone Aldehyddehydrogenase 2 (ALDH2). Bezüglich der



untersuchten neurotrophen Faktoren GDNF und CNTF konnte gezeigt werden, dass sie nur GDNF exprimieren (Haas und Wree 2002; Petrov et al., 2004).

Die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Transplantationen der CSM14.1-Zellen in das adulte Rattenhirn zeigen darüber hinaus, dass CSM14.1-Zellen im Wirtsgewebe überleben und differenzieren, ohne Tumore zu bilden (Petrov et al. 2004; Haas et al. 2005).

Aufgrund der potentiellen Bedeutung der CSM14.1-Zellen für Transplantationen in experimentellen Tiermodellen ist es notwendig, eine weiterführende Charakterisierung der CSM14.1-Zellen unter unterschiedlichen Differenzierungsbedingungen *in vitro* zu erarbeiten. Eine Prädifferenzierung der CSM14.1-Zellen *in vitro* mit Hilfe von Zytokinen erscheint aussichtsreich, um den gewünschten Transmitterphänotyp vor der Transplantation zu induzieren. In einigen Studien, die diese Strategie zum Einsatz gebracht haben, wurde der Einfluss von Zytokinen auf mesenzephal subependymale Progenitorzellen *in vitro* untersucht (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999; Carvey et al. 2001; Storch et al. 2001). Diese Autoren haben einen Zytokincocktail aus IL1, IL11, LIF und GDNF verwendet und die Progenitorzelllinie auf die neuronale und dopaminerge Differenzierung untersucht. Eine steigende TH- und Nurr1-Expression zusammen mit einer Zellmorphologie, die der von TH-positiven Neuronen ähnelte, wurde nachgewiesen. Nach den vielversprechenden Ergebnissen *in vitro* wurden die Populationen von aus neuronalen oder embryonalen Stammzellen prädifferenzierten dopaminergen Vorläufern im Nagetiermodell des M. Parkinson transplantiert und eine funktionelle Verbesserung demonstriert (Studer et al. 1998; Kawasaki et al. 2000; Sanchez-Pernaute et al. 2001; Sawamoto et al. 2001a, b; Storch et al. 2001; Barberi et al. 2003).

Zytokine sind Glycoproteine, die überwiegend von Zellen des Immunsystems sezerniert werden. Die Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems und die Endothelzellen sezernieren ebenfalls Zytokine (Nicola und Hilton 1998; Allan und Rothwell 2001). Diejenigen Zytokine, die von Leukozyten produziert werden, bezeichnet man als Interleukine. Sie wirken über spezifische Rezeptoren. Sie kontrollieren und koordinieren zahlreiche Zellsysteme in Organismen. Zytokine regulieren die Hematopoese, die Aktivierung und Reifung der Immunzellen und ihr Zusammenspiel während der Immunantwort sowie die Entwicklung des Nervensystems (Nicola und Hilton 1998; Allan und Rothwell 2001; Ostfeld und

Svendsen 2003). Einige werden im ZNS sezerniert und deshalb auch neuroregulatorische Zytokine genannt. Zu ihnen gehören: IL1, IL11, LIF und GDNF. Interleukin 1 (IL1) wird vor allem von Makrophagen produziert. Es gibt zwei Formen von IL1:  $\alpha$  und  $\beta$ . Sie besitzen unterschiedliche Strukturen, zeigen aber ähnliche Aktivitäten und aktivieren dieselben Rezeptoren. IL1 ist der Hauptmediator jeder Infektion durch die Aktivierung verschiedene Zelltypen (Dinarello 1998). Gleichzeitig ist IL1 der wichtigste Mediator bei der immunologischen Antwort des Gehirns nach jeder Infektion, einem Trauma und bei neurodegenerativen Prozessen (Hopkins und Rothwell 1995; Rothwell und Luheshi 2000). Im gesunden Gehirn reguliert IL1 Schlaf-, Temperatur- und Hungerzentren und wirkt dabei somnogen, pyrogen und anorektisch (Vitkovic et al. 2000). Im geschädigten Gehirn ist die Expression von IL1 hauptsächlich in der Mikroglia hochreguliert (Giulian et al. 1986) und wird zum Hauptmediator zwischen Mikroglia und Astrozyten. Die Verbindung zwischen Expression von IL1 und Aktivierung von Astrozyten wurde *in vitro* (Carman-Krzan et al. 1991; Lee et al. 1993; Liu et al. 2000) und *in vivo* (Giulian et al. 1988; Sheng et al. 1996; Casamenti et al. 1998) nachgewiesen. IL1 ist für Neurone nicht toxisch, kann aber die ischämische (Yamasaki et al. 1995; Loddick und Rothwell 1996) und zytotoxische (Lawrence et al. 1998) Läsion verstärken. Eine intranigrale Infusion von IL1 5 Tage vor einer striatalen Injektion von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) schützt signifikant die Perikarya der Neuronen in der Substantia nigra (Saura et al. 2003).

Der Einfluss von IL1 auf die Differenzierung von Stammzellen wurde bisher wenig untersucht. *In vitro* wurde eine stimulierende Wirkung auf die dopaminerge Differenzierung von mesenzephalen subependymalen Progenitorzellen nachgewiesen (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999; Carvey et al. 2001).

Interleukin 11 (IL11), identifiziert als Plasmazytoma growth factor, gehört zur Interleukin 6 (IL6)-Familie. Zu dieser Familie zählt man neben IL11 und IL6 auch: Ciliary neurotrophic factor (CNTF), Leukemia inhibitory factor (LIF), Oncostatin M (OSM) und Cardiotrophin-1 (Taga 1996). Alle sechs Zytokine teilen sich den Signal-Transduktions-Rezeptor, gp130. Der gemeinsame Rezeptor erklärt ihre fast identischen Funktionen (Taga und Kishimoto 1997). IL11 wurde auf Grund seiner Fähigkeit zur Induktion der Proliferation von Plasmazytomazellen isoliert (Hangoc et al. 1993). Später wurde nachgewiesen, dass IL11 zahlreiche weitere Wirkungen hat. Es reguliert hematopoetische Progenitorzellen (Musashi et al. 1991; Burstein et al. 1992; Hangoc et al. 1993; Hawley et al. 1993), den Metabolismus von Knochen und die Synthese der

akute-Phase-Proteine in der Leber (Taga 1996). Mehler et al. (1993) berichten, dass IL11 eine neuronale Differenzierung hippokampaler Zellen *in vitro* induziert. Yanagisawa et al. (2000) wiesen ebenfalls *in vitro* eine astrozytäre Differenzierung fetaler neuroepithelialer Zellen durch IL11 nach. Interessanterweise zeigten gp-130-knock-out Mäuse einen Verlust der Motoneurone im Nucleus n. facialis, Nucleus ambiguus und im Vorderhorn des Rückenmarkes und der sensorischen Neurone im Hinterhorn des Rückenmarkes (Nakashima et al. 1999). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das gp130-Signal das Überleben schon differenzierter Neurone unterstützt (Nakashima et al. 1999). IL11 reguliert somit sowohl die Entwicklung von Astrozyten als auch das Überleben von Neuronen. IL11 allein hat keine stimulierende Wirkung bei der Differenzierung von mesenzephalen Progenitorzellen zu DA-Neuronen, es unterstützt jedoch die Wirkung von IL1 (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999; Carvey et al. 2001).

Leukemia inhibitory factor (LIF), ein weiteres Mitglied der IL6-Familie, kann von verschiedenen Zellen exprimiert werden, u.a. von Osteoblasten (Greenfield et al. 1996), Mastzellen (Marshall et al. 1993), Fibroblasten (Elias et al. 1994) und Astrozyten (Aloisi et al. 1994; Murphy et al. 1995). Von LIF ist bekannt, dass es *in vitro* embryonale Stammzellen (aus der Maus) in einem undifferenzierten Stadium hält (Smith et al. 1988). LIF fördert zusammen mit dem Epidermal growth factor (EGF) das Langzeitwachstum von ItNSC-Zellen (Wright et al. 2003). Im ZNS inhibiert LIF die terminale Differenzierung olfaktorischer Rezeptoren (Moon et al. 2002) und stimuliert die Reifung von sympathischen Neuronen im peripheren Nervensystem (Nawa et al. 1991). Neuronale Stammzellen, die aus LIF-knock-out Mäusen gewonnen wurden, zeigen eine signifikante Reduktion der GFAP-Expression. LIF scheint damit für die Entwicklung und Differenzierung von Astrozyten wichtig zu sein (Bonni et al. 1997; Koblar et al. 1998; Wright et al. 2003).

Zahlreiche Studien beschreiben, dass LIF die Wirkung verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst, z.B. IL $\alpha$  (Ishimi et al. 1992; Hamilton et al. 1993; Arici et al. 1995; Grosset et al. 1995), IL $\beta$  (Hartner et al. 1994; Carlson und Hart, 1996; Carlson et al. 1996), Epidermal growth factor (Arici et al. 1995; Schluns et al. 1997), Oncostatin M (Heymann et al. 1995), Transforming growth factor  $\beta$  (Arici et al. 1995; Matsuoka et al. 1997; Schluns et al. 1997), Tumor necrosis factor  $\alpha$  (Ishimi et al. 1992; Hamilton et al. 1993; Lorenzo et al. 1994; Arici et al. 1995), Platelet growth factor (Arici et al. 1995) und Interferon  $\gamma$  (Arici et al. 1995).

LIF wird des weiteren mit der Entwicklung und der Reifung des ZNS in Zusammenhang gebracht. *In vitro* differenzieren Zellen aus der Neuronalleiste unter Einfluss von LIF zu einem kleineren Teil in Astrozyten (Turnley und Bartlett 2000), aber zu über 50% in sensorische Neurone (Murphy et al. 1990). LIF wird auch „survival factor“ genannt, weil er das Überleben der sensorischen Neurone (Murphy et al. 1995), der Neurone des Ganglion spirale (Marzella et al. 1997), des Ganglion trigeminale (Horton et al. 1998) und der parasympathischen und der sympathischen Ganglien (Adler et al. 1979; Manthorpe et al. 1980; Eckenstein et al. 1990; Leung et al. 1992; Heller et al. 1993) unterstützt. Obwohl die beiden Zytokine IL11 und LIF alleine überwiegend die Entwicklung von Astrozyten aus neuronalen Progenitorzellen stimulierten, erhöhen beide zusammen mit IL1 die Zahl der TH-immunreaktiven Neurone (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999; Carvey et al. 2001; Storch et al. 2001). Die Autoren erklärten diese Wirkung mit dem gemeinsamen Rezeptor gp130. IL1 induziert die Expression von gp130, und dann folgt eine Überstimulation durch die beiden Agonisten (IL11 und LIF). Diese „Überstimulation“ soll verantwortlich sein für die Differenzierung von neuronalen Progenitoren in TH-immunreaktive Neurone.

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (Lin et al. 1993) ist der potenteste trophische Faktor, der gleichzeitig DA-Neurone und spinale Motoneurone beeinflusst. GDNF gehört zur Gruppe der neurotrophen Faktoren, zu der auch Neurturin (Kotzbauer et al. 1996), Persephin (Milbrandt et al. 1998) und Artemin/Neublastin (Lindsay und Yancopoulos 1996; Unsicker 1996; Baloh et al. 1998; Rosenblad et al. 2000) gezählt werden. Diese Proteine regulieren Zellproliferation und Differenzierung (Kingsley 1994). Sie sind im sich entwickelnden Striatum hoch exprimiert, und zum Abschluss der Entwicklung nimmt die Expression progressiv ab (Schaar et al. 1993; Strömberg et al. 1993; Springer et al. 1994; Choi-Lundberg und Bohn 1995; Nosrat et al. 1996; Suvanto et al. 1996; Pochon et al. 1997; Trupp et al. 1997). Die biologische Aktivität des GDNF ist von zwei Rezeptorkomplexen mediiert: glycosylphosphatidylinositol-linked cell surface molecule  $\alpha$  (GFR1-4 $\alpha$ ) und Rezeptorprotein Tyrosin kinase (Ret) (Airaksinen und Saarma 2002; Baloh et al. 2000).

GDNF ist nicht exklusiv im Nervensystem anzutreffen, er wird auch in nicht-neuronalem Gewebe wie Niere, Darm und Muskel gefunden (Hellmich et al. 1996; Moore et al. 1996; Nosrat et al. 1996; Pichel et al. 1996; Sanchez et al. 1996; Suvanto et al. 1996). GDNF wird ebenfalls von Astrozyten und Gliomazellen exprimiert (Schaar et al. 1993; Moretto et al. 1996; Suter-Crazzolara und Unsicker 1996;

Unsicker 1996; Verity et al. 1999). Knockout-Experimente zeigen die große Bedeutung von GDNF: die Tiere sterben am ersten Tag nach der Geburt (Moore et al. 1996; Pichel et al. 1996; Sanchez et al. 1996).

GDNF steigert auch die Menge der überlebenden Zellen nach einer neuronalen Transplantation in verschiedene Regionen des ZNS (Rosenblad et al. 1999; Trok et al. 1996; Granholm et al. 1997; Sautter et al. 1998). Injektionen von GDNF in das Striatum steigern die Funktionalität von nigralen DA-Transplantaten (Rosenblad et al. 1999; Granholm et al. 1997; Sautter et al. 1998). Es wurde nachgewiesen, dass GDNF einen spezifischen trophischen Effekt auf DA-Neurone hat (Lin et al. 1993; Beck et al. 1995; Nakao et al. 2000). GDNF induziert die Ausbildung von DA-Fasern und deren Verzweigung *in vivo* und *in vitro* und steigert die Anzahl überlebender TH-positiver Neurone (Hudson et al. 1995; Johansson et al. 1995; Opacka und Brodie 1995; Rosenblad et al. 1999; Sinclair et al. 1996; Aoi et al. 2000).

Eine Vorbehandlung mit GDNF hat einen neuroprotektiven Effekt gegen 6-OHDA-Läsionen (Kearns und Gash 1995; Sauer et al. 1995; Shults et al. 1996), 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP)-Injektionen (Tomic et al. 1995) und gegen die Transektion des Tractus nigrostriatalis (Beck et al. 1995).

GDNF wird mit seinen neuroprotektiven und regenerativen Eigenschaften auch als effektive Therapieoption bei Morbus Parkinson angesehen. Die Gabe von GDNF wurde auch in klinischen Studien von Parkinson-Patienten untersucht, bei denen GDNF intraparenchymal mit vielversprechenden Ergebnissen injiziert wurde. GDNF lindert die Symptome und beeinflusst den Krankheitsverlauf (Kearns et al. 1997; Aebischer und Ridet, 2001; Tuszynski et al. 2002; Gill et al. 2003; Kirik et al. 2004).

Eine Zusammenfassung der Literaturbefunde ergibt, dass die Behandlung von Stammzellkulturen oder Kulturen aus embryonalem Gewebe *in vitro* mit einem Cocktail aus IL1, IL11, LIF und GDNF zu einer deutlichen und signifikanten Differenzierung zu Neuronen, insbesondere TH-positiven Neuronen führt. Deshalb wurden die CSM14.1-Zellen mit diesem Cocktail *in vitro* behandelt und auf TH-Hochregulierung getestet.

## **1.2 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Um weitere Informationen zum Expressionsmuster spezieller neuronaler Proteine in CSM14.1-Zellen unter Kultivierung bei nicht permissiver im Vergleich zu permissiver

Temperatur und in unterschiedlichen Kulturmedien zu erhalten, sollen mittels Western Blots und immunzytochemischen Untersuchungen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie verändert sich das Expressionsmuster verschiedener neuronaler Proteine bei Kultivierung der CSM14.1-Zellen bei permissiver Temperatur (33° C) und Serumreduktion (1% FCS)?
2. Welchen Einfluß haben die Zytokine auf die Expression neuronaler Proteine bei Kultivierung der Zellen in permissiver Temperatur (33° C) und nicht permissiver Temperatur (39° C) unter Serumreduktion (1% FCS)?
3. Welchen Einfluß haben Zytokine auf die Morphologie der Zellen bei Kultivierung in nicht permissiver Temperatur (39° C) und Serumreduktion (1% FCS)?

## **2. Untersuchte Proteine**

### **2.1 Intermediärfilamente**

Diese Proteine haben eine filamentöse Form und einen Durchmesser von 8-12 nm. Obwohl die Intermediärefilamente (IF) in jeder eukaryoten Zelle nachgewiesen werden können, sind sie für das Überleben der Zellen nicht direkt notwendig. Zusammen mit Aktinfilamenten und Mikrotubuli bilden sie das Zytoskelett und sind zelltypspezifisch. Nach Duprey und Paulin (1995) lassen sich die IFs in fünf Klassen unterteilen. IF der Klassen I und II sind saure und neutrale Zytokeratine, die in fast allen epithelialen Zellen vorhanden sind. Zur Klasse III werden folgende Proteine gezählt: glial fibrillary acidic protein (GFAP) in Astrozyten, Desmin und Synemin in Muskelzellen, Peripherin spezifisch sowohl für peripheres Nervensystem als auch für einige Neurone des Zentralnervensystemes und Vimentin in allen mesenchymalen Geweben. Vimentin kommt auch in verschiedenen Zelltypen temporär während der Entwicklung vor, z.B. in Neuronen, in Zellen mesenchymalen Ursprungs (z.B. Fibroblasten), in unreifen Gliazellen und in Astrozyten. Zur Klasse IV der Intermediärefilamente gehören Neurofilamente und Internexin, die in reifen Neuronen nachweisbar sind. Lamine A, B, C und Nestin sind Klasse V der IF. Lamine A, B und C gehören zu den Nuklearproteinen der inneren Kernmembran und sind in fast allen Zelltypen vorhanden. Nestin kommt in neuronalen und muskulären Progenitorzellen vor. Duprey und Paulin (1995) zählen zu der letzten Gruppe: „noch andere nicht klassifizierte“ Intermediärfilamente wie z.B. Filensin und Phalakinin. Yuan et al.

(1997) zählen auch Transitin zu dieser Gruppe. Transitin ist ein Protein, das von radialer Glia transitorisch während der ZNS-Entwicklung exprimiert wird.

### 2.1.1 Nestin

Nestin (neuronal stem cell protein) ist ein intermediäres Filament-Protein, eng assoziiert mit schnell proliferierenden Progenitorzellen während der Neuro- und Myogenese. Es ist ein bekannter Proteinmarker für immature Neurone und wird diffus im ZNS exprimiert (Frederiksen und McKay 1988; Lendahl et al. 1990; Dahlstrand et al. 1992). Im Western Blot wird Nestin bei 200 kDa detektiert (Frederiksen et al. 1988). Nestin ist auch in immaturen Astrozyten (Frederiksen and McKay 1988; Lendahl et al. 1990; Dahlstrand et al. 1992, 1995; Zimmerman et al. 1994; Johe et al. 1996; Messam et al. 2000) und immaturen Oligodendrozyten (Gallo and Armstrong 1994) nachgewiesen. Die Expression von Nestin wird *in vitro* und *in vivo* in differenzierenden neuronalen und glialen Zellen stark herunterreguliert (White et al. 1994; Lin et al. 1995; Seidman et al. 1997; Haas und Wree 2002). Über seine Funktion existieren noch keine eindeutigen Befunde (Matsuda et al. 1996; Miyaguchi, 1997; Cheng et al. 1999). Im Vergleich zu den anderen IF kann Nestin allein keine Filamente aufbauen. Die Ursache dafür ist vermutlich das sehr kurze N-terminale Ende, das von großer Bedeutung für die Formation von Filamenten ist (Fuchs und Weber 1994; Herrmann und Aebi 2000). Aber Nestin ist Kopolymer mit Klasse III IF-Proteinen wie Vimentin und reguliert ihre strukturellen Veränderungen und ihren Aufbau (Marvin et al. 1998; Eliasson et al. 1999; Steinert et al. 1999; Chou et al. 2003).

Nestin ist ein zuverlässiger Marker für die Identifikation von neuronalen Stammzellen (bei Nagetieren) in verschiedenen Teilen des Gehirns und in immortalisierten Progenitorzelllinien (Frederiksen et al. 1988; Cattaneo und McKay 1990; Redies et al. 1991; Renfranz et al. 1991; Valtz et al. 1991). Nestin-immunreaktive Gebiete befinden sich auch im adulten Gehirn, jedoch nur in solchen Regionen, in denen postnatal noch Neuro- und Gliogenese gefunden werden können, wie z.B. im Hippokampus (Cameron und McKay 1998). In diesen Regionen sind proliferierende Stammzellen vorhanden. Lokalisiert ist das filamentöse Nestin im Zytoplasma, besonders stark perinukleär, und in den kurzen Ausläufern der Stammzellen. Die Kerne sind dabei ausgespart.

### **2.1.2 GFAP (glial fibrillary acid protein)**

GFAP gehört zu den IF-Proteinen der Astroglia und ist ein Klasse III IF. GFAP wurde zum ersten Mal aus weißen Plaques von Patienten mit Multipler Sklerose isoliert (Eng und Rubinstein, 1978) und seitdem als weit verbreiteter Proteinmarker für normale und maligne Astrozyten verwendet (Deck et al. 1978; De Armond et al. 1980; Pekny et al. 1999; Eliasson et al. 1999; Rodriguez et al. 2001). Es ist das kleinste IF (8 nm) mit einem Molekulargewicht von ~ 50 kDa. Es wird als spezifisch für das Zytoskelett von Astrozyten (Duffy 1982; Reeves et al. 1989; Inagaki et al. 1994; Zhang 2001) und von Ependymzellen angesehen und ist perinukleär und in Ausläufern verteilt (Duffy 1982; Rutka et al. 1997; Gomes et al. 1999). Interessant ist, dass mit zunehmendem malignem Potenzial der Astrozyten die Synthese von GFAP progressiv abnimmt (Eng und Rubinstein 1978, Eng und Ghirnikar 1994; Duffy 1982). Immature Oligodendrozyten und immature Choroidplexuszellen können ebenfalls GFAP-positiv sein (Jagadha et al. 1986; Dyer et al. 2000; Jalabi et al. 2003; Azzarelli et al. 2004).

Während der Myelinisierung kann eine starke Zunahme der GFAP-Expression nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit zeigen Mäuse mit einem GFAP-Defekt Defizite in der Myelinisierung (Pekny et al. 1999; Liedtke et al. 1996; Brenner et al. 2001; Shiroma et al. 2001).

### **2.2 Mikrotubulus-assoziierte Proteine**

Mikrotubuli sind zusammen mit Aktin-Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten am Aufbau des Zytoskeletts einer eukaryoten Zelle beteiligt, die in großer Anzahl besonders in den Neuronen und ihren Fortsätzen vorhanden sind (Matus 1990; Ma et al. 2000). Mikrotubuli sind beim Aufbau der Mitose-Spindel von elementarer Bedeutung und wirken u.a. bei intrazellulären Transportvorgängen mit.

Der Außendurchmesser der stäbchenförmigen Mikrotubuli beträgt 25 nm. Mikrotubuli werden durch Polymerisation aus Dimeren  $\alpha/\beta$  Tubulineinheiten gebildet. Die Mikrotubuluswand besteht aus 13 longitudinal angeordneten Reihen (Protofilamente), die um einen zentralen Hohlkörper angeordnet sind. Die Protofilamente sind so gegeneinander versetzt, dass die Wand aus abwechselnd angeordneten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Molekülen aufgebaut ist. Die Bildung von Mikrotubuli steht in einem Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation, was als „dynamische Instabilität“ bezeichnet wird (Kirschner und Mitchison 1986).



Die Mikrotubuli sind parallel zueinander in den Nervenzellfortsätzen und zur Plasmamembran angeordnet. Sie stehen untereinander über unterschiedliche molekulare Brücken in Verbindung. Mikrotubuli sind die ersten zytoskelettalen Komponenten, die während der Entwicklung in den Neuriten erscheinen (Bernhardt und Matus 1984; Wang et al. 1998) und treten noch vor den Neurofilamenten auf.

Mikrotubuli bestehen neben Tubulin aus Motorproteinen und strukturgebenden Proteinen, die unter dem Begriff Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP) zusammengefasst werden. MAPs dienen zum einen der Stabilisierung der Mikrotubuli, zum anderen vermitteln sie die Wechselwirkung der Mikrotubuli mit anderen Zellbestandteilen (Cáceres et al. 1984; Matus 1988, 1990; Tucker 1990; Boyne et al. 1995; Nothias et al. 1996; Ramón-Cueto und Avila 1999).

Die MAPs werden mit zahlreichen Synonymen bezeichnet, und die Einteilung in unterschiedliche Klassen wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich vorgenommen (Matus 1988; Tucker 1990; Riederer 1995). Sie werden meist in Klassen MAP1-5 eingeteilt, in einigen Klassen werden weitere Unterklassen differenziert bzw. phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Formen unterschieden (Shea und Beermann 1994). Allgemein werden die MAPs in hochmolekulare (180-350 kDa – MAP1a, MAP2, MAP3, MAP4, MAP5) und Tau (55- 68 kDa) Proteine eingeteilt.

In der Embryonalentwicklung des Gehirns werden frühe und späte MAPs unterschieden. Unterschiede liegen in ihrer Anzahl, molekularen Form und ihren biochemischen Eigenschaften. Die ersten, die in sich entwickelnden neuronalen Zellen erscheinen, sind MAP5 (=MAP1b, =MAP1x, =MAP1.2), später werden sie durch MAP1, MAP2a, MAP2b ersetzt.

Weitere MAPs sind MAP1c (= Kinesin, Dynein), MAP3 und MAP4. Dyneine und Kinesine sind zwei Motor-Proteine, die am intrazellulären Transport von Proteinen oder Zellorganellen beteiligt sind. MAP3 ist ein Polypeptidpaar mit einem Molekulargewicht von 180 kDa. Es werden MAP3a und 3b unterschieden. MAP4 besteht ebenfalls aus einer Gruppe von Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von ca. 210 kDa.

Die MAPs spielen eine wichtige Rolle in der neuronalen Morphogenese (Hirokawa 1994; Hirokawa et al., 1996). Die unterschiedlichen MAPs werden in ZNS und PNS exprimiert. MAP5 und MAP2 sind als neurale MAPs bekannt. MAP5 lässt sich in allen Abschnitten von Neuronen während der früher neuronalen Entwicklung nachweisen

(Tucker 1990). MAP2 ist in allen Stadien in Perikarya und Dendriten von Neuronen nachweisbar (Sanchez et al. 2000). Axonale und dendritische Mikrotubuli enthalten unterschiedliche MAPs (Cáceres et al. 1986; Matus 1988; Sims et al. 1988; Tucker 1990; Riederer 1995). In Astrozyten des adulten Gehirns lassen sich MAP3 und MAP4, wenn auch in geringen Konzentrationen, nachweisen.

### **2.2.1 MAP2**

MAP2 ist das meist untersuchte Protein, das zur MAP-Familie gehört. Es hat drei Isoformen: MAP2a und MAP2b sind Proteine mit einem Molekulargewicht von 280 kDa und MAP2c mit einem Gewicht von 70 kDa. MAP2c ist in den Zellkörpern, Dendriten und Axonen unreifer Neurone lokalisiert. MAP2a und MAP2b findet man hauptsächlich in den Dendriten reifender und reifer Neurone (Cáceres et al. 1984, 1986; Huber und Matus 1984; Bernhardt und Matus 1984; Shaw et al. 1985; Fischer et al. 1986; Higgins et al. 1988; Sims et al. 1988; Sato-Yoshitake et al. 1989; Tucker 1990; Pennypacker et al. 1991; Boyne et al. 1995; Honig et al. 1996; Wang et al. 1998; Noraberg et al. 1999, Sanchez et al. 2000). MAP2b ist das erste Protein, das während der Neuronalentwicklung exprimiert wird, danach wird es von MAP2a ersetzt (Tucker 1990).

MAP2 stabilisiert die Mikrotubuli und reguliert ihre mechanischen Eigenschaften (Matus 1988, 1990; Mickey und Howard 1995; Illenberger et al. 1996; Felgner et al. 1997), ihre Organisation (Chen et al. 1992; Umeyama et al. 1993) und ihre Wechselwirkung mit motorischen Proteinen (Ebner et al. 1999; Trinczek et al. 1999) und mit anderen Mikrotubulus-assoziierten Proteinen (Schoenfeld und Obar 1994). Gemeinsam mit Tau wird das MAP2 für die Erhaltung der neuronalen Polarität benötigt.

Im Kortex von embryonalen Mäusen wurde MAP2 ab dem 14. Entwicklungstag nachgewiesen und nimmt dann mit zunehmendem Alter zu (Crandall et al. 1986). Die Expression von MAP2 verhält sich proportional zum Grad der Differenzierung und variiert mit dem Ausmaß der neuronalen Reifung (Sims et al. 1988).

### **2.2.2 MAP5**

Mikrotubulus-assoziiertes Protein 5 (MAP5), bekannt auch als MAP1.2, MAP1x oder MAP1b (Matus 1988; Tucker 1990; Bloom und Endow 1995), ist ein hochmolekulares Protein mit einem Gewicht von ~320 kDa. Eine Differenzierung von MAP5 in MAP5a

(phosphorylierte Form) und MAP5b (nicht-phosphorylierte Form) ist zusätzlich möglich (Black et al. 1994). Ma et al. (2000) beschreiben und charakterisieren zwei Isoformen des phosphorylierten MAP5a, die in den Axonen des PNS vorhanden sind und in Western Blots als zwei Proteinbänder von 320 und 340 kDa nachgewiesen werden können.

MAP5 kommt hauptsächlich im neuronalen Zytoskelett vor. Es ist notwendig für die Entwicklung der Axone und Dendriten (Hummel et al. 2000; Roos und Kelly 2000). Besonders in den Neuronen, die ihre Axone bilden, wird es stark exprimiert, weil es die Mikrotubuli verbindet und stabilisiert (Mitchison und Kirschner 1988; Bradke und Dotti 1987; Dotti et al. 1998).

Da MAP5 in unreifen Neuronen während des Axonenwachstums am höchsten exprimiert wird (Calvert und Anderton 1985; Garner et al. 1990; Fischer et al. 1991; Ulloa et al. 1993a, b; Black et al. 1994; DiTella et al. 1996; Gordon-Weeks und Fischer 2000; Gonzalez-Billault et al. 2001), nimmt man an, dass MAP5 in der neuronalen Morphogenese und im Nervenwachstum eine entscheidende Rolle spielt. In unreifen Neuronen ist die bevorzugte Bildungsstelle von MAP5 an den distalen Mikrotubuli des Axons und der Growth cone- Region lokalisiert (Black et al. 1994; DiTella et al. 1996).

Histologische Untersuchungen ergaben, dass in MAP5-defizienten Mäusen das Corpus callosum nicht gebildet wurde und die Ventrikel vergrößert waren, die Myelinisierung aufgehalten, die Axone kleiner und eine Desorganisation der Gehirnschichten beobachtet wurde (Edelmann et al. 1996; Takei et al. 1997, 2000; Gonzalez-Billault et al. 2001; Meixner et al. 2000). Diese Mäuse und alle daraus stammenden MAP5-defizienten Ziellinien bieten einen interessanten Ausgangspunkt, die Funktion von MAP5 weiter aufzuklären, insbesondere hinsichtlich einer Beteiligung an Nervenwachstum, Axonführung, Synaptogenese oder Zellwanderung und zur Erklärung seiner Funktionsweise durch Wechselwirkungen mit anderen Genprodukten. Einige Studien beschreiben die Verbindung von MAP5 mit Aktin-Filamenten *in vitro* (Pedrotti und Islam 1996) und mit Stressfasern *in vivo* (Tögel et al. 1998). Andere Befunde weisen darauf hin, dass einige MAP5 Proteine an der Plasmamembran von Neuronen exprimiert werden und somit für eine Wechselwirkung zwischen MAP5 und Myelin-assoziierten Glykoproteinen bei der Myelinisierung sprechen (Takei et al. 1997; Meixner et al. 2000; Tanner et al. 2000; Franzen et al. 2001). Zusammen mit Tau reguliert MAP5 die neuronale Migration, ein sehr wichtiges Ereignis in der

Entwicklung des Nervensystems (Takei et al. 2000; Teng et al. 2001). MAP5 wurde auch in den Oligodendrozyten, in Zellkörpern und Fortsätzen, zusammen mit Tubulin nachgewiesen (Fischer et al. 1990).

MAP5 ist der früheste Marker, der neuronale Progenitorzellen identifiziert, die nach der nächsten mitotischen Teilung zu Neuronen werden (Cheng et al. 1999). Die Färbungen zeigen eine diffuse Verteilung von MAP5 im Zytoplasma, wobei verschiedene Organellen ungefärbt verbleiben (Riederer 1995). Bei den von Riederer (1995) zur Untersuchung der Entwicklung von MAP5 in Katzenshirnen verwendeten Antikörpern werden Färbungen in allen Teilen der Neurone gefunden, einschließlich struktureller Elemente im Nukleus und punktförmiger, matrixähnlicher Elemente um die Nukleoli. Die Nukleoli selbst sind dabei nicht gefärbt. Diese Beobachtungen wurden in juvenilen und adulten Neuronen gemacht. Ein anderer Antikörper in der Untersuchung von Riederer (1995) zeigt eine diffuse Kernfärbung. Dabei sind der perinukleäre Raum, nicht jedoch die strukturellen Elemente des Kernes gefärbt. Bei dem von Riederer (1995) in einer ähnlichen Studie verwendeten Antikörper konnten keine Kernfärbungen festgestellt werden.

### **2.3 Neuronenspezifische Enolase (NSE)**

NSE ist ein glykolytisches Enzym, typisch für Neurone und neuroendokrine Zellen. Es gehört zur Familie der Enolase. Die Enolase, ein Enzym der Glykolyse, konvertiert 2-Phospho-D-Glyzerat in Phosphoenolpyruvat (Grasso et al. 1977; Trapp et al. 1981; Ledig et al. 1982; Vinore et al. 1986, 1987; Cooper 1994; Hattori et al. 1995; Deloulme et al. 1996; Nogami et al. 1998). Es existiert in Form verschiedener Isoenzyme, die aus unterschiedlichen Kombinationen der Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  aufgebaut sind. Die  $\gamma\gamma$  und  $\alpha\gamma$  Isoenzyme bezeichnet man als Neuronenspezifische Enolase (Marangos et al. 1979, 1987). Das  $\gamma\gamma$  Isoenzym kommt ausschließlich in Neuronen vor. Die  $\alpha$ -Untereinheit kommt in Gliazellen und zahlreichen weiteren nicht-neuronalen Zellen, z.B. der Leber vor, die  $\beta$ -Untereinheit im Muskelgewebe. NSE wurde auch in Thrombozyten und Erythrozyten nachgewiesen (Marangos et al. 1980; Day und Thompson 1984). Das Vorkommen von NSE kann zur Identifizierung von Neuronen (Marangos et al. 1980; Trapp et al. 1981) und auch als Index für neuronale Differenzierung genutzt werden (Shinohara et al. 1986; Rabecac et al. 1994; Nogami et al. 1998). NSE spielt auch eine wichtige Rolle für die Differenzierung der Oligodendrozyten und ist herunterreguliert in muren Zellen (Deloulme et al. 1996).

Einige Autoren konnten mittels Western Blot sowie im Northern Blot NSE bzw. die mRNA in kultivierten glialen Zellen (Astrozyten, Oligodendrozyten) und meningealen Fibroblasten nachweisen (Deloulme et al. 1996, 1997; Sensenbrenner et al. 1997). *In vivo* stellen sich differenzierende Oligodendrozyten in jungen Ratten (P8) mit NSE-Antikörpern schwach dar, im adulten Rattengehirn ist der immunhistochemische Nachweis von NSE in Oligodendrozyten und Astrozyten nicht mehr möglich (Vinores et al. 1987; Deloulme et al. 1996). Vermutlich ist die Methode der Immunhistochemie zu wenig sensitiv, um hier die sehr geringen Konzentrationen an NSE aufzuzeigen (Deloulme et al. 1996, 1997). Neuronale Zellen in Kultur enthalten jedoch einen relativ hohen Anteil an NSE (Deloulme et al. 1997).

Der Anstieg der NSE-Expression korreliert mit der funktionellen und morphologischen Reifung von Neuronen (Marangos et al. 1980; Trapp et al. 1981; Rabejac et al. 1994; Hattori et al. 1995; Gasse und Meyer 1995; Deloulme et al. 1996; Bakardjiev 1997). Undifferenzierte, sich teilende neuronale Progenitoren in Kultur exprimieren nur geringe Mengen an NSE. Mit Beginn der Differenzierung teilen sich die Zellen nicht mehr und die Intensität der Immunreaktivität für NSE nimmt zu. Die Intensität kann von Zelle zu Zelle variieren (Trapp et al. 1981; White et al. 1994; Gasse und Meyer 1995). Mittels Western Blots wurde eine zunehmende Expression von NSE bei differenzierenden immortalisierten Stammzellen der Linie CSM 14.1 nachgewiesen (Haas und Wree 2002).

NSE ist in Perikarya und Ausläufern immunzytochemisch nachweisbar (Trapp et al. 1981; Vinores et al. 1987; Rabejac et al. 1994; Gasse und Meyer 1995; Deloulme et al. 1996; Nogami et al. 1998). Im Soma ist NSE diffus verteilt (Hattori et al. 1995; Deloulme et al. 1996).

## **2.4 Neuronenspezifisches Kernprotein (NeuN)**

NeuN ist ein 46-48 kDa Kernprotein, das für die Identifikation postmitotischer Neurone in Diagnostik und Forschung benutzt wird. Es wird von Neuronen in allen Regionen des Gehirns, der Medulla spinalis und des peripheren Nervensystems exprimiert (Mullen et al. 1992; Wolf et al. 1996; Sarnat et al. 1998; Todd et al. 1998). Aber nicht alle Zellen zeigen die gleiche Stärke der Immunreaktivität. Cajal-Retzius Neurone, Purkinjezellen, Neurone des Nucleus olivaris inferior und dentatus und die Zellen der sympathischen Ganglien sind NeuN-negativ (Sarnat et al. 1998). Im Cerebellum der adulten Maus sind nur Körnerzellen und kleine Zellpopulationen in der

unteren Molekularschicht NeuN-positiv (Weyer und Schilling 2003). Der Grund für das Fehlen der Immunreaktivität in diesen Neuronen ist nicht bekannt (Sarnat et al. 1998; Todd et al. 1998). Nicht-neuronale Strukturen zeigen keine Reaktionen mit NeuN-Antikörpern, weder im undifferenzierten noch im reifen Zustand (Mullen et al. 1992; Wolf et al. 1996; Sarnat et al. 1998; Todd et al. 1998). Die Immunreaktivität ist schon früh während der Entwicklung und noch im adulten Hirn ausgeprägt (Mullen et al. 1992; Sarnat et al. 1998). Die Stärke der Immunreaktivität charakterisiert den physiologischen Reifestatus postmitotischer Neurone (Mullen et al. 1992; Wolf et al. 1996; Sarnat et al. 1998; Weyer und Schilling 2003). Denn NeuN färbt Kerne unreifer Nervenzellen nicht bis sie ein Stadium der Entwicklung erreicht haben, in dem sie die ersten Kriterien der Differenzierung erfüllt haben (Sarnat et al. 1998).

NeuN befindet sich hauptsächlich in Zellkernen, kann aber auch im Zytoplasma der neuronalen Perikarya vorkommen (Mullen et al. 1992; Wolf et al. 1996; Todd et al. 1998). Dieses Muster variiert: es können nur das Zytoplasma oder der Nucleus, mit Ausnahme des Nucleolus intensiv gefärbt werden, während das Zytoplasma nur wenig Reaktion zeigt (Mullen et al. 1992). Die unterschiedliche Immunreaktivität ist von den verwendeten Antikörpern und von den untersuchten Neuronentypen abhängig. Von einigen Autoren wird eine NeuN-Färbung bis in die proximalen neuronalen Ausläufer beschrieben (Mullen et al. 1992; Wolf et al. 1996).

## **2.5 Dopaminerge Differenzierung**

Dopaminerge (DA) Neurone sind eine heterogene Population von Zellen, die in Mesenzephalon, Hypothalamus, vorderem Thalamus, Bulbus olfactorius und Retina verteilt sind. Sie enthalten den Neurotransmitter Dopamin. In den Wirbeltieren sind die dopaminergen Neurone überwiegend in der Substantia nigra pars compacta und der ventralen tegmental Area lokalisiert. Sie bilden die nigrostriatalen und mesokortikolimbischen Bahnen, die eine zentrale Bedeutung bei der motorischen Kontrolle, der Kognition und Emotionen haben (Perrone-Capano und di Porzio 1996). Die DA-Neurone der Substantia nigra, die zum Striatum projizieren, regulieren die Motorik, und ihre Degeneration führt zum Morbus Parkinson (Lindvall et al. 1984; Björklund et al. 1997; Hirsch et al. 1988). Die dopaminergen Neurone aus der ventralen tegmental Area projizieren zum Kortex und zum limbischen System und regulieren u.a. Emotionen und Motivationen (Self et al. 1995). Eine Störung dieses Systems kann mit Schizophrenie und Abhängigkeitserkrankungen assoziiert sein (Ritz

et al. 1987; Koob und Nestler 1997; Seeman et al. 1997). Bei diesen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen der mesenzephalen dopaminergen Bahnen sind Transplantationen der embryonalen dopaminergen Neurone erfolgversprechend (Dunnett et al. 2001).

Die Entwicklung mesenzephaler DA-Neurone steht hauptsächlich unter dem Einfluss zweier Moleküle, nämlich dem sonic hedgehog (Shh) und dem basischen Fibroblastenwachstumsfaktor 8 (FGF8). Shh wird in der ventralen neuralen Tube und FGF8 in der Mesenzephalon-Rhombenzephalon-Grenze und in dem rostralen Prosenzephalon exprimiert (Ericson et al. 1995; Wang et al. 1995; Crossley et al. 1996; Ye et al. 1998).

Die zwei obengenannten Faktoren sind die Transkriptionsfaktoren, die für die Bildung des nukleären Retinsäurerezeptors Nurr1 (nuclear retinoic acid receptor 1) (Law et al. 1992; Zetterstrom et al. 1997) und des Homeobox Gens Ptx3/Pitx3 (Semina et al. 1997 und 1998; Smidt et al. 1997; Nunes et al. 2003) notwendig sind. In Ptx3-defizienten Mäusen entwickeln sich DA-Neurone in der Substantia nigra nicht (Nunes et al. 2003), und in Nurr1-defizienten Mäuse findet keine Reifung von DA-Precursor-Zellen im Mesenzephalon statt (Zetterstrom et al. 1996b; Saucedo-Cardenas et al. 1998; Le et al. 1999; Wallen et al. 1999).

### **2.5.1 Nurr1**

Der nukleäre Retinsäurerezeptor Nurr1 (nuclear retinoic acid receptor 1) gehört zur steroiden und thyroiden Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren. Nurr1 wird im embryonalen und postnatalen Rattegehirn (Castillo et al. 1998), und hier im limbischen System und ventralen Mesenzephalon, einschließlich der DA-Neurone, exprimiert (Zetterstrom et al. 1996a,b; Saucedo-Cardenas und Conneely 1996). Die Expression beginnt am Embryonaltag (E) 10,5 in der ventralen mesenzephalischen Flexur (Zetterstrom et al. 1996a, b), bevor die Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) an E11,5 beginnt.

Nurr1 reguliert direkt die Transkription des TH-Gen-Promotors. Die Bindungsstelle (TH-NBRE1) liegt in der proximalen Region des TH-Promotors (Iwawaki et al. 2000). Nurr1 reguliert die Entwicklung der DA-Neurone und fördert das Überleben der ventralen mesenzephalen Neurone und ihre Differenzierung zu DA-Neuronen (Saucedo-Cardenas et al. 1998; Iwawaki et al. 2000).

Im adulten Gehirn wird die Expression von Nurr1 fortgesetzt, obwohl die Entwicklung der DA-Neurone längst abgeschlossen ist (Le et al. 1999; Eells et al. 2002). Die verbleibende Expression von Nurr1 in den reifen DA-Neuronen deutet an, dass Nurr1 wichtig für deren normale Funktion ist. Außerdem reguliert Nurr1 die Transkription der Gene, die den Cocain-sensitiven Dopamin-Transporter (DAT) kodieren (Sacchetti et al. 1999, 2001). DAT ist ein Transportprotein der Plasmamembran, das das extrazelluläre Dopamin in die Zelle aufnehmen kann und somit ein spezifischer Marker für DA-Neurone ist.

Die Rolle von Nurr1 für das Überleben von Dopaminprogenitoren und differenzierten Neuronen durch die Regulation verschiedener Faktoren und Rezeptoren ist in Nurr1-defizienten Zellen untersucht worden. Durch ein Defizit von Nurr1 resultiert ein Verlust der Expression von c-ret, dem Tyrosinkinase-Signaltransduktionsrezeptor von GDNF (Saucedo-Cardenas et al. 1998; Wallen et al. 1999; Airaksinen und Saarma 2002) und der Bindungsstelle für Nurr1 im BDNF-Gen (Shintani et al. 1992).

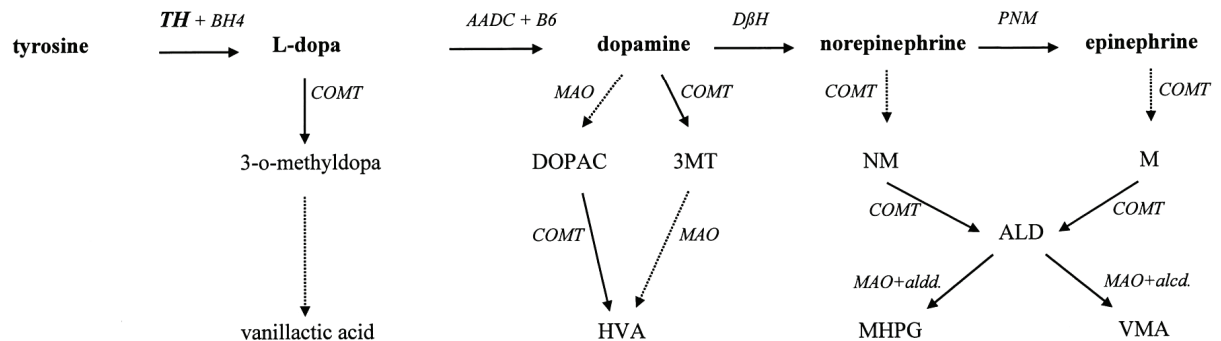
Die Differenzierung der immortalisierten Progenitorzelllinie CSM14.1 ist *in vitro* mit einer Hochregulierung von Nurr1 verbunden (Haas und Wree 2002). Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass in den nicht differenzierten CSM14.1-Zellen Nurr1 exprimiert wird und seine Konzentration in den ersten 3 Tagen der Differenzierung zunimmt. Danach nimmt die Expressionstärke ab, und die Konzentration ist nach 14 Tagen Differenzierung niedriger als in den undifferenzierten Zellen. Die Expression von Nurr1 in den Stammzellen fördert ihre Differenzierung und Reifung zu DA-Neuronen (Wagner et al. 1999; Kim et al. 2002, 2003; Volpicelli et al. 2004).

Die Funktion von Nurr1 ist nicht nur auf die Bildung, die Differenzierung und die Protektion von DA-Neuronen beschränkt. Eine „missense“ Mutation des Nurr1-Gen wurde bei der Schizophrenie und bipolaren Erkrankungen nachgewiesen (Buervenich et al. 2000). Ein Polymorphismus im Intron 6 des Nurr1-Gens beim Menschen ist mit Morbus Parkinson assoziiert (Xu et al. 2002). Und im Mesenzephalon von Kokainabhängigen ist Nurr1 herunterreguliert (Bannon et al. 2004).

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

Katecholamine werden aus dem gemeinsamen Prekursor Tyrosin synthetisiert. Aus Tyrosin wird DOPA, das dazu notwendige Enzym ist die Tyrosinhydroxylase (TH).





**Abb. 1:** Wege des Katecholamin-Stoffwechsels

TH: Tyrosinhydroxylase; AADC: aromatic L-amino acid decarboxylase; DβH: dopamine β-hydroxylase; PNM: phenylethanolamine N-methyltransferase; COMT: catechol-O-methyl transferase; MAO: monoamine oxidase; DOPAC: 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; 3MT: 3-O-methyldopa; HVA: homovanillic acid; NM: normetanephrin; M: metanephrin; ALD: aromatic amino-acid decarboxylase; MHPG: 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol ; VMA: vanillylmandelic acid (www.web.indstate.edu)

TH ist das „rate-limiting“ Enzym bei der Synthese von Katecholaminen (Di Porzio et al. 1990), die die Hauptmediatoren in vielen physiologischen Funktionen des ZNS und des PNS sind (Nagatsu et al. 1964). Die Regulation von TH spielt daher eine sehr wichtige Rolle bei der Wirkung katecholaminerger Neurone (Kumer et al. 1996). Die Expression von TH beginnt bei der Ratte am Embryonaltag 11,5 in der intermediären Zone der neuralen Tube und in der sympathikoadrenergen Anlage, die ihren Ursprung von Neuralleistenzellen (neural crest cells) nimmt (Kalsbeek und Buijs 1992; Di Porzio et al. 1990; Zetterstrom et al. 1996a, b; Perrone-Capano und Di Porzio 1996). Die Expression von TH wurde auch im adulten Gehirn nachgewiesen, aber nur in bestimmten Gruppen von Neuronen: Substantia nigra pars compacta, der ventralen tegmental Area, den sympathischen Ganglien und der Glandula suprarenalis (Hökfelt et al. 1984; Zetterstrom et al. 1996a, b).

Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 60-68 kDa. Es setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen. TH läßt sich im Gehirn ausschließlich in Neuronen nachweisen (Takeshima et al. 1994; Andreeva et al. 1996). TH wird üblicherweise als Marker für dopaminerge Neurone verwendet (Andreeva et al. 1996; Cheung et al. 1997; Haas und Wree 2002).

TH-immunreaktive Neurone in Kultur treten in drei verschiedenen Formen auf: als bipolare ovale, multipolare und als tripolare pyramidale Zellen. Die tripolare Form kommt am häufigsten vor. TH-immunreaktive Neurone besitzen typischerweise zwei bis fünf dicke und gerade Primärausläufer, die sich nur spärlich baumartig aufzweigen (Cheung et al. 1997). Astroglia stimuliert die Entwicklung der TH-Expression und fördert die Differenzierung mesenzephaler, dopaminerges TH-immunreaktiver Neurone *in vitro* (Lieth et al. 1989). Immunhistochemische Färbungen mit Anti-TH stellen in der Regel das Zytoplasma und die Ausläufer der Neurone dar.

Die Untersuchung zu einer möglichen TH-Expression der CSM14.1-Zellen wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob sie eventuell für eine Transplantation bzw. eine Dopaminsubstitutionstherapie in einem tierexperimentellen Modell des Morbus Parkinson geeignet sein könnten (Haas und Wree 2002). Eine Zunahme von TH unter Differenzierungsbedingungen *in vitro* wurde mittels Western Blots nachgewiesen, aber immunzytochemisch konnte TH nicht detektiert werden. *In vivo* wurde eine Expression von TH in transplantierten CSM14.1-Zellen immunhistochemisch innerhalb der degenerierten Substantia nigra pars compacta auf der läsionierten Seite nach der Transplantation wie auch entlang und zwischen den dopaminergen Neuronen auf der kontralateralen intakten Seite nachgewiesen (Petrov et al. 2004).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Zellkultur

Zur Kultur wurden CSM14.1-Zellen im Tiefkühlschrank bei -150° C gelagert. Sie wurden unter warmem Wasser aufgetaut und in Gewebekultur-Petrischalen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) in gesättigter Wasserdampfatmosphäre in 5% CO<sub>2</sub> / 95% Luft bei 33° C inkubiert. Die Kultivierung erfolgte in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, angereichert mit Glutamax, 1000 mg/L D-Glukose, Natriumpyruvat; Gibco) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, Gibco) und 10 U/ml Penicillin, 10 µl/ml Streptomycin (Gibco). Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Nach drei Tagen wurden die konfluenten Zellkulturen mittels Trypsin (Gibco) dissoziiert und zentrifugiert (10 min, 600 rpm) (Labofuge 200, Haereus, Osterode, Deutschland). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wieder in Nährmedium resuspendiert. Nach drei Passagen (die Zellen wurden jeden dritten Tag passagiert) wurden die Zellen für weitere Kultivierungen und Analysen der Differenzierung unter verschiedenen Bedingungen eingesät:

- auf Poly-L-Lysin-beschichteten (5 g auf 50 ml H<sub>2</sub>O, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) Falcon-Kulturobjektträgern (Fischer Scientific, Schwerte, Deutschland),
- in Multidish 24 Wells (Nunc/Delta Si, Dänemark) mit eingelegten, Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen und
- in Petrischalen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland).

Für die histologische Färbung mit Kresylviolettacetat (Sigma) und für die immunzytochemische Darstellung verschiedener Proteine wurden die suspendierten Zellen zuerst gezählt und in DMEM + 10% FCS so verdünnt, dass die Konzentration der Zellen ~2000 Zellen pro 1 ml betrug. In jede Kammer der Multidish 24 Wells wurde 1 ml der Zellsuspension eingebracht.

Für Western Blots wurden andere Zellsuspensionen vorbereitet. Nach der Zellzählung wurden die Zellen in DMEM + 10% FCS so weit verdünnt, dass 2 ml Medium 500000 Zellen enthielten. Die vorbereiteten Petrischalen für die verschiedenen Experimente wurden mit 8 ml DMEM + 10% FCS gefüllt und ihnen dann 2 ml der Zellsuspension hinzugefügt (10 ml DMEM + 10% FCS enthielten 500000 Zellen). Die Zellkulturen wurden über Nacht bei 33° C kultiviert, um ein Anheften der Zellen auf dem Substrat zu gewährleisten. Danach erfolgte die Behandlung der Zellkulturen mit unterschiedlichen Medien (10% oder 1% FCS) ohne (-) oder mit (+) Zusatz des

Zytokincocktails bei permissiver (33° C) oder bei nicht permissiver Temperatur (39° C):

	Temperatur	Kulturdauer	FCS	Zytokincocktail
1.	33° C	2d	10%	-
2.	33° C	3d	1%	-
3.	33° C	7d	1%	-
4.	33° C	10d	1%	-
5.	33° C	14d	1%	-
6.	33° C	3d	1%	+
7.	33° C	7d	1%	+
8.	33° C	10d	1%	+
9.	33° C	14d	1%	+
10.	39° C	3d	1%	-
11.	39° C	7d	1%	-
12.	39° C	10d	1%	-
13.	39° C	14d	1%	-
14.	39° C	3d	1%	+
15.	39° C	7d	1%	+
16.	39° C	10d	1%	+
17.	39° C	14d	1%	+

### 3.1.1 Behandlung mit DMEM + 10% FCS, Kontrollmedium

Die Stammzellen brauchen für ihre Vermehrung ein Medium, das reich an Nährstoffen und frei von Bakterien und anderen schädlichen Substanzen ist. Deshalb werden verschiedene Medien produziert, die den Bedürfnissen unterschiedlicher Stammzelllinien entsprechen. Das Ziel dabei ist, eine möglichst große Menge der Stammzellen, und gleichzeitig deren Eigenschaften als Stammzellen zu erhalten.

Das Kontrollmedium DMEM (Gibco), angereichert mit D-Glucose und Glutamin, ist ein Kulturmedium, das standardmäßig eingesetzt werden kann. Als Antibiotikum bzw. Antimykotikum werden dem Medium 10 U/ml Penicillin und 10 µl/ml Streptomycin (beides von Gibco) zugesetzt. Ein optimales Wachstum kann aber nur erreicht werden, wenn dem als Grundlage verwendeten Medium DMEM ein Serum zugesetzt wird, in diesem Fall 10% fetales Kälberserum. Fetales bovines Serum (FBS; Synonyme: FCS,

FKS) ist heute ein unverzichtbares Supplement in Zellkultursystemen. Seren bestehen als Naturprodukte aus einer großen Anzahl bekannter, aber auch unbekannter Inhaltsstoffe, deren Konzentration und Zusammensetzung schwankt. Sie enthalten z.B. Hormone, Bindungsproteine, Anheftungsfaktoren und Aminosäuren. Die in dieser Studie verwendeten Seren entstammen alle derselben Charge- Nummer (Gibco).

CSM14.1-Zellen, die zwei Tage unter permissiven Kulturbedingungen kultiviert wurden, wurden als Kontrollen bei 33° C + 10% FCS gewonnen, da sie schon konfluent waren. Für die Nissl-Färbung und Immunzytochemie wurden alle Kulturen wie folgt aufgearbeitet: Nach der Spülung mit 0,1 M Phosphatpuffer (PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,27 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und auf pH 7,4 eingestellt, alle Reagenzien von Serva, Heidelberg, Deutschland) wurden die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 4% Paraformaldehyd (PFA, in PBS, Serva) fixiert.

Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden auch Proben für Western Blots vorbereitet. Das Medium wurde aus den Petrischalen abgesaugt und die Proben mit PBS gespült, um tote Zellen zu entfernen. Dann wurden die Kulturen für 20 min mit Trypsin-Lösung im Brutschrank (33° C) inkubiert, um die Zellen vom Petrischalenboden abzulösen. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Vor dem Zentrifugieren (10 min 600 rpm) wurden die Zellen mehrfach trituriert. Danach wurde der Überstand abgenommen und das restliche Trypsin durch die Zugabe von DMEM + 10% FCS neutralisiert und die Zellen gleichzeitig resuspendiert. Nach der Zellzählung wurden die Zellen erneut zentrifugiert (10 min 600 rpm), der Überstand abgenommen und die Zellen in PBS resuspendiert, so dass die Konzentration 1.000.000 Zellen/ 100 µl PBS betrug. Diese Zellsuspensionen wurden im Tiefkühlschrank bei -20° C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

### **3.1.2 Behandlung mit DMEM + 1% FCS**

Neuronale Stammzellen sind unreife Zellen des Zentralnervensystems und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus 1) sich zeitlebens zu teilen, 2) sich selbst zu erneuern und 3) reife Nerven- und Gliazellen hervorzubringen. Sie benötigen bestimmte Bedingungen, bei denen sie sich differenzieren können. Für unsere temperatursensitiv immortalisierten mesenzephalen CSM14.1-Progenitorzellen (Durand et al. 1990) sind diese Bedingungen die Temperaturerhöhung auf 39° C und die Serumreduktion im Medium. Dieses serumreduzierte Medium wurde von Winkler et al. (1998) als

Differenzierungsmedium bezeichnet. Es enthält DMEM mit Glutamax und Glucose, Antibiotikum – 10 U/ml Penicillin, 10 µl/ml Streptomycin und nur 1% FCS.

Im Zellkulturmedium DMEM + 1% FCS wurden die Zellen bei 33° C oder bei 39° C bis zu 14 Tagen kultiviert. Alle Reagenzien für Zellkulturen wurden von Gibco Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Das Medium (ohne Zytokine) wurde jeden dritten Tag gewechselt. Die Proben wurden an den Kulturtagen 3, 7, 10 und 14 nach der Spülung mit PBS eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 4% PFA fixiert (für Nissl-Färbung und Immunzytochemie). Die Proben für die Western Blots wurden auch an den Tagen 3, 7, 10 und 14 gewonnen und (s.o.) aufgearbeitet.

### **3.1.3 Behandlung mit DMEM + 1% FCS + Zytokine**

Für die Wirkung der Zytokine auf die dopaminerge Differenzierung immortalisierter CSM14.1-Zellen sind keine Daten bekannt. Ling et al (1998) und Carvey et al (2001) untersuchten *in vitro* bei fetalen mesenzephalen Zellen, die aus 14,5 Tage alten Rattenembryonen gewonnen wurden, die Wirkung von 19 Zytokinen und deren Potenzial, einen DA-Phenotyp bei diesen Progenitorzellen zu induzieren. Sie fanden, dass nur die Interleukine  $1\alpha$  und  $\beta$  (IL1  $\alpha$ ,  $\beta$ ) die Expression des DA-Markers TH induzieren konnte. Und obwohl zahlreiche Zellen in den zytokinbehandelten Kulturen TH-positiv waren, zeigten sie nicht die Morphologie reifer TH-exprimierender Neurone. Die Zellen hatten kleine, runde Perikarya mit wenigen kurzen Ausläufern. Um die TH-Expression morphologisch zu festigen, untersuchten Ling et al. (1998) die Zusammenwirkung von verschiedenen Zytokinen, die das Überleben und die morphologische Entwicklung der mesenzephalen Progenitorzellkulturen beeinflussen, zusammen mit IL1 in einem Cocktail. Nach der Behandlung der Zellkulturen mit einem Zytokincocktail, der neben IL1 auch IL11, LIF (Leukemia inhibitory factor) und GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) enthielt, nahm die Menge der Zellen, die die Morphologie reifer TH-exprimierender Neurone zeigten und immunreaktiv für Dopa-Dekarboxylase, DA-Transporter (DAT) und DA waren, zu. Gleichzeitig wurde in den Zellkulturen auch die typische Morphologie dopaminerge Neurone beobachtet. Die Autoren erklärten diese Wirkung mit dem gemeinsamen Rezeptor gp130 von IL11 und LIF. IL1 induziert die Expression von gp130, und dann folgt eine Überstimulation durch die beiden Agonisten (IL11 und LIF). Diese „Überstimulation“ soll verantwortlich sein für die Differenzierung von neuronalen Progenitoren in TH-immunreaktive Neurone.

Entsprechend den Angaben von Ling et al. (1998), Potter et al. (1999) und Carvey et al. (2001) verwendeten wir einen Zytokincocktail zur dopaminergen Differenzierung folgender Zusammensetzung:

IL1 – 100 pg/ml

IL11 - 1 ng/ml

LIF - 1 ng/ml

GDNF - 10ng/ml

Das Zellkulturmedium DMEM + 1% FCS wurde mit dem Zytokincocktail versetzt und die Zellen bei 33° C oder bei 39° C bis zu 14 Tagen kultiviert. Kontrollkulturen wurden ohne Zytokine kultiviert. Das Medium ohne oder mit Zytokinen wurde jeden dritten Tag gewechselt. Die Proben wurden am Kulturtag 3, 7, 10 und 14 nach der Spülung mit PBS eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 4% PFA fixiert (für Nissl-Färbung und Immunzytochemie). Die Proben für die Western Blots wurden auch an den Tagen 3, 7, 10 und 14 gewonnen und, wie oben geschrieben wurde, aufgearbeitet.

### **3.2 Zellzahlbestimmung**

CSM14.1-Zellen wurden unter permissiven Kulturbedingungen (33° C, 10% FCS) auf Petrischalen (Greiner) kultiviert. Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt. Nach drei Passagen wurde die Zellzählung durchgeführt und die Proben für die Immunzytochemie und den Western Blot vorbereitet. Am Tag der Entnahme wurden die Kulturen mit PBS gespült und durch Trypsinierung (Gibco) vom Boden der Petrischalen abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden 10 min bei 400 g zentrifugiert (Labofuge 200, Haereus, Osterode, Deutschland), der Überstand abgenommen und die trypsinierten Zellsuspensionen mit DMEM + 10% FCS gewaschen. Zur Einstellung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt (1:1) und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Trypanblau ist ein Farbstoff, der nur in tote Zellen eindringen kann, so dass eine Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen möglich wird. Nur die nicht gefärbten, vitalen Zellen werden gezählt.

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Petrischalen für den Western Blot und die Multidish 24 für die Immunzytochemie vorbereitet. In die Multidish 24 wurden Kulturgläschen (10 mm Durchmesser) gelegt, die mit Poly-L-Lysin beschichtet waren. Nach 2 Stunden Trocknungszeit wurden die Zellen ausgesät. Die Zellzahl pro Kammer betrug ~ 2000 Zellen.

Die Zellen, die bei 33° C + 10% FCS kultiviert wurden, wurden nach 2 Tagen fixiert; bei allen Zellen, die in serumreduziertem Medium kultiviert wurden, erfolgte die Fixierung an Tag 3, 7, 10 oder 14. Am Tag der Entnahme wurde mit PBS gespült und mit 4% PFA fixiert.

Für die Untersuchungen mittels Western Blot wurde die Zellen in einer solchen Menge ausgesät, so dass die Kontrolle (33° C, 10% FCS) und die Proben an Tag 3, 7, 10 und 14 (33° C + 1% FCS; 39° C + 1% FCS ohne Zytokine, 39° C + 1% FCS mit Zytokinen) zum vorgesehenen Kulturende vergleichbare Zellzahlen enthielten. Dazu waren aufwendige Voruntersuchungen zum Wachstumsverhalten der Zellen notwendig, die hier nicht beschrieben werden sollen. Am Tag der Entnahme wurden die Zellen mit PBS gespült und durch Trypsinierung (Gibco) vom Boden der Petrischalen abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden 10 min bei 400 g zentrifugiert (Labofuge 200, Haereus, Osterode, Deutschland), der Überstand abgenommen und die trypsinisierten Zellsuspensionen mit DMEM + 10% FCS neutralisiert. Nach diesem Schritt wurde die Anzahl vitaler Zellen mit Trypanblau ermittelt, und es erfolgte wiederum eine Zentrifugation für 10 min bei 400 g, ein Abnehmen des Überstandes und schließlich die Zugabe von PBS, so dass 1000000 Zellen pro 100 µl PBS suspendiert wurden. Die so vorbereiteten Proben wurden im Tiefkühlschrank gelagert.

### **3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proben für Western Blots (1000000 Zellen pro 100 µl PBS) wurden zur Lyse der Zellen dreimal unter fließendem warmem Wasser aufgetaut und bei -20° C wieder eingefroren. Die so gewonnenen Zellsuspensionen wurden einer Messung der Gesamtproteinkonzentration unterzogen. Für die Proteinmessung wurden ein BCA-Kit (Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA) und ein Spektrophotometer (Model DU640, Beckman, Fullerton, CA, USA) nach den Herstellerangaben verwendet.

Nach Ermitteln der Gesamtproteinkonzentration wurden entsprechende Proteinmengen aus den Lysaten entnommen, so dass alle Proben vergleichbare Proteinmengen enthielten. Diese Proben wurden mit SDS-Probepuffer (Laemmli 1970) verdünnt, so dass in einem Endvolumen von 200 µl 200 µg Protein enthalten waren. Der Lysepuffer bestand aus folgenden Reagenzien: 52 ml Aqua dest., 1 g SDS (Serva), 5 g Glycerin (Roth), 92,5 mg EDTA (Roth), 0,4 g TRIS (Serva), 10 mg Bromphenolblau (Roth), 2,5 ml β-Mercaptoethanol (Roth). Diese Proben wurden für 30 min bei 60° C denaturiert



(Thermo-Block TDB-120, Dry-Block Thermostate, Kisker-Biotech, München, Deutschland).

### **3.4 Western Blot**

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde in SDS-Polyacrylamidgelen mit einem Gradienten von 4-15% (ready to use mini Criterion Gels, Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Jede Probentasche wurde mit 20 µl Lysepuffer (entsprechend 20 µg Gesamtprotein) der jeweiligen Probe gefüllt.

Unter Verwendung einer Mini-Elektrophoresekammer (Criterion-Cell, Bio-Rad), bei konstanter Stromspannung von 170 V, dauerte die Elektrophorese ca. 1 h. Der Elektrodenpuffer bestand aus 3 g TRIS (Serva), 14,4 g Glycin (Roth), 1 g SDS (Serva) und einem Liter H<sub>2</sub>O. Als Marker wurde ein Molekulargewichtsstandard von 6,5-175 kDa verwendet (Bio-Rad).

Aus dem Polyacrylamidgel wurden Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) übertragen. Zuvor wurde die Membran ca. 30 min in Transferpuffer aktiviert. Der Transferpuffer bestand aus 5,8 g TRIS (Serva), 2,9 g Glycin (Roth), 0,375 g SDS (Serva), 200 ml Methanol (JT Baker, Deventer, Holland) und 800 ml H<sub>2</sub>O. Es wurde für eine Stunde ein konstanter Strom von 0,8 A pro cm<sup>2</sup> Geloberfläche auf die Blotkammer (Model Semi-Phor, Hoefer, San Francisco, CA, USA) angelegt. Die Spannungs- und Stromquelle für die Gelelektrophorese und den Semidry Blot war ein Power Supply 1500 (Hoefer).

Nach beendetem Transfer wurde die Membran in PBS gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in Blocklösung (0,1 M PBS, pH 7,4, 0,1% Tween 20 und 1% BSA) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper (gelöst in Blocklösung) über Nacht bei 4° C inkubiert.

Als Primärantikörper wurden Antikörper gegen: β-Aktin (1: 3000, aus der Maus, monoklonal, Sigma), SV40 Large T (1: 500, aus der Maus, monoklonal, Becton-Dickinson), Neuronenspezifische Enolase (NSE, 1: 1000, aus Kaninchen, polyklonal, Chemicon), neuronenspezifisches Kernprotein (NeuN 1: 5000, aus der Maus, monoklonal, Chemicon), Tyrosinhydroxylase (TH, 1: 3000, aus der Maus, monoklonal, Sigma), Nurrl (1: 1000, aus der Maus, monoklonal, Becton-Dickinson) und saures Gliafaserprotein (GFAP, 1: 4000, aus der Maus, monoklonal, Sigma) verwendet.

Anschließend wurde die Membran viermal in 0,1 M PBS (pH 7,4) und 0,1% Tween 20 (PBS-T) gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde ein mit dem Enzym Peroxidase kovalent verbundener IgG-Antikörper (anti-mouse, 1: 5000 oder anti-rabbit 1: 10000, beide Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) (ebenfalls in Blocklösung) verwendet. Zur Bindung des zweiten Antikörpers wurde die Nitrozellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt. Nach dem viermaligen Waschen in PBS-T konnten die an der Membran gebundenen Antikörper mit Hilfe des ECL- Kits (Amersham Pharmacia Biotech) detektiert werden. Die Membranen wurden für 1 min mit ECL- Detektionskit inkubiert und anschliessend die nach der Chemoluminiszenz-Methode positiv markierten Banden unter Verwendung eines 100NIF-Röntgenfilms (Agfa, Mortsel, Belgien) detektiert.

Als Positivkontrollen wurden Lysate aus Substantia nigra, Kortex und Striatum vorbereitet und SW13-Zelllysat (vom Hersteller des Antikörpers mitgeliefert) für Nurr1. Die Gewebelysate wurden von Rattengehirnen gewonnen und mit Lysepuffer verdünnt. Für 50 mg Gewebe wurde 1 ml SDS-Puffer zugegeben. Es wurde mit Mikropistil gut zerkleinert und 30 min bei 60° C denaturiert.

### **3.5 Immunzytochemie**

Die Immunzytochemie dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen in einzelnen Zellen, Zellkulturen und Geweben. Die ersten Berichte über erfolgreich durchgeführte Untersuchungen mittels Immunzytochemie wurden bereits in den Jahren 1950 und 1955 veröffentlicht (Coons und Kaplan 1950; Coons et al. 1955). Mit Hilfe der Immunzytochemie können daher antigene Strukturen in Schnittpräparaten und Zellkulturen präzise lokalisiert werden, z. B. Zellbestandteile und Sekretionsprodukte wie Zytoskelett, Zelladhäsionsmoleküle, Moleküle der extrazellulären Matrix, Hormone, Rezeptoren, Immunglobuline und auch Erreger (Heitz et al. 2001).

Die Immunzytochemie gliedert sich in drei Schritte: die Vorbehandlung der Präparate, die Inkubation mit den spezifischen Antikörpern und die Detektion der entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe.

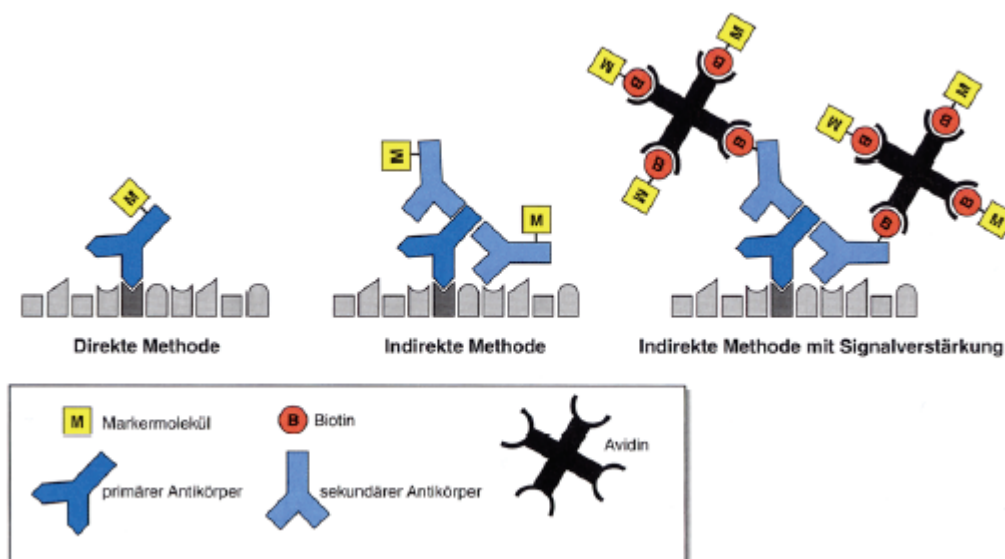
Die Vorbehandlung dient zum einen der Erhaltung der morphologischen Struktur (Fixierung) des Gewebes oder der Zellen, zum anderen der Permeabilisierung und der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in den Präparaten. Es darf dabei aber nicht übersehen werden, dass die Fixierung des Gewebes zur Denaturierung oder Ausfällung von Proteinen und damit zur Maskierung antigenen Strukturen führt. Daher müssen

diese oft durch Vorbehandlung der Schnittpräparate mit proteolytischen Enzymen (z.B. Trypsin, Pronase) oder durch Wärmebehandlung (z.B. Mikrowelle, Wasserbad, Dampfgerar, Autoklav) mit verschiedenen Puffern (z.B. Zitratpuffer, Tris-EDTA-Puffer) demaskiert werden. Im angloamerikanischen Sprachraum wird dieses als „antigen retrieval“ bezeichnet. Gewisse Antikörper erkennen keine denaturierten Strukturen, weshalb für ihre Anwendung nur Gefrierschnitte oder speziell präparierte Gewebe (z.B. Periodat-Lysin-Paraformaldehyd-Fixation oder Gefriertrocknung) genutzt werden können (Heitz et al. 2001).

Im Anschluß an die Vorbehandlungen erfolgt die Inkubation der Präparate mit den spezifischen Antikörpern. Je nach Versuchsansatz erfolgt meist eine weitere Inkubation mit einem markierten Sekundärantikörper, der gegen den ersten gerichtet ist. Die Detektion der Ag-Ak-Komplexe stellt den letzten Arbeitskomplex dar, die je nach Markierungsstrategie der Antikörper meist mit Hilfe enzymatischer Methoden oder über Immunfluoreszenzverfahren erfolgt. Je nachdem, ob die Antikörper in der Lage sind, nur ein Epitop oder mehrere Epitope (Epitop: Sequenz von 5 – 10 Aminosäuren, gegen die die Antigen-Bindungsstellen des eingesetzten Antikörpers gerichtet sind) eines Antigens zu binden, werden monoklonale von polyklonalen Antikörpern unterschieden. Die Antigen-Antikörper-Komplexe können auf unterschiedliche Art und Weise sichtbar gemacht werden. Für diese Reaktion werden zum Nachweis der im Gewebe gebundenen primären Antikörper zwei prinzipiell unterschiedliche Methoden eingesetzt, die sogenannte direkten und indirekten Nachweismethoden. Die direkte Markierung ist die einfachste immunzytochemische Methode. In einem „One-Step-Verfahren“ wird der spezifische, markierte Antikörper mit dem Präparat inkubiert und unmittelbar sichtbar gemacht. Bei den direkten Methoden werden die primären Antikörper mit einem sogenannten Markermolekül (z.B. fluoreszierender Farbstoff, Enzym, kolloidales Gold) gekoppelt, das nach der Immunreaktion im Gewebe nachgewiesen werden kann. Fluoreszierende Farbstoffe geben auf die Exitation durch Ultrablau- oder Ultraviolett-Bestrahlung sichtbares Licht mit definierter Wellenlänge ab. Man benötigt zur Beobachtung fluoreszierender Farbstoffe ein mit geeigneten Filterkombinationen ausgerüstetes Auflichtmikroskop. An primäre Antikörper gekoppelte Enzyme (z.B. Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase) können nach Ablauf der Immunreaktion ein zugegebenes farbloses Substrat in einen unlöslichen (präzipitierenden) Farbstoff verwandeln, der am Ort der Antigen-Antikörper-Bindung nun lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann

(Heitz et al. 2001). Bei den indirekten Methoden werden die Antigen-Antikörper-Reaktionen im Gewebe indirekt, d.h. mit Hilfe zusätzlicher immunologischer Reaktionen, sichtbar gemacht. Es werden meist gegen den primären Antikörper gerichtete sekundäre Antikörper eingesetzt, die selbst ein Markermolekül tragen oder einen mit Markermolekülen oder Enzymen versehenen Komplex als dritte Stufe binden (brückenbildende Antikörper).

Zahlreiche Variationen von indirekten Methoden sind beschrieben worden. Alle führen durch den sequentiellen Ablauf mehrerer Reaktionen zu einer kaskadenartigen Verstärkung (Amplifikation) des Nachweissignals. Bei diesen Entwicklungen handelt es sich um mehrstufige Nachweismethoden, wobei entweder immunologische Bindungen verschiedener gegeneinander gerichteter Antikörper (sogenannte Peroxidase-Anti-Peroxidase- oder PAP-Technik und Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase- oder APAAP-Technik) oder chemische Affinität, z.B. zwischen Avidin und Biotin (Avidin-Biotin-Komplex- oder ABC-Technik) ausgenutzt werden (Schmitt et al. 2004).



**Abb. 2:** Immunologische Verfahren zur spezifischen Darstellung von Proteinen in Geweben und Zellen (Immunzytochemie) (aus: Heitz et al. (2001): S. 19)

### 3.5.1 DAB-Färbung

Diese Methode nutzt die hohe Affinität von Avidin und Biotin zueinander. Bei der Avidin-Biotin-Methode wird der am Antigen gebundene Erstantikörper von einem biotinylierten Sekundärantikörper erkannt. Das Biotin des Sekundärantikörpers wird von einem Komplex aus Avidin und Peroxidase gekoppelten Biotin gebunden, es

kommt zur Bildung größerer Komplexe und somit zu einer Signalverstärkung, die durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase sichtbar gemacht wird (Abb. 2).

Als Detektionssystem diente ein biotinylierter Pferd-Anti-Maus-Antikörper und ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) ist ein Chromogen, das sehr häufig für die Lokalisierung der Peroxidasereaktion angewendet wurde. DAB färbt die Proben braun. Wir haben das Vectastain-Kit (Vector Laboratories) verwendet.

Die fixierten CSM14.1-Zellproben wurden nach kurzem Waschen in TRIS-Puffer (TRIS, 0,1 M, pH 7,4) zur Abblockung endogener Peroxydasen für 10 min bei RT in einer Lösung aus 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (in TRIS gelöst, Sigma) inkubiert und danach wieder mit TRIS-Puffer dreimal gewaschen. Dann erfolgte eine Inkubation für 1 h bei RT in einer Lösung aus TRIS-Puffer, 3% bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma), 5% Normal horse serum (NHS, Gibco) und 0,05% Triton-X100 (Sigma) zum Neutralisieren unspezifischer Bindungsstellen.

Anschließend wurden die Präparate über Nacht bei 4° C mit dem entsprechenden Primärantikörper (Anti-Tyrosinhydroxylase, 1: 500, mouse monoclonal), gelöst in einer Lösung, die TRIS, 1% BSA und 0,025% Triton-X100 enthält, inkubiert. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene Primärantikörper mit TRIS heruntergewaschen. Nach dreimaligem Waschen in TRIS erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4° C mit Sekundärantikörpern, die gegen die jeweilige Primärantikörperspezies gerichtet waren (gelöst in TRIS, 1% BSA und 0,025% Triton-X100). Schließlich wurden die markierten Strukturen mittels eines ABC-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) nach der bekannten Avidin-Biotin-Methode visualisiert. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe erfolgte das Eindecken der Präparate in DePeX (Serva).

### **3.5.2 Fluoreszenzmarkierung**

Die fixierten, auf Kulturgläschen gezüchteten Proben wurden dreimal mit TRIS- Puffer (TRIS, 0,1 M, pH 7,4, Sigma) gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu neutralisieren und damit später ein spezifisches Ergebnis zu erzielen, wurden die Kulturen danach 1 Stunde mit einer Lösung aus 0,1 M TRIS- Puffer (pH 7,4), 3% bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma), 0,05% Triton und 2% normalem Ziegenserum (NGS, Gibco) vorinkubiert. Triton dient hierbei der Öffnung der Zellmembran, damit die Antikörper ihre intrazellulären Epitope erreichen können. Der erste Antikörper

wurde in einer Lösung aus TRIS, 1% BSA, 0,025% Triton je nach Anleitung oder entsprechend den Ergebnissen von Vorversuchen in der gewünschten Endkonzentration (1: 100 bis 1:1000) verdünnt. Die Primärantikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4° C. Danach wurden die Präparate wieder dreimal in TRIS gewaschen. Die Inkubation mit Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern (TRIS, BSA 1%, 0,025% Triton) erfolgte über Nacht bei 4° C. Am nächsten Tag wurde die Zweitantikörperlösung entfernt und 5 min mit DAPI- Stammlösung (DAPI, Roth, + TRIS) inkubiert. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Gruppe der Indol-Farbstoffe gehört. DAPI wird zur DNA-Färbung, speziell zur Kernfärbung, verwendet. Nach dem dreimaligen Waschen in TRIS und einmal kurz in Aqua dest. wurden die Proben mit Fluoreszenzeindeckmedium (Glycerol, Polyvinylalkohol, Aqua dest., TRIS) eingedeckt.

Bei allen Experimenten wurden Negativ-Kontrollen mitgeführt. Dabei entspricht die immunzytochemische Prozedur der oben beschriebenen, nur der spezifische Primärantikörper wurde bei der Primärantikörper-Inkubation weggelassen.

Die Angaben über die verwendeten Antikörper und deren Verdünnung finden sich in Abschnitt 3.8.

### **3.6 Immunzytochemische Auswertung**

Die Untersuchung der Präparate erfolgte unter Verwendung des Leitz Aristoplan-Mikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland) und unter Verwendung der entsprechenden Filtereinheiten. Dieses Forschungsmikroskop verfügt über einen Filterblocksatz für die Fluoreszenzmikroskopie. Es konnten blau (DAPI), grün (CY<sup>2</sup>) und rot (CY<sup>3</sup>) emittierende Fluoreszenzen detektiert werden. Für DAPI wurde ein UV-Filter verwendet. Die Präparate wurden mit einem Kameraaufsatz für Kleinbildfilme dokumentiert und die Dias später mittels eines Diascanners digitalisiert.

In den immunzytochemisch gefärbten Präparaten wurde darüber hinaus die Intensität der jeweiligen Markierungen mit den verschiedenen Antikörpern im Fluoreszenzmikroskop analysiert und qualitativ eingeschätzt. Die relative Markierungsintensität der Zellen wurde beurteilt und wie folgt bewertet:

- keine spezifische Markierung
- + schwach immunreaktiv
- ++ mäßig immunreaktiv

+++ stark immunreaktiv

### 3.7 Morphologie an Zellkulturen

Zur Visualisierung der gesamten Zell-Morphologie wurden Kulturen mit Kresylviolett (Sigma) gefärbt. Kresylviolett (Acetat) gehört zu den Oxazin-Farbstoffen. Diese Farbstoffe binden an basophile Strukturen wie RNA und DNA. Dieser Farbstoff stellt besonders gut den Zellkern, die Nissl-Schollen des Somas, aber auch die Zellausläufer dar (Romeis 1989). Die Zellen wurden in Multidish 24 Wells (Nunclon Delta Si, Dänemark) für 14 Tage kultiviert. Vor der Aussaat wurden die Zellen zuerst gezählt und in DMEM + 10% FCS Zellsuspension vorbereitet. Hierzu wurde die Konzentration der Zellen so eingestellt, dass 1 ml ~2000 Zellen enthielt. In jede Kammer der Multidish 24 Wells wurde 1 ml der Zellsuspension und damit ca. 2000 Zellen eingebracht. Nach 14-tägiger Kulturdauer wurden die Kulturen fixiert, zweimal für 5 min in Aqua dest gespült und für 30 min in einer Kresylviolettazetatlösung (0,1% in H<sub>2</sub>O) gefärbt. Nach wiederholtem Waschen in Aqua dest. und Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate mit DePeX (Serva) eingedeckt.

### 3.8 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

#### 3.8.1 Antikörpern für Western Blot

1. Primärantikörper gegen	ml Blocklösung	µl Antikörper
1. Large T (ms) 1: 500 monoklonal, Becton-Dickinson	30 ml	60 µl
2. β-Aktin (ms) 1: 3000 monoklonal, Sigma	30 ml	10 µl
3. NSE (rb) 1: 1000 polyklonal, Chemicon	30 ml	30 µl
4. NeuN (ms) 1: 5000 monoklonal, Chemicon	30 ml	6 µl

5. Nurr1 (ms) 1: 1000 monoklonal, Becton-Dickinson	30 ml	30 µl
---	-------	-------

6. GFAP (ms) 1: 400 monoklonal, Sigma	30 ml	75 µl
--	-------	-------

7. TH (ms) 1: 3000 monoklonal, Sigma	30 ml	10 µl
---	-------	-------

---

## 2. Sekundärantikörper (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)

Anti-Maus IgG 1: 5000	30ml	6 µl
-----------------------	------	------

Anti-Kaninchen IgG 1: 10000	30 ml	3 µl
-----------------------------	-------	------

---

### 3.8.2 Antikörpern für Immunzytochemie

#### 1. Primärantikörper

Anti-Nestin (ms) 1: 500, monoklonal, Becton-Dickinson

Anti-GFAP (ms) 1: 400, monoklonal, Sigma

Anti-MAP5 (ms) 1: 500, monoklonal, Sigma

Anti-MAP2 (ms) 1: 500, monoklonal, Sigma

Anti-NeuN (ms) 1: 1000, monoklonal, Chemicon

Anti-NSE (rb) 1: 250, polyklonal, Chemicon

Anti-Nurr1 (ms) 1: 1000, monoklonal, Becton-Dickinson

ms = aus der Maus; rb = aus dem Kaninchen



## 2. Sekundärantikörper

CY3 (Cyanin-Farbstoff 3- rote Fluoreszenz) Anti-Maus, polyklonal, aus Ziege, Verdünnung 1: 500, Dianova.

CY3 (Cyanin-Farbstoff 3- rote Fluoreszenz) Anti-Kaninchen, polyklonal, aus Ziege, Verdünnung 1: 500, Dianova.

Biotinylierter Anti-Maus Antikörper, polyklonal, aus Ziege, Verdünnung 1: 80, Dianova.

### **3.9 Morphometrie, Stereologie, Bildanalyse und Statistik**

In Western Blots und Nissl-Färbungen der Zellkulturen wurden die Unterschiede quantifizierbarer Parameter sowohl zwischen Kontrollproben und verschiedenen experimentellen Proben, als auch zwischen unterschiedlichen experimentellen Proben ermittelt.

Auswertung der Western Blots: Die Expression der untersuchten Proteine wurde mittels Densitometrie und nachfolgender statistischer Auswertung mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney Test bzw. U-Test untersucht. Es wurden fünf bis sechs Western Blots pro untersuchtem Protein ausgewertet, die an verschiedenen Tagen mit gleichen Protokollen und Bedingungen erstellt wurden. Dabei wurden gleiche Belichtungs- und Entwicklungszeiten beachtet, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Die optimalen Protein-spezifischen Belichtungszeiten wurden in Vorversuchen über eine Folge unterschiedlicher Zeiten bestimmt. Genau der Belichtungszeitpunkt, der eine deutliche Identifikation aber keine Überbelichtung im Sinne einer vollständigen Schwärzung der Banden zuließ, wurde als optimale Belichtungszeit festgelegt. Die Entwicklungszeit betrug für jeden Blot stets 5 min. Die Bestimmung der optischen Dichten (OD) wurde bildanalytisch unter Verwendung des KS400 (Zeiss-Vision) durchgeführt. Die optische Dichte wurde mittels eines Schwarz- und Weissreferenzbildes unter Korrektur der mittleren Intensität des Blot-Hintergrundes berechnet (Oberholzer et al. 1996). Hierzu wurden die Blots bei einer optischen Auflösung von 600 dpi und einem Grauwertumfang von 256 Intensitätswerten (8 Bit) mit einem transparenten Flachbett-Scanner (Duoscan, Agfa) eingescannt. Diese Auflösung erwies sich in Voruntersuchungen als optimal im Vergleich mit höheren Auflösungen. Die ODs der Kontrollproben (33° C + 10% FCS) und der experimentellen Proben (33° C + 1% FCS, 39° C + 1% FCS) wurden mit Hilfe

des nicht parametrischen U-Tests nach Mann-Whitney auf signifikante Unterschiede getestet (SPSS 11.01). Dieser Test wurde verwendet, da aufgrund der geringen Stichprobengrößen ( $< 20$ ) keine zuverlässige Aussage über die Verteilung der Messwerte gemacht werden konnte. Zur Beschreibung der Daten wurden arithmetische Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler berechnet.

Auswertung der Nissl-Färbung: Für jede ausgewertete Kulturbedingung wurden 8 separate Kulturen angelegt und untersucht, womit eine Stichprobengröße von  $n = 8$  vorliegt. Die Projektionsflächen der Zellen (40x Objektiv), die Zellzählung (10x Objektiv) und die Fortsatzmessung (10x Objektiv) wurden an einem Lichtmikroskop (Zeiss), dass mit einem Projektionsspiegel ausgestattet ist, durchgeführt (Abb. 3). Unter dem Projektionsspiegel wurde ein Leuchttisch platziert, auf den Zählgitter für jeden der drei oben genannten Parameter gelegt und in das mikroskopische Bild projiziert wurden. Zunächst wurde ein auszuwertendes Gesichtsfeld unter dem Mikroskop eingestellt und anschließend das Zählgitter (zufällig verdreht und verschoben) unter den Projektionsspiegel gelegt (Abb. 3).

Das Grid P3 zur Messung der Projektionsflächen der Zellen wurde für jede Probe viermal unterschiedlich und zufällig positioniert. Als Treffer wurden die Somata der Zellen gezählt, die die Kreuze des Grids treffen oder berühren. Da der vertikale und horizontale Abstand der Grid-Kreuze bei der Verwendung des 40x Objektivs  $45\ \mu\text{m}$  im mikroskopischen Bild beträgt, lässt sich nach dem Prinzip von Cavalieri (Howard and Reed 1998) der Anteil der Projektionsflächen der Zellen an der Auswertungsfläche ( $4 \times 0,070875\ \text{mm}^2$ ) bestimmen. Um die mittlere Projektionsfläche einer Zelle zu berechnen, muss noch die Zelldichte ermittelt werden. Dies erfolgte unter dem 10x Objektiv. Das benutzte Grid F3 hat sechs Rahmen mit sogenannten verbotenen Linien. Auch dieses Grid wurde nach Einstellung des auszuwertenden Gesichtsfeldes zufällig unter dem Projektionsspiegel platziert. Es wurden die Zellen gezählt, die in den Zählrahmen des Grids liegen, aber ihre linke und untere verbotene Linie nicht berühren. Die Zellen, deren Somata außerhalb der Rahmen liegen, aber die rechte und obere Linie tangential berühren, wurden mitgezählt. Nach der Ermittlung des Mittelwertes wurden die Zelldichte (ZD) pro  $\text{mm}^2$ :  $\text{ZD} = [\text{Zellen} / \text{mm}^2]$  und der Standardfehler ausgerechnet.

$$ZD = \frac{\sum Q^-}{na \times a}$$

$Q^-$ : Treffer (Anzahl der Überlagerungen vom Meßgitter und den auszuwertenden Strukturen)

$na$ : Anzahl der Meßfelder

$a$ : Größe eines Meßfeldes (0,04 mm<sup>2</sup>, 10x Objektiv)

Nachdem bekannt ist, wieviele Zellen pro mm<sup>2</sup> vorkommen, wurde ermittelt, wie groß die mittlere Projektionsfläche einer Zelle (area): area = [µm<sup>2</sup> / Zelle] ist.

$$area = a(p) \times \sum Q^-$$

$Q^-$ : Anzahl der Schnittpunkte zwischen Zellen und Meßgitter

$a(p)$ : Fläche zwischen 4 Meßgitter-Punkten (0,002025 mm<sup>2</sup>, 40x Objektiv)

$$CE = \frac{\sqrt[2]{\frac{3 \times \left( \left( \sum_{i=1}^n p_i \times p_i \right) - \frac{b}{\sqrt{a}} \times \sqrt{n \times \sum_{i=1}^n p_i} \right) + \sum_{i=1}^n p_i \times p_{i+2} + 4 \times \sum_{i=1}^n p_i \times p_{i+1}}{240}}}{\sum_{i=1}^n p_i}$$

$\sum p_i$ : Anzahl der Zellen, die in den Zählrahmen des Meßgrids liegen

$b/\sqrt{a}$ : mittlere Profil Form: 5 (Gundersen und Jensen 1987)

$n$ : Anzahl der Testauswertungen: 6

Die Länge der gebildeten Fortsätze wurde mit dem Grid L1 und dem 10x Objektiv bestimmt. Das Grid wurde für jede Probe viermal zufällig unter dem Projektionsspiegel positioniert. Als Zählkriterium wurden die Fortsätze nur an solchen Zellen ausgewertet, an denen die Zellkerne eindeutig diagnostizierbar waren. Es wurden diese Fortsätze gezählt, die zu entsprechenden Zellen mit erkennbaren Kernen gehören und die, die sich mit den Linien des Messgrids kreuzten. Die Zellkerne sollen nicht die verbotenen Linien des Grids berühren. In der Folge wurden die mittlere Fortsatzlänge (MFL) pro Zelle: MFL = [µm / Zelle] und der Standardfehler berechnet (Weibel 1979, S. 33f).

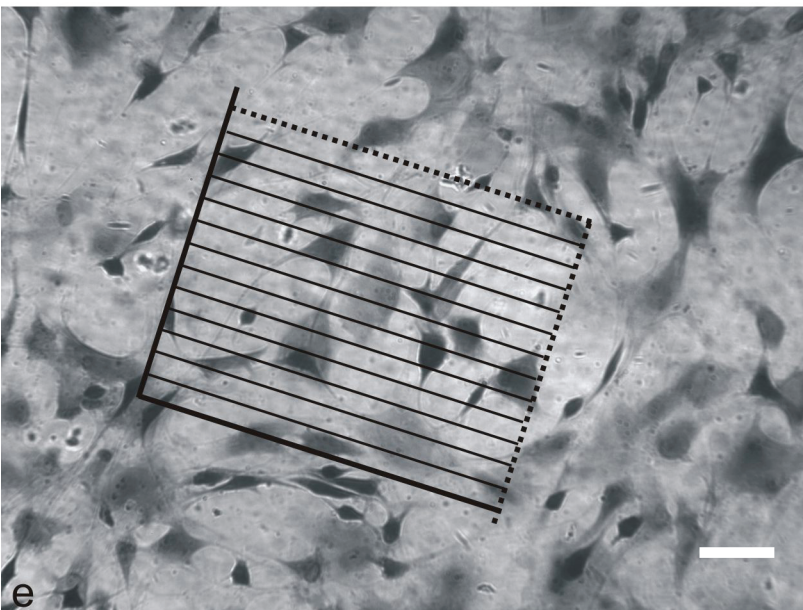
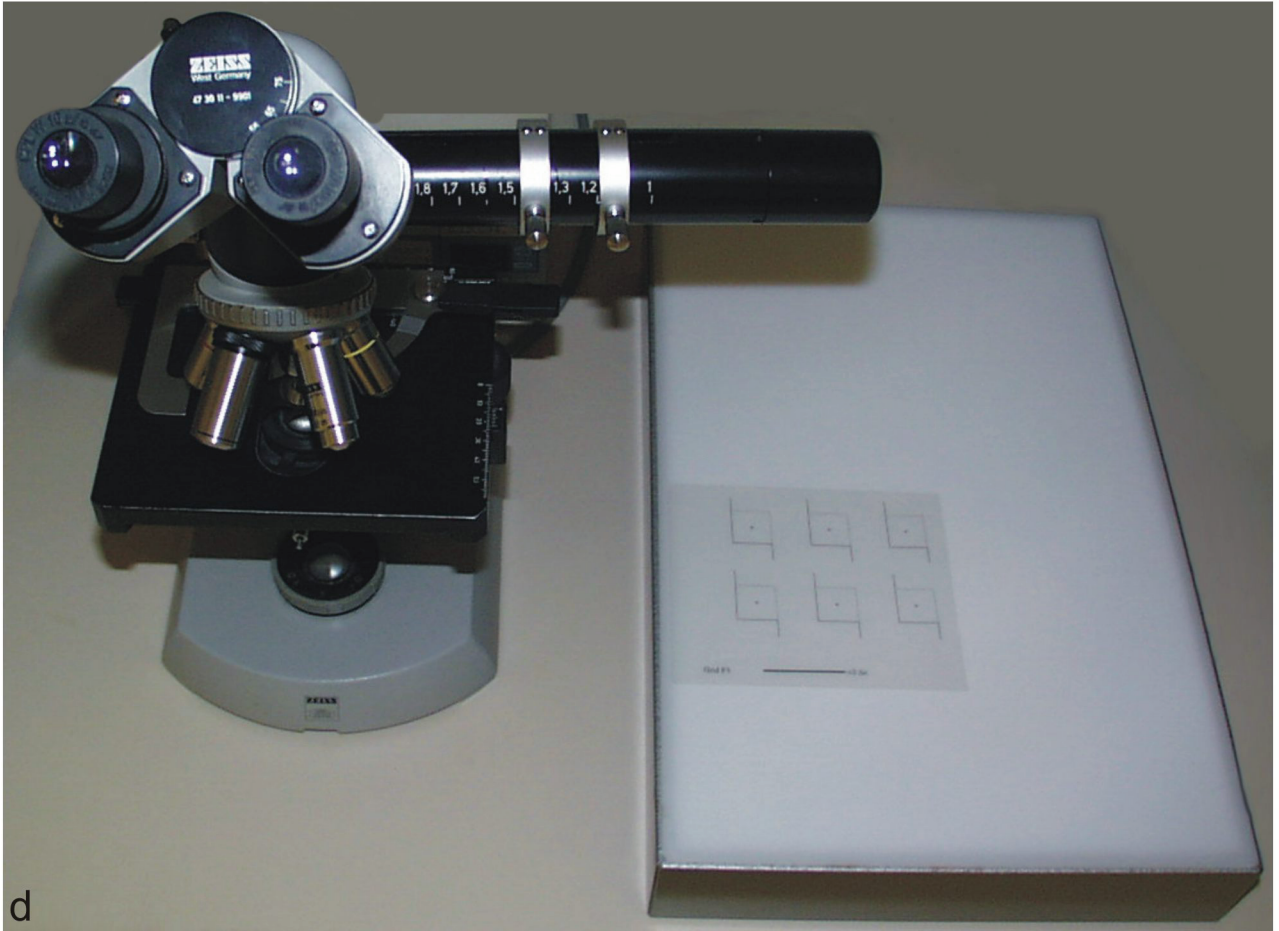
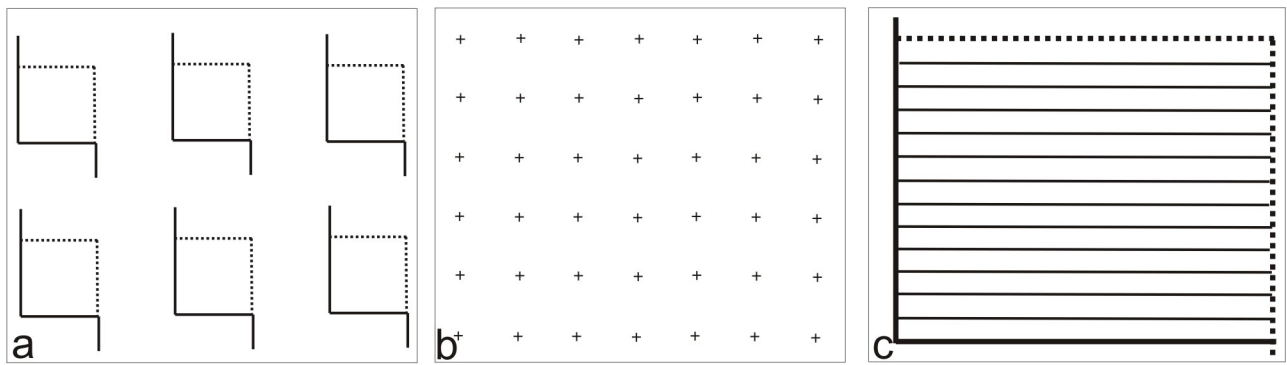
$$MFL = \frac{\pi \times d}{2} \times I(a)$$

d: vertikaler Abstand zwischen Testlinien (0,0036 mm, 10x Objektiv)

I(a): Anzahl der Schnittpunkte zwischen Zellfortsätzen und Testlinien

Die Anzahl der auszuwertenden Messgrids wurde gemäß Gundersen und Jensen (1987) in Form einer Testauswertung bestimmt. Hierzu wurde der coefficient of error (CE) für die Zellzahl berechnet, der mit 7% für die Auswertung von 6 Messgrids deutlich kleiner als der Schwellwert von 25% ist, so dass nicht mehr, sondern eher weniger Messfelder ausgewertet werden mussten. Wäre eine größere Variabilität der Zelldichten in den Präparaten vorhanden, würde der CE bei gleichbleibender Anzahl der ausgewerteten Messgrids größer.

Um die stereologischen Werte von unterschiedlichen Experimenten statistisch zu untersuchen, wurde der nicht parametrische U-Test nach Mann-Whitney verwendet.



**Abb.3:** Stereologische Auswertung

von histologischen Präparaten

a) Grid für Zellzählung (Grid F3)

b) Grid für die Messung  
der Zellflächen (Grid P3)

c) Grid für die Messung  
der Fortsatzlänge (Grid L1)

d) Mikroskop mit dem  
Projektionsspiegel und  
Leuchttisch

e) mikroskopisches Bild  
mit projiziertem Grid

Maßstab: 100  $\mu\text{m}$

## 4. Ergebnisse

Im Folgenden wird die Expression der unterschiedlichen neuronalen Markerproteine in den CSM14.1-Zellen unter den verschiedenen experimentellen Kulturbedingungen beschrieben. Die Ergebnisse der Zellkulturen unter permissiver Temperatur und Serumreduktion (33° C, 1% FCS) werden ausführlich dargestellt, die unter nicht permissiver Temperatur und Serumreduktion (39° C, 1% FCS) nur in Zusammenhang mit der Wirkung des eingesetzten Zytokincocktails. Abschließend werden die durch den Zytokincocktail verursachten Veränderungen der Proteinexpression bei Kulturen unter permissiver und nicht permissiver Temperatur beschrieben. Neben den Veränderungen der Proteinexpression werden auch Änderungen in der Morphologie der Zellen dargestellt.

### 4.1 Kulturen bei 33° C + 1% FCS

Im ersten Schritt wurde das Differenzierungsverhalten der CSM14.1-Zellen unter kontrollierten Bedingungen (permissive Temperatur 33° C, Serumreduktion auf 1% FCS, Kulturdauer bis zu 14 Tagen) mittels semiquantitativem Western Blot und immunzytochemischen Methoden untersucht. Als Vergleich dienten Kulturen, die bei 33° C + 10% FCS in undifferenziertem Zustand gehalten wurden.

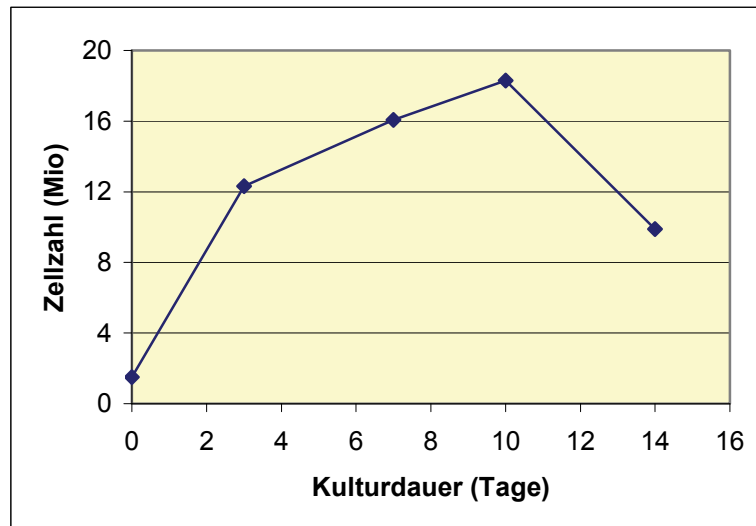
Entwicklung der Zellzahl (Abb. 4): Wurden 1,5 Mio Zellen an Tag 0 ausgesät, fanden sich an den Kulturtagen 3, 7, 10 und 14 folgende Zellzahlen:

Tag 3: 12,3 Mio Zellen

Tag 7: 16,1 Mio Zellen

Tag 10: 18,3 Mio Zellen

Tag 14: 9,9 Mio Zellen

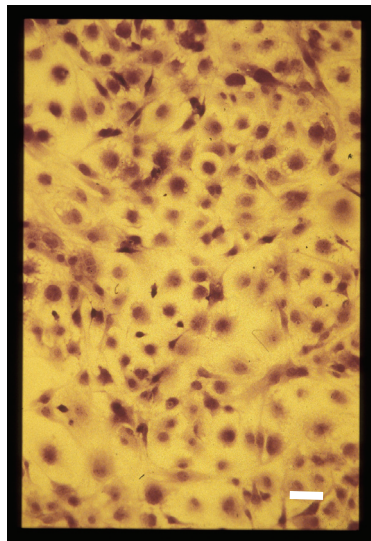


**Abb. 4:** Absolute Anzahl der Zellen in drei Petrischalen. Es wurden am Tag 0 1,5 Mio ausgesät. Während der Kultur (33° C + 1% FCS) wurde die Zellzahl an den Tagen 3, 7, 10 und 14 ermittelt.

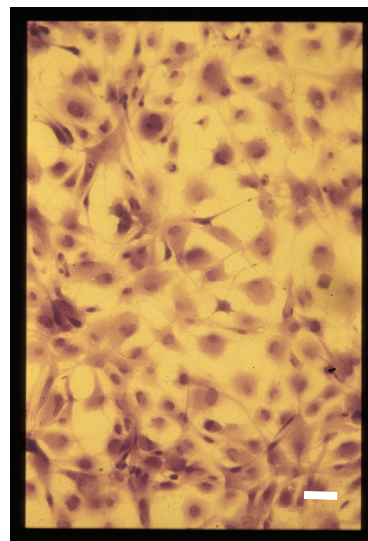
Während der untersuchten Periode (14 Tage) nahm die Zellzahl bis zum 10. Tag stark zu, danach wieder ab. Ab dem 10. bis 14. Kulturtag wurden in den Zellkulturen tote Zellen beobachtet.

Subjektiv wurden kaum Unterschiede in der Morphologie der Zellen während der 14-tägigen Kulturdauer (33° C + 1% FCS) und im Vergleich zu Zellen, die bei permissiver Temperatur 33° C + 10% FCS kultiviert wurden, festgestellt. In den histologischen Präparaten hatten die Zellen kleine Perikarya und den Phenotyp epitheloider Zellen. Die flachen, epitheloiden Zellen bildeten nur wenige kurze Ausläufer aus (Abb. 5A, C, D), und es wurden auch nach 14 Tagen noch Mitosen beobachtet. Diese Zellmorphologie kontrastierte mit dem Bild von Zellen, die bei nicht permissiver Temperatur von 39° C + 1% FCS kultiviert wurden (Abb. 5B).

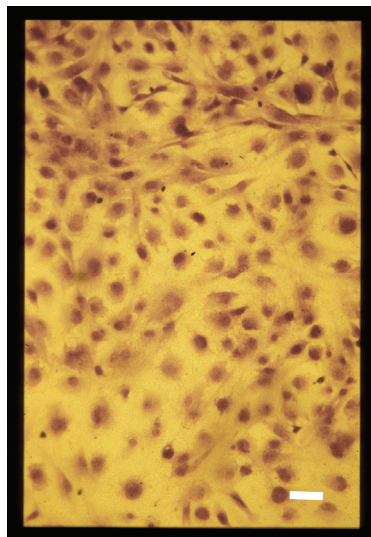




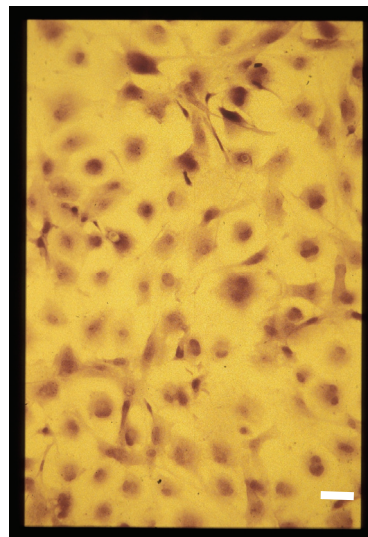
**A**



**B**



**C**



**D**

**Abb. 5:** Kresylviolett-gefärbte CSM14.1-Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. (A) 3 Tage, 33° C + 10% FCS: die undifferenzierten epitheloiden Zellen haben kleine Perikarya. (B) 14 Tage, 39° C + 1% FCS: die differenzierenden Zellen ähneln multipolaren Neuronen mit deutlichen Ausläufern. (C) 3 Tage, 33° C + 1% FCS, (D) 14 Tage, 33° C + 1% FCS: Die Zellen an Tag 3 und 14 unterscheiden sich nur unwesentlich von undifferenzierten Zellen in A, die flachen, epitheloiden Zellen bilden nur wenige kurze Ausläufer aus. Maßstab = 35 µm (A-D)



Entwicklung der Proteinexpression: Es wurde untersucht, ob die Serumreduktion die Expression von Zellproteinen beeinflusst. Mittels Immunzytochemie und Western Blots wurden verschiedene Proteine gesucht, die für Progenitorzellen, differenzierende und ausdifferenzierte dopaminerge Neurone und Gliazellen typisch sind.

Es wurden Zellen während der 14-tägigen Kulturdauer (33° C + 1% FCS) untersucht und die Ergebnisse mit Zellen verglichen, die bei permissiver Temperatur 33° C + 10% FCS kultiviert wurden. Auf diese Weise konnten wir die Veränderungen in der Proteinexpression während der Kulturdauer feststellen und die Ergebnisse der Western Blots auf statistisch signifikante Unterschiede testen. Die Expression folgender Proteine wurde untersucht: Large-T-Antigen, Nestin, MAP5, MAP2, NSE, NeuN, Nurr1, TH, GFAP. Mit Ausnahme von Nestin, MAP5, MAP2 und Large-T-Antigen wurden alle immunzytochemisch und mittels Western Blots dargestellt. MAP5, MAP2 und Nestin wurden nur mittels Immunzytochemie nachgewiesen. Der Grund dafür war, dass die Western Blots für diese schweren Proteine (MAP5 340- 320 kDa; MAP2 280 und 70 kDa; Nestin ~200 kDa) trotz mehrfacher Versuche misslangen. Large-T-Antigen wurde nur mittels Western Blot untersucht. Auf eine immunzytochemische Darstellung des Large-T-Antigens wurde aus Kostengründen verzichtet.

Nestin (Abb. 6A - C):

Nestin ist eng assoziiert mit schnellproliferierenden Progenitorzellen. Es ist ein bekannter Proteinmarker für unreife Neurone: Nestin wurde mittels Immunzytochemie dargestellt. Nestin ist im Zytoplasma der Zellen lokalisiert, besonders stark perinukleär und in den kurzen Ausläufern. Die Kerne sind dabei ausgespart. Die Immunreaktivität der Zellen unterschiedlicher Kulturdauer (3, 7, 10 und 14 Tage, 33° C + 1% FCS) und der Kontrollen (33° C + 10% FCS) wurde verglichen. In CSM14.1-Zellen läßt sich eine intensive Nestin-Expression unter permissiven Kulturtemperaturen (33° C + 10% FCS) nachweisen. Nach dem Wechsel des Mediums (1% FCS) zeigt sich keine deutliche Abnahme der Expression während der Kultivierung bis zu 14 Tagen (Abb. 6A - C).

MAP5 (Abb. 6D - F):

MAP5 wurde mittels Immunzytochemie untersucht. Es wird bereits stark exprimiert in den unreifen Neuronen, die Axone bilden. MAP5 läßt sich immunzytochemisch als

eine mäßige bis starke, überwiegend diffuse Anfärbung im gesamten Zytoplasma einschließlich der Zellausläufer nachweisen. Eine perinukleär stärkere Markierung ist oft deutlich.

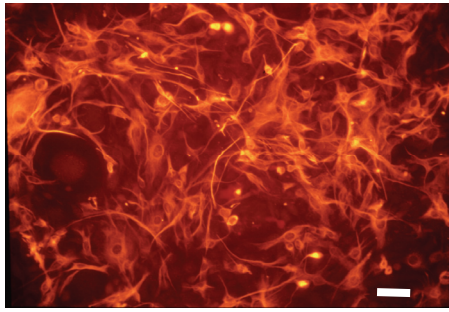
Die Immunreaktivität der Zellen unterschiedlicher Kulturdauer (3, 7, 10 und 14 Tage, 33° C + 1% FCS) und der Kontrollen (33° C + 10% FCS) wurde verglichen. In CSM14.1-Zellen läßt sich eine deutliche (mäßige bis starke) MAP5-Expression unter permissiven Kulturtemperaturen (33° C + 10% FCS) nachweisen. Nach dem Wechsel des Mediums (1% FCS) zeigt sich keine deutliche Zunahme der Expression während der Kultivierung bis zu 14 Tage (Abb. 6D - F).

#### MAP2:

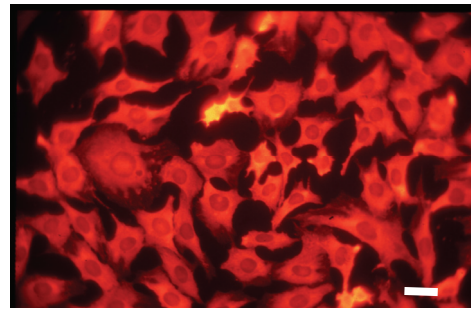
MAP2, ein Marker für reife Neurone, wird u. a. in den Dendriten reifer Neurone nachgewiesen. Weder bei CSM14.1-Zellen, die unter serumreduzierten Bedingungen (33° C + 1% FCS) kultiviert wurden, noch bei den Kontrollen (33° C + 10% FCS) konnte zu irgendeinem Zeitpunkt MAP2-Immunreaktivität, die von der Negativkontrolle unterscheidbar war, nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Eine kausale Erklärung für diese Befunde kann nicht gegeben werden.

#### Large-T-Antigen (Tabelle 1, Abb. 11B, Abb. 7):

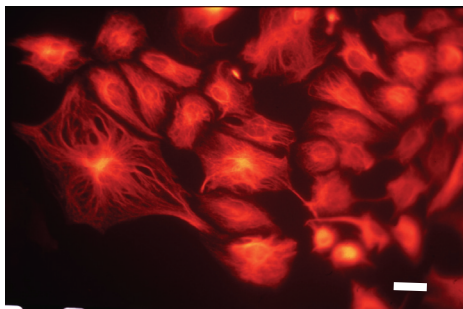
Large-T-Antigen wurde mittels Western Blot untersucht; es wird bei 85 kDa detektiert. Nach der Erhöhung der Temperatur auf 39° C wird das Gen deaktiviert, die Zellen stoppen ihre Teilung und starten mit ihrer Differenzierung. Obwohl dieses Gen temperatursensitiv ist, wurde bei serumreduzierten Bedingungen (33° C + 1% FCS) erst am Tag 10 eine deutliche Abnahme des Large-T-Antigens gegenüber Tag 3 und 7 beobachtet. Bei den Proben, die am 14. Kulturtag gewonnen wurden, nahm die Expression von Large-T-Antigen weiter ab, das Protein konnte aber noch nachgewiesen werden. Die bleibende Aktivität dieses Genes erklärt auch die rasch zunehmende Zellzahl bis Kulturtag 10 und sowie die geringe Expression am Tag 14 die deutliche Abnahme der Zellzahl an diesem Kulturtag. Die Veränderungen der Large-T-Antigen-Expression wurden mittels Densitometrie quantifiziert. Eine Belichtungszeit von 5 min wurde ausgewählt. Die Abnahme der Large-T-Antigen-Expression ab einschließlich Tag 10 ist statistisch signifikant ( $p \leq 0,05$ ).



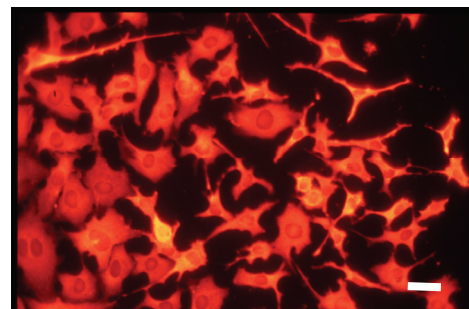
**A**



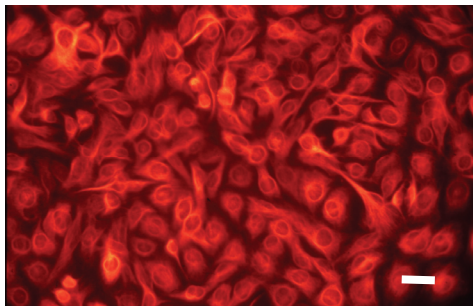
**D**



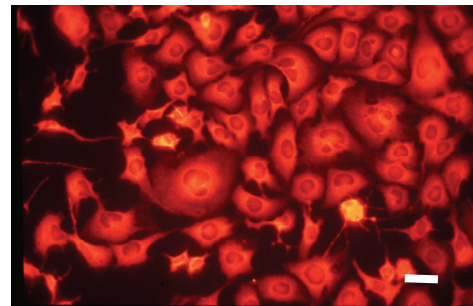
**B**



**E**



**C**



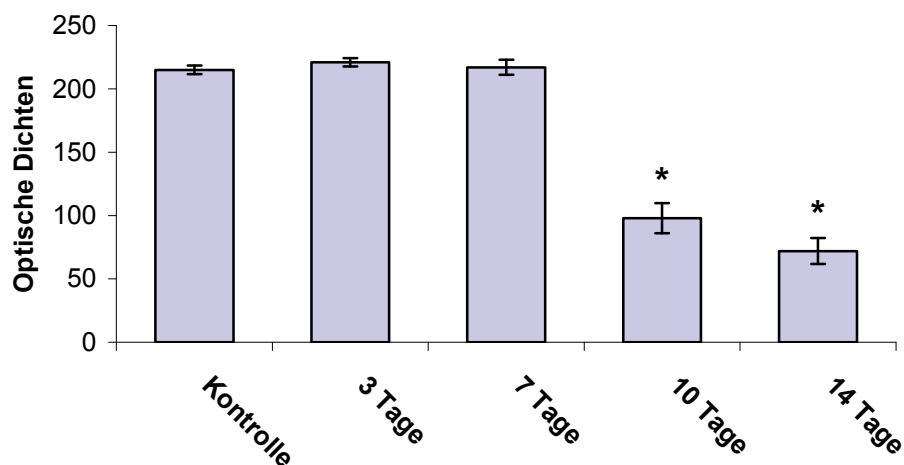
**F**

**Abb. 6:** A – C: Nestin-Immunreaktivität in CSM14.1-Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. (A) 3 Tage, 33° C + 10% FCS, (B) 7 Tage, 33° C + 1% FCS, (C) 14 Tage, 33° C + 1% FCS: die Nestin-Expression zeigt keine auffällige Abnahme während der Kulturdauer. D – F: MAP5- Immunreaktivität. (D) 3 Tage, 33° C + 10% FCS, (E) 7 Tage, 33° C + 1% FCS, (F) 14 Tage, 33° C + 1% FCS: auch die MAP5-Expression zeigt keine deutlichen Veränderungen während der Kulturdauer. Maßstab = 25  $\mu$ m (B), = 35  $\mu$ m (A, C - F).

Die Mittelwerte (MW) der optischen Dichten der Large-T-Antigen-Banden sind Tabelle 1 zu entnehmen und in Abb. 7 als Balkendiagramme dargestellt. Auch im Vergleich zu serumhaltigen Kontrollkulturen (33° C + 10% FCS) war das immortalisierende Genprodukt Large-T-Antigen signifikant reduziert vorhanden ( $p \leq 0,05$ ).

	Kontrolle 33° C, 10% FCS	3 d 33° C, 1% FCS	7 d 33° C, 1% FCS	10 d 33° C, 1% FCS	14 d 33° C, 1% FCS
Mittelwert	215,1	220,9	216,6	98,5	72,3
Standard- fehler	3,7	3,15	5,93	11,98	10,29
Standard- abweichung	9,80	8,91	16,78	33,88	29,10

**Tabelle 1:** Optische Dichten in Western Blots ( $n = 5$ ), Large-T-Antigen, mit Standardfehlern und Standardabweichungen für Kontrollkulturen (33° C + 10% FCS) und für serumreduzierte Kulturen (33° C + 1% FCS) an den Kulturtagen (d) 3, 7, 10 und 14.



**Abb. 7:** Mittelwerte der optischen Dichten der Large-T-Antigen-Banden,  $\pm$  Standardfehler. Serumreduzierten Kulturen (33° C + 1% FCS) der Tage 10 und 14 weisen eine signifikant reduzierte Large-T-Antigen-Expression auf (\*  $p \leq 0,05$ ).

Die Expression der Proteine NSE, NeuN, Nurr1 und TH wurde sowohl mittels Immunzytochemie und als auch mittels Western Blots untersucht.

NSE (Abb. 8A, B, Abb. 11C):

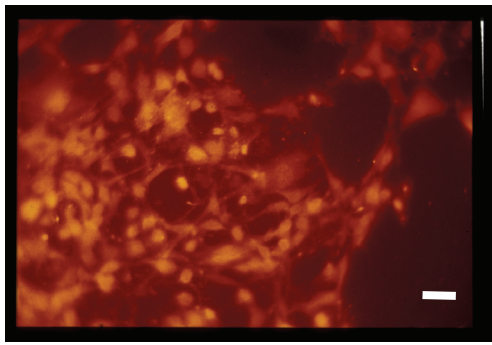
In Western Blots wird NSE bei ~39kDa detektiert. Der Anstieg der NSE-Expression korreliert mit der funktionellen und morphologischen Reifung von Neuronen.

Western Blot: NSE detektiert sich schwach in Zellkulturen bei 33° C + 10% FCS. Während der Kulturdauer von 14 Tagen bei 33° C + 1% FCS nahm die NSE-Expression in den Zellkulturen leicht zu und blieb unverändert nachweisbar (Abb. 11C).

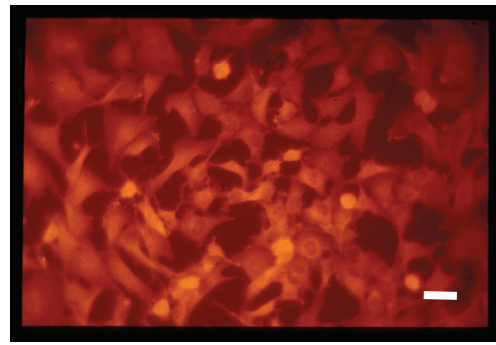
Immunzytochemie: Die NSE-Immunreaktivität findet sich diffus im Zytoplasma verteilt und reicht in die proximalen Abschnitte der Zellfortsätze hinein. Die Kerne werden teilweise durch die zytoplasmatische Immunreaktivität überdeckt. Die NSE-Immunreaktivität wurde in den Zellkulturen an Tag 3, 7, 10 und 14 bei 33° C + 1% FCS dargestellt und mit der in Zellkulturen bei 33° C + 10% FCS verglichen und bewertet. NSE läßt sich unter allen Kulturbedingungen in den Zellkörpern und in den proximalen Ausläufern mäßig bis stark nachweisen (Abb. 8A, B), Serumreduktion verändert die NSE-Immunreaktivität nicht.

Die nur in Western Blots sichtbare leichte Zunahme der Expression von NeuN und fast unveränderte NSE-Expression weisen darauf hin, dass die Serumreduktion auf 1% FCS bei unveränderter Temperatur (33° C) ein nicht ausreichender Stimulus ist, um eine deutliche neuronale Differenzierung von CMS14.1 Zellen hervorzurufen.

Die geringen Veränderungen der Expression von NeuN und NSE wurden nur in Western Blots beobachtet. In der Immunzytochemie konnte keine Veränderungen in der Expression dieser Proteine gesehen werden. Wahrscheinlich sind die leichten Veränderungen in der Proteinexpression, die in Western Blots beobachtet wurden, nicht ausreichend, um sie auch mit der weniger sensitiven immunzytochemischen Darstellung sichtbar machen zu können.

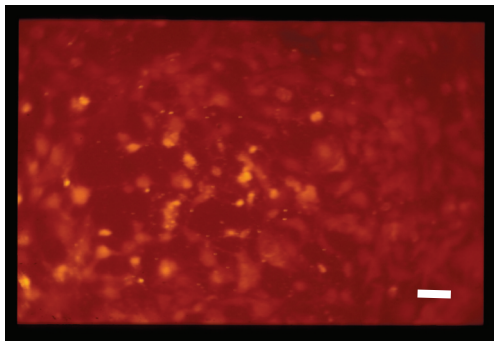


**A**

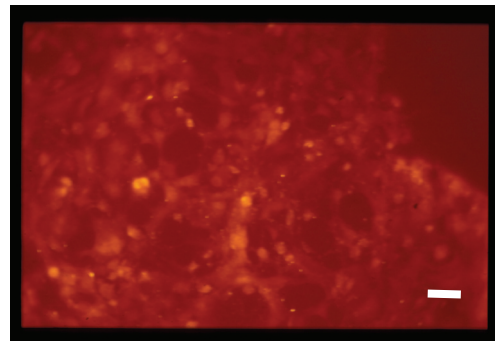


**B**

**Abb. 8:** NSE-Immunreaktivität in CSM14.1-Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. (A) 3 Tage, 33° C + 10% FCS, (B) 14 Tage, 33° C + 1% FCS: die NSE-Expression verändert sich durch Serumreduktion nicht wesentlich. Maßstab = 35 µm



**A**



**B**

**Abb. 9:** NeuN-Immunreaktivität in CSM14.1-Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. (A) 3 Tage, 33° C + 10% FCS, (B) 14 Tage, 33° C + 1% FCS: ein deutlicher Unterscheid ist nicht sichtbar. Maßstab = 35 µm

NeuN (Abb. 9A, B, Abb. 11D):

In Western Blots erscheint NeuN mit einem unspezifischen Band bei 48 kDa und einem spezifischen Band bei 46 kDa. Das unspezifische Band erscheint, wenn in den untersuchten Proben auch unreife Neurone vorhanden sind. Das spezifische Band ist zu beobachten, wenn die untersuchten Proben auch reife Neurone enthalten.

Western Blot: Das unspezifische Band bei 48 kDa war bei den Kulturen bei 33° C + 10% FCS nachweisbar. Am Tag 3 bei 33° C + 1% FCS wurde die NeuN-Expression hochreguliert und blieb konstant während der Kulturdauer. Ein spezifisches Band bei 46 kDa wurde zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen (Abb. 11D).

Immunzytochemie: Das Kernprotein NeuN findet sich bei positiver Immunreaktion im Kern und teilweise auch im Zytoplasma. Die NeuN-Expression in den Kulturen an Tag

3, 7, 10 und 14 bei 33°C + 1% FCS und den Zellkulturen bei 33° C + 10% FCS wurden miteinander verglichen. Alle Zellkulturen zeigten schwache bis mäßige NeuN-Expression. Mit immunzytochemischer Darstellung konnte die in Western Blots nach Serumreduktion darstellbare Hochregulation von NeuN nicht nachgewiesen werden (Abb. 9A, B).

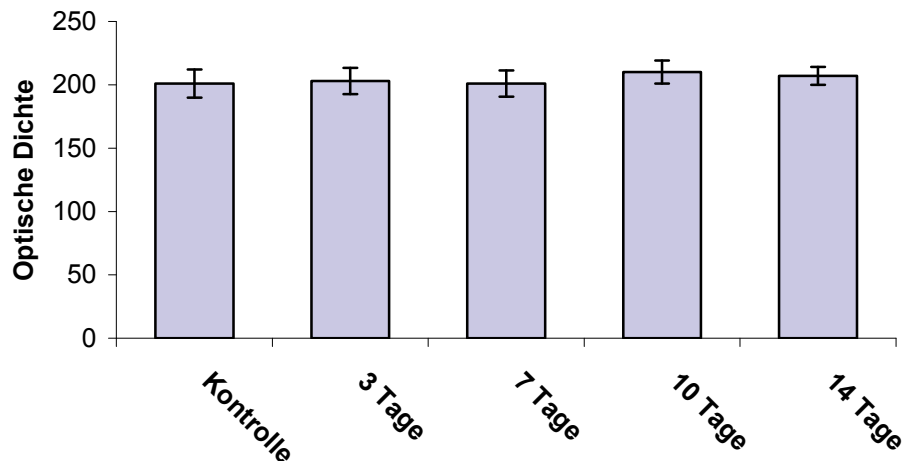
Nurr1 (Tabelle 2, Abb. 10):

Der für frühe dopaminerge Neurone charakteristische nukleäre Retinsäurerezeptor wird durch die Immunzytochemie im Zellkern lokalisiert. In Western Blots wird Nurr1 bei 72 kDa detektiert.

Western Blot: In Western Blots läßt sich Nurr1 sehr gut nachweisen. Eine Belichtungszeit von 30 sek wurde festgelegt. Die Nurr1-Expression verändert sich durch Serumreduktion und während der Kulturdauer bis zu 14 Tagen nicht (Abb. 13A). Mittels Densitometrie und des nachfolgenden nicht parametrischen Mann-Whitney-Testes wurden die Nurr1-Banden der Kontrollen (33° C + 10% FCS) und der serumreduzierten Kulturen (Tag 3, 7, 10, 14) ausgewertet (Tabelle 2, Abb. 10). Die Expressionen innerhalb der untersuchten Kulturbedingungen sind statistisch nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 10).

	Kontrolle 33° C, 10% FCS	3 d 33° C, 1% FCS	7 d 33° C, 1% FCS	10 d 33° C, 1% FCS	14 d 33° C, 1% FCS
Mittelwert	200,71	202,8	201,1	210,0	207,3
Standard- fehler	11,15	3,15	10,37	9,10	7,10
Standard- abweichung	31,55	8,91	29,33	25,73	20,08

**Tabelle 2:** Optische Dichten in Western Blots (n = 5), Nurr1, mit Standardfehlern und Standardabweichungen für Kontrollkulturen (33° C + 10% FCS) und für serumreduzierte Kulturen (33° C + 1% FCS) an den Kulturtagen (d) 3, 7, 10 und 14.



**Abb. 10:** Mittelwerte der optischen Dichten der Nurr1-Banden,  $\pm$  Standardfehler. Während der Kulturdauer in serumreduzierten Medium (33° C + 1% FCS) ändert sich die Nurr1-Expression nicht signifikant, Kontrolle: 33° C + 10% FCS.

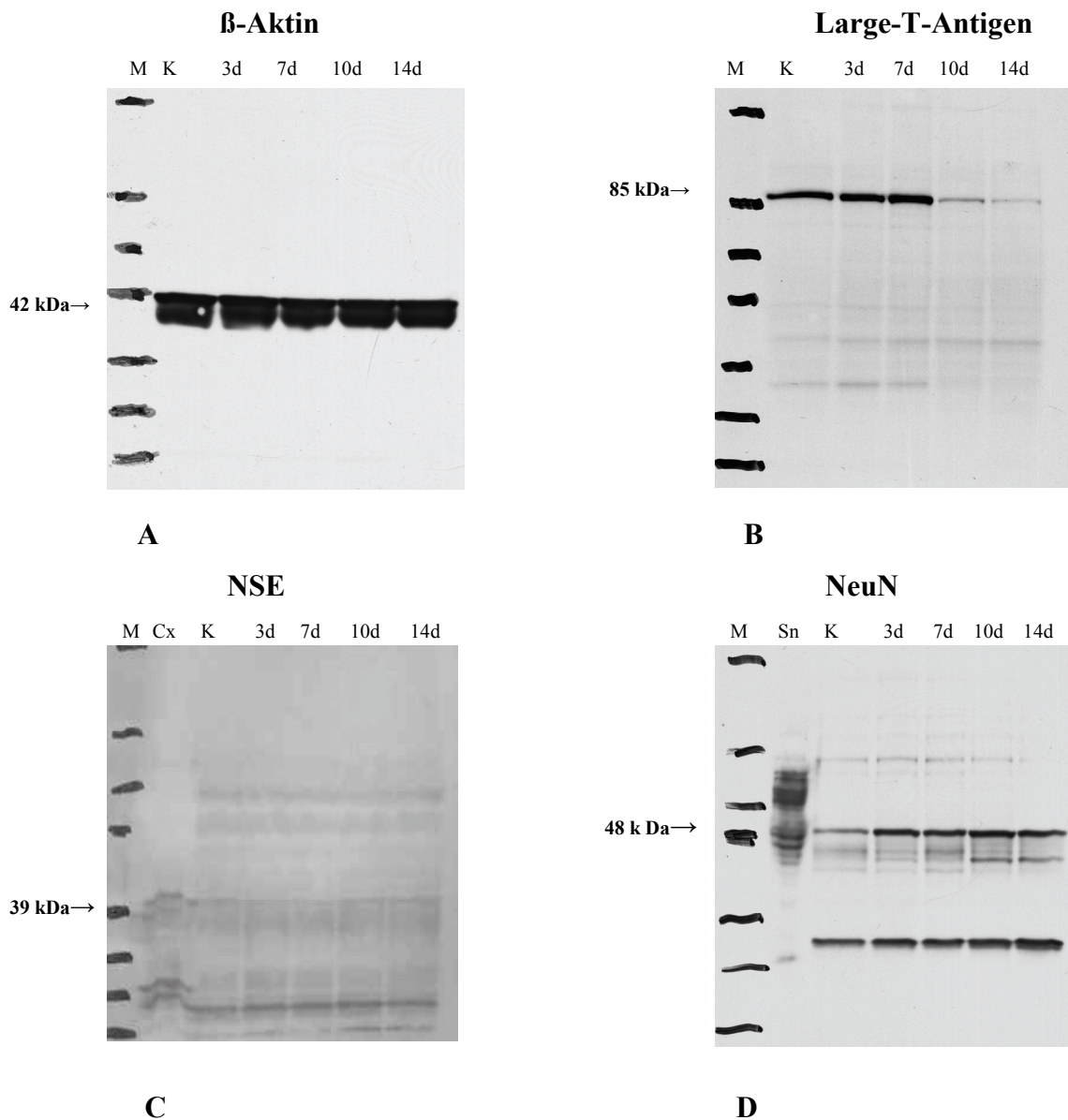
Immunzytochemie: Weder bei CSM14.1-Zellen, die unter serumreduzierten Bedingungen (33° C + 1% FCS) kultiviert wurden, noch bei den Kontrollen (33° C + 10% FCS) konnte zu irgendeinem Zeitpunkt Nurr1-Immunreaktivität, die von der Negativkontrolle unterscheidbar war, nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Eine kausale Erklärung für diese Befunde kann noch nicht gegeben werden.

TH (Tabelle 3, Abb. 12, Abb. 13B):

Tyrosinhydroxylase ist das Schrittmacherenzym im Katecholamin-Stoffwechsel und steuert die Produktion von Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. In Western Blots wird TH nach Literaturangaben bei 60-68 kDa detektiert.

Western Blot: In unseren Blots wurde TH als solitäres, schwaches Band bei 68 kDa in den Kulturen mit 10% FCS detektiert (Abb. 13B). Eine Belichtungszeit von 10 min wurde ausgewählt. Die TH-Expression verändert sich durch Serumreduktion und während der Kulturdauer bis zu 14 Tagen (Tabelle 3, Abb. 12). Diese steigende TH-Expression wurde quantifiziert. Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) wurden zwischen den Kulturen bei 33° C + 10% FCS und denen bei 33° C + 1% FCS an Tag 7 ( $p = 0,009$ ) und 10 ( $p = 0,021$ ) berechnet. Am Tag 14 unter Serumreduktion nahm die TH Expression wieder ab und erreichte das Niveau der Kontrollprobe. Die Mittelwerte





**Abb. 11:** Western Blots von Lysaten von CSM14.1-Zellen unterschiedlicher Kulturbedingungen und Kulturdauer (K = 3 Tage, 33° C + 10% FCS; 3d, 7d, 10d, 14d: 3 - 14 Tage, 33° C + 1% FCS). Jede Probentasche wurde mit 20 µl Lysepuffer (entsprechend 20 µg Gesamtprotein) der jeweiligen Probe gefüllt; (A) Das housekeeping Protein β-Aktin (~42 kDa) zeigt vergleichbare Banden in allen Proben. (B) Das immortalisierende Large-T-Antigen (~85 kDa) zeigt eine deutliche Abnahme am Tag 10 und 14. (C) NSE (~39 kDa) zeigt keine Veränderungen. (D) NeuN (~46 und ~48 kDa) zeigt eine leichte Zunahme ab dem 3. Kulturtag, danach blieb die Expression konstant.

K = CSM14.1-Zellen bei 33° C + 10% FCS; Sn = Substantia nigra; Cx = Kortex; M = nachgetragene Banden des Proteinmarkers.

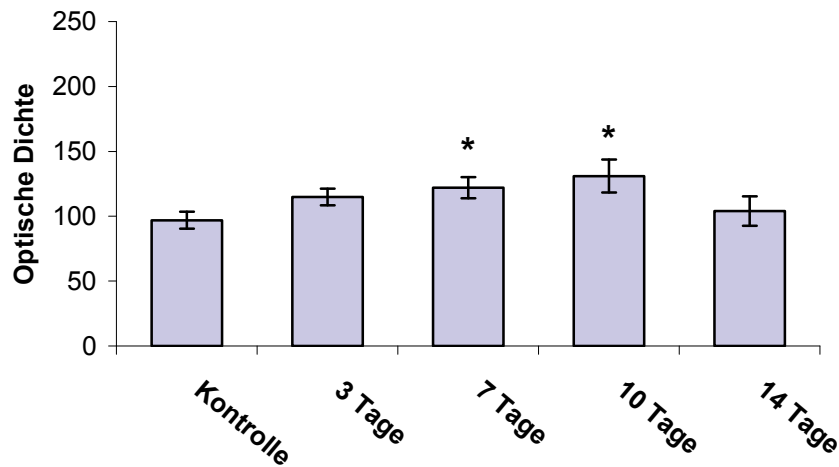
(MW) der optischen Dichten der TH-Banden sind Tabelle 3 zu entnehmen. Sie sind in Abb. 12 als Balkendiagramme dargestellt.

Immunzytochemie: Immunhistochemische Färbungen stellen in der Regel das Zytoplasma und die Ausläufer der dopaminergen Neurone dar. Weder die Zellkulturen bei 33° C + 10% FCS noch die Zellkulturen bei 33° C + 1% FCS an Tag 3, 7, 10 und 14 zeigten TH-positive Immunreaktivität, die unterscheidbar von den Negativkontrollen war. Es konnte keine TH-Immunreaktivität zu irgendeinem Zeitpunkt bei der permissiven Temperatur (33° C) und 1% FCS nachgewiesen werden. In Hirnschnittpräparaten lassen sich TH-immunreaktive Neurone reproduzierbar darstellen (Petrov et al., 2004).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CSM14.1-Zellen unter Kulturbedingungen von 33° C und 1% FCS (Serumreduktion) eine nur sehr geringe neuronale Differenzierung aufweisen. Diese geringen Veränderungen in der Expression neuronaler Markerproteine bei 33° C-Kulturen stehen im Kontrast zu der bekannten starken neuronalen Differenzierung der Zellen, wenn sie unter der nicht permissiven Temperatur von 39° C und Serumreduktion kultiviert werden (Haas und Wree 2002).

	Kontrolle 33° C, 10% FCS	3 d 33° C, 1% FCS	7 d 33° C, 1% FCS	10 d 33° C, 1% FCS	14 d 33° C, 1% FCS
Mittelwert	96,6	115,3	121,7	130,9	103,7
Standard- Fehler	6,50	6,36	8,05	12,67	11,30
Standard- abweichung	18,39	17,99	22,77	35,84	31,96

**Tabelle 3:** Optische Dichten in Western Blots (n = 5), TH, mit Standardfehlern und Standardabweichungen für Kontrollkulturen (33° C + 10% FCS) und für serumreduzierte Kulturen (33° C + 1% FCS) an den Kulturtagen (d) 3, 7, 10 und 14.



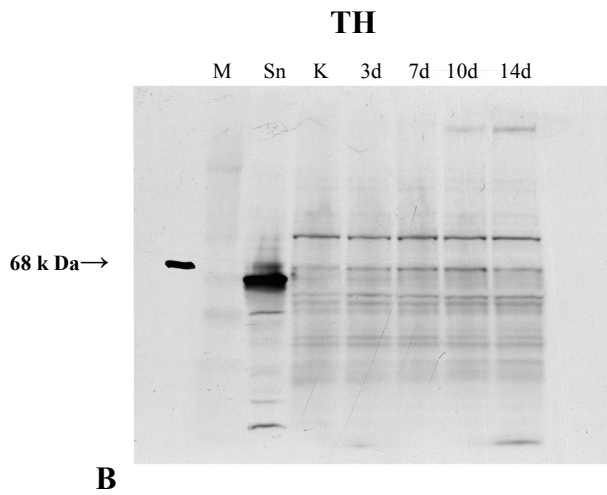
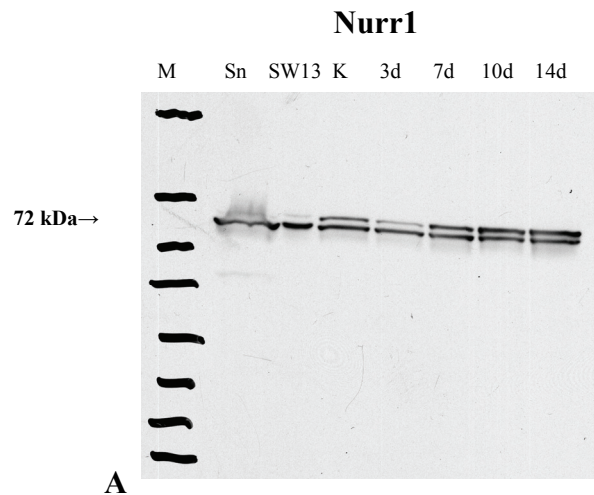
**Abb. 12:** Mittelwerte der optischen Dichten der TH-Banden,  $\pm$  Standardfehler. Serumreduzierte Kulturen ( $33^{\circ}\text{C} + 1\%$  FCS) der Tage 7 und 10 weisen eine signifikant erhöhte TH-Expression auf (\*  $p \leq 0,05$ ) Kontrolle:  $33^{\circ}\text{C} + 10\%$  FCS.

#### GFAP:

Parallel zu den neuronalen Markern wurde auch die Expression des Markers für Astroglia, GFAP, untersucht. GFAP ist theoretisch im gesamten Zellkörper und in den Fortsätzen nachweisbar. Im Western Blot wird GFAP bei 50 kDa detektiert. In den CSM14.1-Zellen ( $33^{\circ}\text{C} + 1\%$  FCS) wurde weder bei den immunhistochemischen Untersuchungen noch in Western Blots eine GFAP-Expression gefunden. Die CSM14.1-Zellen exprimieren kein GFAP, auch nicht in Kultur bei nicht permissiver Temperatur ( $39^{\circ}\text{C}$ ) und Serumreduktion (Haas und Wree 2002).

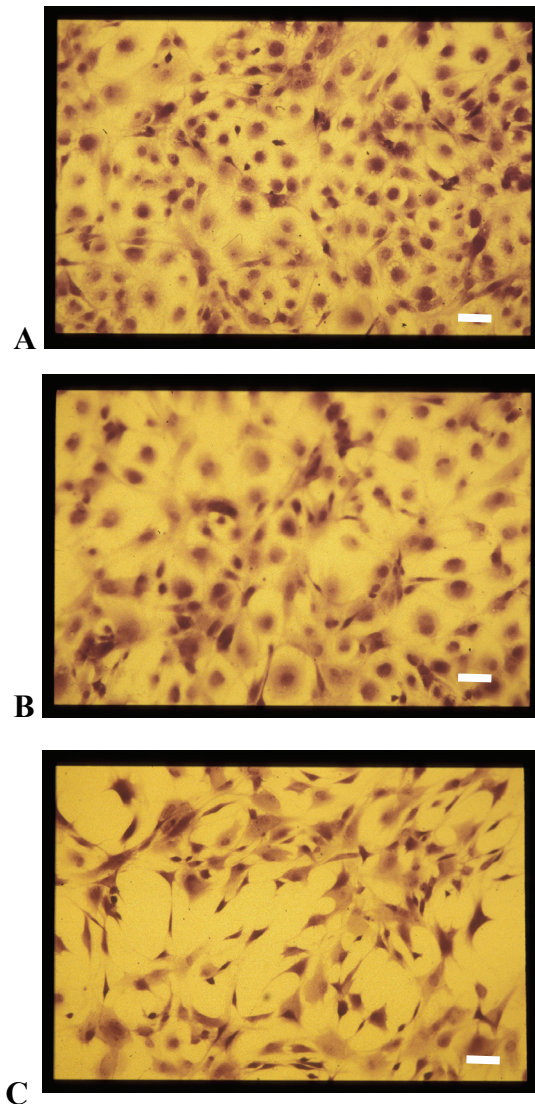
## 4.2 Experimente mit Zytokincocktail

Für die Vorbereitung dieses Experimentes wurden CSM14.1-Zellen aufgetaut und bei permissiven Kulturbedingungen ( $33^{\circ}\text{C} + 10\%$  FCS) zwei Wochen kultiviert. Die Zellkulturen wurden jeden dritten Tag passagiert. Nach den drei Passagen wurden die Zellen gezählt und in den vorbereiteten Petrischalen (für Western Blot Untersuchungen) und in Multidish 24 Wells (für histologische und immunzytochemische Untersuchungen) eingesät. Es wurde die gleiche Zahl von Zellen pro Petrischale (500000 Zellen) ausgerechnet. Auch jede Kammer von Multidish 24 Wells erhielt nach der Zellzählung vergleichbare Zellzahlen (2000 Zellen). Nach der Ruhenacht im Brutschrank bei  $33^{\circ}\text{C}$  erfolgte die Behandlung der Zellkulturen mit den unterschiedlichen Medien und Temperaturen. Die Kulturdauer betrug 14 Tage für jede



**Abb. 13:** Western Blots von Lysaten von CSM14.1-Zellen unterschiedlicher Kulturbedingungen und Kulturdauer (K = 3 Tage, 33° C + 10% FCS; 3d, 7d, 10d, 14d: 3 - 14 Tage, 33° C + 1% FCS). Jede Probenasche wurde mit 20 µl Lysepuffer (entsprechend 20 µg Gesamtprotein) der jeweiligen Probe gefüllt; (A) Nurr1 (~72 kDa): die Nurr1-Expression ändert sich nicht signifikant während des Kulturzeitraumes; (B) TH (~68 kDa): ein Anstieg der TH-Expression mit zunehmender Kulturdauer ist erkennbar; Sn = Lysat aus der Substantia nigra der Ratte, SW13 = Lysat von SW13-Zellen (Positivkontrolle des Antikörperherstellers von Nurr1); M = nachgetragene Banden des Proteinmarkers.

39° C + 1% FCS (mit und ohne Zytokincocktail) wurden quantifiziert. Es wurden die Zellfläche, die Zelldichte und die Zellfortsatzlänge bestimmt. Für die Quantifizierung wurden die Nissl-Präparate von Tag 14 beider Kulturen verwendet. Die entsprechenden Mittelwerte und Standardfehler sind in den Tabellen 4 und 5 und in den Abbildungen 15 - 17 dargestellt.



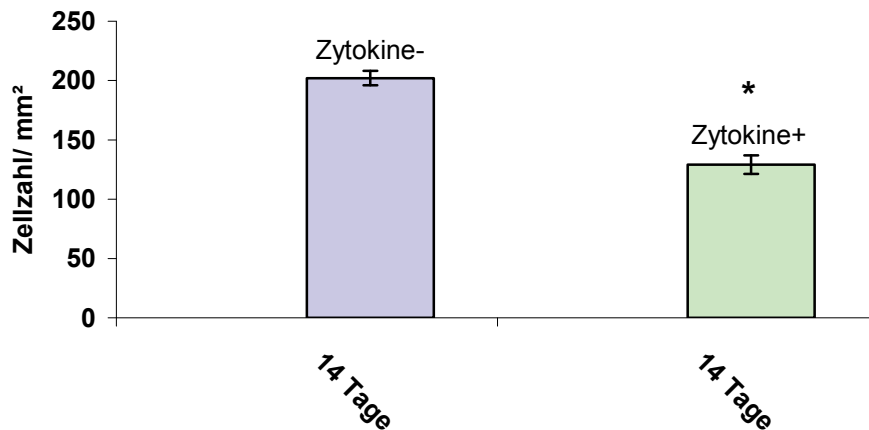
**Abb. 14:** Kresylviolett-gefärbte CSM14.1-Zellen bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. (A) 3 Tage, 33° C + 10% FCS: die undifferenzierten CSM14.1-Zellen haben kleine Perikarya und die Morphologie epitheloider Zellen. (B) 14 Tage, 39° C + 1% FCS, ohne Zytokincocktail, (C) 14 Tage, 39° C + 1% FCS, mit Zytokincocktail: Die bei nicht permissiver Temperatur (39° C) kultivierten Zellen zeigen den Phenotyp multipolarer Neurone mit zahlreiche Ausläufern. Die Zellen unter Einfluß von Zytokinen weisen darüber hinaus deutlich längere Fortsätze auf. Maßstab = 35 µm.

	Fläche der Zellsomata $\mu\text{m}^2$ / Zelle	Zelldichte n / $\text{mm}^2$	Zellfortsatzlänge $\mu\text{m}$ / Zelle
Mittelwert	2372,6	202,1	319,1
Standardfehler	96,75	6,04	21,05
Standard- abweichung	273,65	17,075	59,53

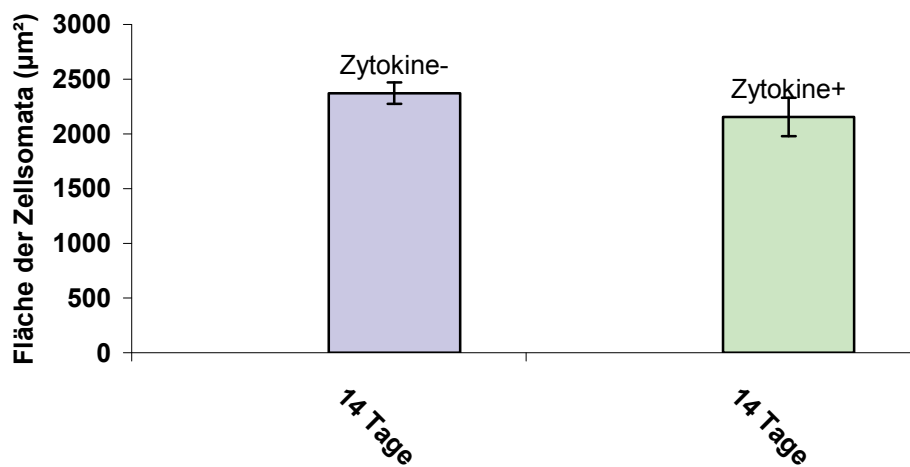
**Tabelle 4:** Mittelwerte der Fläche der Zellsomata, der Zelldichte und der Zellfortsatzlänge  $\pm$  Standardfehlern und Standardabweichungen bei den Zellkulturen (39° C + 1% FCS) ohne Zytokincocktail, Kulturdauer 14 Tage.

	Fläche der Zellsomata $\mu\text{m}^2$ / Zelle	Zelldichte n / $\text{mm}^2$	Zellfortsatzlänge $\mu\text{m}$ / Zelle
Mittelwert	2154,6	129,2	385,1
Standardfehler	176,78	7,83	10,02
Standard- abweichung	500,00	22,13	28,33

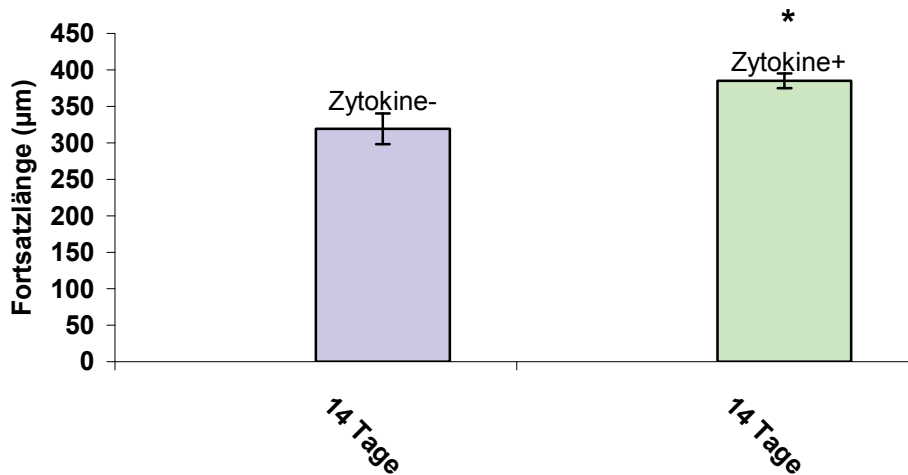
**Tabelle 5:** Mittelwerte der Fläche der Zellsomata, der Zelldichte und der Zellfortsatzlänge  $\pm$  Standardfehlern und Standardabweichungen bei den Zellkulturen (39° C + 1% FCS) mit Zytokincocktail, Kulturdauer 14 Tage.



**Abb. 15:** Zellzahl pro mm<sup>2</sup>,  $\pm$  Standardfehler in CSM14.1-Zellen (Tag 14, 39° C und 1% FCS), die ohne Zytokincocktail (Zytokine-) oder mit Zytokincocktail (Zytokine+) kultiviert wurden. Zellkulturen, die mit Zytokincocktail behandelt wurden, weisen eine signifikant niedrigere Zellzahl pro mm<sup>2</sup> auf (\*  $p = 0,001$ ).



**Abb. 16:** Mittlere Fläche der Zellsomata (µm<sup>2</sup>) pro Zelle,  $\pm$  Standardfehler in CSM14.1-Zellen (Tag 14, 39° C und 1% FCS), die ohne Zytokincocktail (Zytokine-) oder mit Zytokincocktail (Zytokine+) kultiviert wurden. Zellkulturen, die mit Zytokincocktail behandelt wurden, weisen keine signifikant veränderte Zellfläche auf ( $p \geq 0,05$ ).



**Abb. 17:** Mittlere Zellfortsatzlänge (µm) pro Zelle, ± Standardfehler in CSM14.1-Zellen (Tag 14, 39° C und 1% FCS), die ohne Zytokincocktail (Zytokine-) oder mit Zytokincocktail (Zytokine+) kultiviert wurden. Zellkulturen, die mit Zytokincocktail behandelt wurden, weisen eine signifikant größere Zellfortsatzlänge pro Zelle auf (\*  $p \leq 0,05$ ).

Zusammenfassend ergeben sich nach der statistischen Auswertung der Nissl-gefärbten Zellkulturen folgende Ergebnisse:

Zellzahl pro mm<sup>2</sup>: CSM14.1-Zellen (Tag 14, 39° C und 1% FCS), die ohne Zytokincocktail (Zytokine-) oder mit Zytokincocktail (Zytokine+) kultiviert wurden, unterscheiden sich signifikant bezüglich ihrer Zellzahl pro mm<sup>2</sup> (= Zelldichte). In den Kulturen ohne Zytokin-Gabe kommen signifikant mehr Zellen pro mm<sup>2</sup> vor als in den Kulturen, die Zytokine erhielten ( $p = 0,001$ ).

Mittlere Zellfläche (µm<sup>2</sup>) des Perikaryons pro Zelle: CSM14.1-Zellen (Tag 14, 39° C und 1% FCS), die ohne Zytokincocktail (Zytokine-) oder mit Zytokincocktail (Zytokine+) kultiviert wurden, unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich ihrer mittleren Zellfläche ( $p \geq 0,05$ ).

Mittlere Zellfortsatzlänge (µm) pro Zelle: CSM14.1-Zellen (Tag 14, 39° C und 1% FCS), die ohne Zytokincocktail (Zytokine-) oder mit Zytokincocktail (Zytokine+) kultiviert wurden, unterscheiden sich signifikant bezüglich ihrer mittleren Zellfortsatzlänge. Zellkulturen, die mit Zytokincocktail behandelt wurden, weisen eine signifikant größere Zellfortsatzlänge pro Zelle auf ( $p = 0,02$ ).

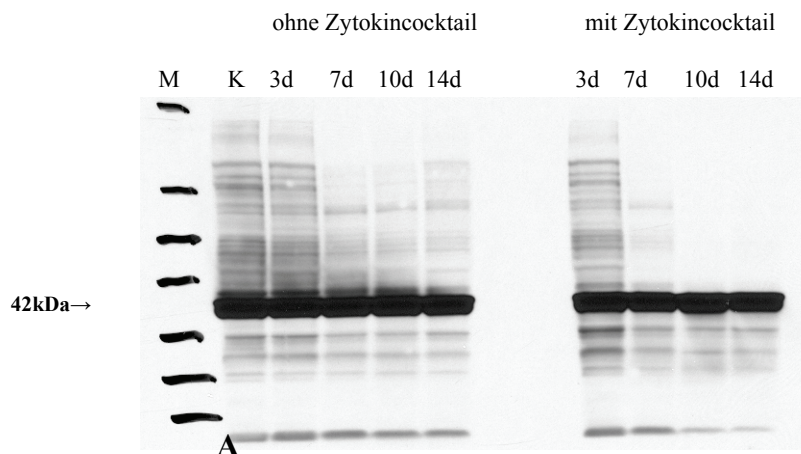
Im Folgenden werden der immunzytochemische Nachweise von TH und Nurr1 und die Expressionsanalyse in Western Blots von β-Aktin, NeuN, NSE, Nurr1, TH und GFAP



in den Zellkulturen, die bei 39° C und 1% FCS ohne oder mit Zytokincocktail (Kulturtage 3 – 14) kultiviert wurden, dargestellt. Diese Ergebnisse werden verglichen mit den Resultaten, die in undifferenzierten Zellkulturen (33° C und 10% FCS) gewonnen wurden. Die Ergebnisse der Zellkulturen, die bei 33° C und 1% FCS ohne oder mit Zytokincocktail kultiviert wurden, werden nur kurz dargestellt, da sich hier keine Unterschiede ergaben.

β-Aktin (Abb. 18):

Als interne Kontrolle für die Einbringung gleicher Proteinmengen bei den Western Blots (20 µg Protein pro Spur) wurde β-Aktin als „housekeeping“ Protein nachgewiesen (Abb. 18). Aufgrund der identischen Bandendichte bei 42 kDa kann davon ausgegangen werden, dass identische Proteinmengen in alle weiteren Blots eingebracht worden sind.



**Abb. 18:** β-Aktin Western Blot von Lysaten von CSM14.1-Zellen unterschiedlicher Kulturbedingungen und Kulturdauer (K = 3 Tage, 33° C + 10% FCS; 3d, 7d, 10d, 14d: 3 - 14 Tage, 39° C + 1% FCS, ohne oder mit Zytokincocktail). Jede Proben tasche wurde mit 20 µl Lysepuffer (entsprechend 20 µg Gesamtprotein) der jeweiligen Probe gefüllt. Das „housekeeping“ Protein β-Aktin (~42 kDa) zeigt vergleichbare Bandendichten in allen Proben. M = nachgetragene Banden des Proteinmarkers.

NSE (Abb. 19A):

Im Western Blot wird NSE bei ~39kDa detektiert. Neben den verschiedenen Zelllysaten wurde als Positivkontrolle Gewebelysat aus dem Kortex einer adulten Ratte verwendet.

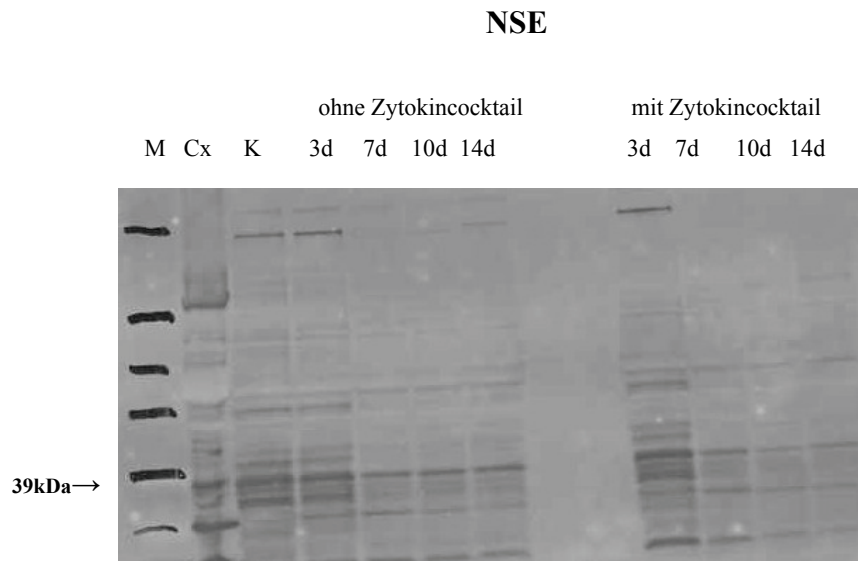
NSE detektiert sich schwach bei der Kontrollprobe (CSM14.1-Zellen, kultiviert bei 33° C + 10% FCS). NSE wurde nach der Temperaturerhöhung auf 39° C und Serumreduktion auf 1% FCS kaum hochreguliert und blieb unverändert während der Kulturdauer von 14 Tagen nachweisbar. Die zytokinbehandelten Kulturen zeigten am Tag 3 eine verstärkte NSE-Expression. Die Expression nahm an Tag 7 leicht ab, blieb aber weiter konstant nachweisbar. (Abb. 19A).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Zytokin-Behandlung keinen wesentlichen Einfluss auf die NSE-Expression hat und dass sich CSM14.1-Zellen bei 39° C + 1% FCS unabhängig von der Zytokin-Zugabe in Neurone differenzieren.

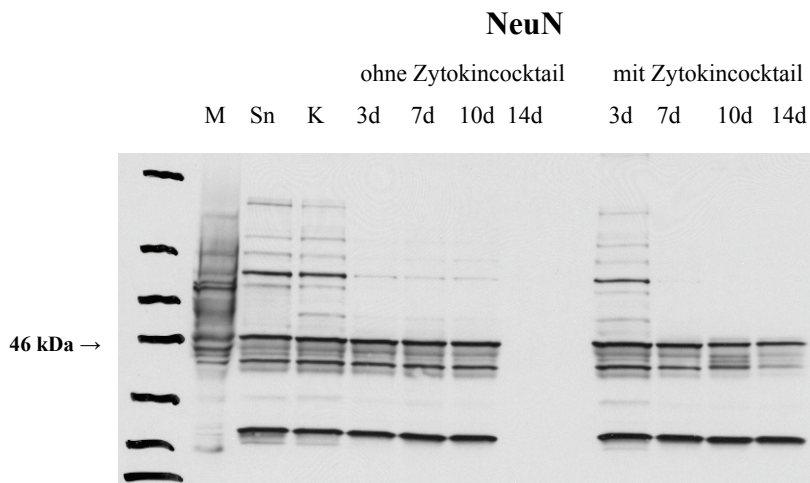
NeuN (Abb. 19B):

In Western Blot erscheint NeuN mit einem unspezifischen Band bei 48 kDa und einem spezifischen Band bei 46 kDa. Das unspezifische Band wird sichtbar, wenn in den untersuchten Proben unreife Neurone vorhanden sind. Wenn das spezifische Band erscheint, kann dies mit dem Auftreten reifer Neurone erklärt werden. Nur das spezifische Band bei 46 kDa ist in Abb. 19B markiert.

Als Positivkontrolle wurde ein Gewebelysat aus der Substantia nigra einer adulten Ratte verwendet. Das unspezifische Band bei 48 kDa war bei der Kontrollprobe (33° C + 10% FCS) deutlich sichtbar, da sie unreife CSM14.1-Zellen enthält. Am Tag 3 nach der Temperaturerhöhung auf 39° C und Serumreduktion auf 1% FCS wurde das spezifische Band sichtbar (Abb. 19B): die NeuN-Expression wurde temperaturabhängig hochreguliert. Das hochregulierte NeuN blieb während der weiteren Kulturdauer bis zu 14 Tage konstant. Bei den Zellkulturen, die mit Zytokinen behandelt wurden, wurde NeuN ebenfalls ab dem Tag 3 hochreguliert. Der Vergleich der Blots ergab keinen Unterschied zwischen den Zelllysaten der Kulturen, die mit oder ohne Zytokincocktail behandelt wurden (Abb. 19B).



**A**



**B**

**Abb. 19:** Western Blot von NSE (A) und NeuN (B) von Lysaten von CSM14.1-Zellen unterschiedlicher Kulturbedingungen und Kulturdauer (K = 3 Tage, 33° C + 10% FCS; 3d, 7d, 10d, 14d: 3 - 14 Tage, 39° C + 1% FCS, ohne oder mit Zytokincocktail). Jede Probenassche wurde mit 20 µl Lysepuffer (entsprechend 20 µg Gesamtprotein) der jeweiligen Probe gefüllt. (A): Die NSE-Expression (~39 kDa) zeigt keinen Unterschied zwischen den Kulturen mit und ohne Zytokinen-Zugabe. Blots ergab keinen Unterschied zwischen den Zelllysaten der Kulturen, die mit oder ohne Zytokincocktail behandelt wurden. (B) NeuN (spezifische Bande bei 46 kDa) wird durch Temperaturerhöhung unabhängig von der Zytokin-Behandlung hochreguliert. Sn = Lysat aus Substantia nigra der Ratte. Cx- Kortex; M = nachgetragene Banden des Proteinmarkers.

Als Marker für eine dopaminerge Differenzierung wurden Nurr1 und TH mittels Western Blots und Immunzytochemie untersucht. Zum immunzytochemischen Nachweis wurden DAB- und Fluoreszenzfärbungen eingesetzt.

Nurr1 (Tabelle 6, Abb. 20, Abb. 22A):

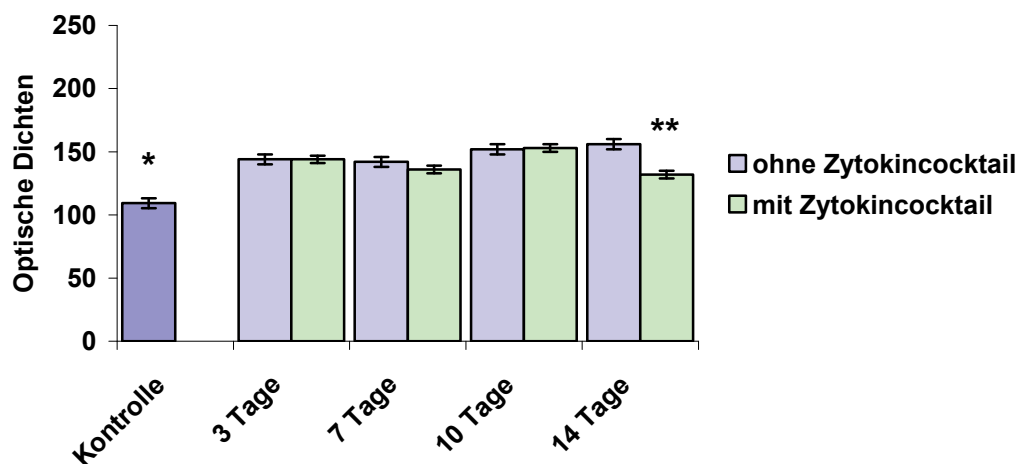
Nurr1, der nukleäre Retinsäurerezeptor, reguliert die Transkription des TH-Gen-Promotors und damit die Entwicklung der dopaminergen Neurone. Nurr1 ist auch wichtig für ihr Überleben und ihre normale Funktion. Nurr1 ist im Zellkern lokalisiert. In Western Blots wird Nurr1 bei ca. 72 kDa detektiert. Es werden zwei dicht benachbarte Banden sichtbar (Abb. 22A). Zwei Positivkontrollen wurden benutzt: SW13-Zelllysate (von der Firma Becton-Dickinson speziell mitgelieferte Positivkontrolle) und ein Gewebelysate aus der Substantia nigra einer adulten Ratte.

Western Blot: Nurr1 wurde bereits von undifferenzierten CSM14.1-Zellen exprimiert. Bei den nicht permissiven Kulturbedingungen (39° C + 1% FCS) nahm die Nurr1-Expression bereits am Tag 3 zu und erreichte ihr Maximum am Tag 14. Zytokinbehandelte Zellkulturen zeigten ebenfalls eine Zunahme am Tag 3, 7 und 10, am Tag 14 folgte eine deutliche Herunterregulation (Abb. 22A). Quantifiziert wurden die optische Dichte (OD) und Flächen (BF) der Banden in den Blots und deren Standardabweichung und Standardfehler berechnet (Tabelle 6). Bei den Proben, die nicht mit Zytokinen behandelt wurden, waren insgesamt die optischen Dichten der Banden signifikant höher ( $p = 0,039$ ) als bei den Proben, die Zytokincocktail erhielten (Tabelle 6, Abb. 21). Untersucht wurde ferner, ob Unterschiede der optischen Dichten zwischen den Proben des gleichen Kulturtages von behandelten und nicht mit Zytokinen behandelten Zellen erkennbar sind. Ein signifikanter Unterschied wurde nur für Tag 14 beobachtet. Die optischen Dichten bei den Proben des Tages 14 ohne Zytokine sind signifikant größer als die bei den Proben mit Zytokin-Gabe (OD,  $p = 0,006$ ) (Abb. 20). Auch sind an Tag 14 die Bandenflächen bei den Kulturen ohne Zytokine signifikant größer als die der Proben mit Zytokin-Gabe (BF  $p = 0,01$ ) (Tabelle 6).

Immunzytochemie: Nurr1-Expression wurde auch mittels Immunzytochemie untersucht. Es konnte weder in den Zellkulturen bei 39° C + 1% FCS ohne Zytokincocktail noch bei zytokinbehandelten Zellkulturen Nurr1-Immunreaktivität, die von Negativkontrolle unterscheidbar war, dargestellt werden (ohne Abbildung).

	TH- OD	TH- Bandenfläche	Nurr1-OD	Nurr1- Bandenfläche
Mittelwert	125,1	2,97	144,8	35,79
Standard- abweichung	7,19	0,76	11,51	0,76
Standard- fehler	1,04	0,11	1,66	0,11

**Tabelle. 6:** Mittelwerte der optischen Dichten und der Bandenflächen der Nurr1- und TH- Banden,  $\pm$  Standardfehler und Standardabweichungen für die Zellkulturen (39° C + 1% FCS) mit und ohne Zytokincocktail. Es wurden alle Kulturtage (3 – 14) zusammengefaßt. Die Bandenflächen sind in mm<sup>2</sup> angegeben.



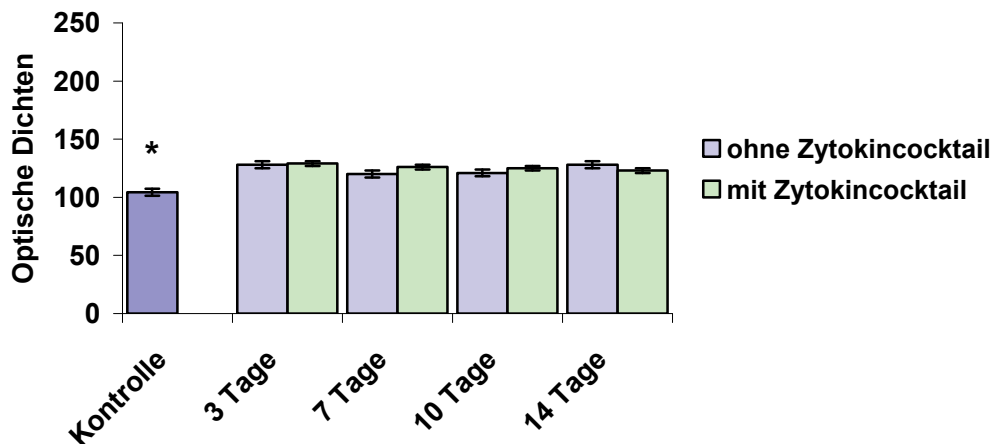
**Abb. 20:** Mittelwerte der optischen Dichten der Nurr1-Banden,  $\pm$  Standardfehler für Kontrollkulturen (33° C + 10% FCS) und für Kulturen (39° C + 1% FCS) an den Kulturtagen 3, 7, 10 und 14, die ohne oder mit Zytokincocktail kultiviert wurden. Die zytokinbehandelten Zellen weisen an Tag 14 eine signifikant niedrige Nurr1-Expression auf ( $p^{**} \geq 0,05$ ). Im Vergleich zu den Kontrollkulturen (33° C + 10% FCS) zeigen die Zellkulturen bei 39° C ohne und mit Zytokincocktail eine signifikant höhere Nurr1-Expression ( $p^* \leq 0,001$ ).

TH (Tabelle 6, Abb. 21, Abb. 22B):

Mit der Abnahme der Expression von Nurr1 in den DA-Neuronen beginnt die Synthese von Tyrosinhydroxylase. Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 60-68 kDa. Die optimale Belichtungszeit betrug 5 min. Als Positivkontrolle wurde ein Lysat aus der Substantia nigra einer adulten Ratte vorbereitet. Für die Darstellung der TH-Expression wurden die immunhistochemischen Färbungen DAB und Immunfluoreszenz angewendet.

Western Blot: In den Zellkulturen bei 39°C + 1% FCS ohne Zytokincocktail wurde die TH-Expression im Vergleich zu Kontrollkulturen (33° C + 10% FCS) ab Tag 3 hochreguliert und blieb hoch bis Tag 14 (Abb. 22B). Bei den entsprechenden Zellkulturen mit Zytokincocktail folgte nach dem Anstieg an Tag 3 eine leichte Herunterregulation bis Tag 14 (Abb. 21, 22B). Die TH-Expression in den Zelllysaten mit und ohne Zytokincocktail nach Temperaturerhöhung und Serumreduktion wurde quantifiziert und miteinander verglichen. Die Proben des 3., 7., 10. und 14. Kulturtag gingen in die Analyse ein. Es wurde die optische Dichte (OD) und Bandenfläche (BF) gemessen und die Standardfehler und die Standardabweichungen berechnet (Tabelle 6, Abb. 21). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede berechnet, das heißt, dass die Behandlung mit Zytokincocktail die TH-Expression nicht signifikant beeinflusst.

Immunzytochemie: Mit der Immunzytochemie konnte weder in den Zellkulturen bei 33° C + 10% FCS noch in den Zellkulturen bei 39° C + 1% FCS (mit oder ohne Zytokincocktail) an Tag 3, 7, 10 und 14 eine TH-positive Immunreaktivität nachgewiesen werden, die unterscheidbar von den Negativkontrollen war. Bis jetzt konnte unsere Arbeitsgruppe mit dem benutzten Antikörper bei CSM14.1-Zellen keine TH-Expression *in vitro* mittels Fluoreszenz nachweisen. In Hirnschnittpräparaten lassen sich TH-immunreaktive Neurone allerdings reproduzierbar darstellen (Petrov et al., 2004).

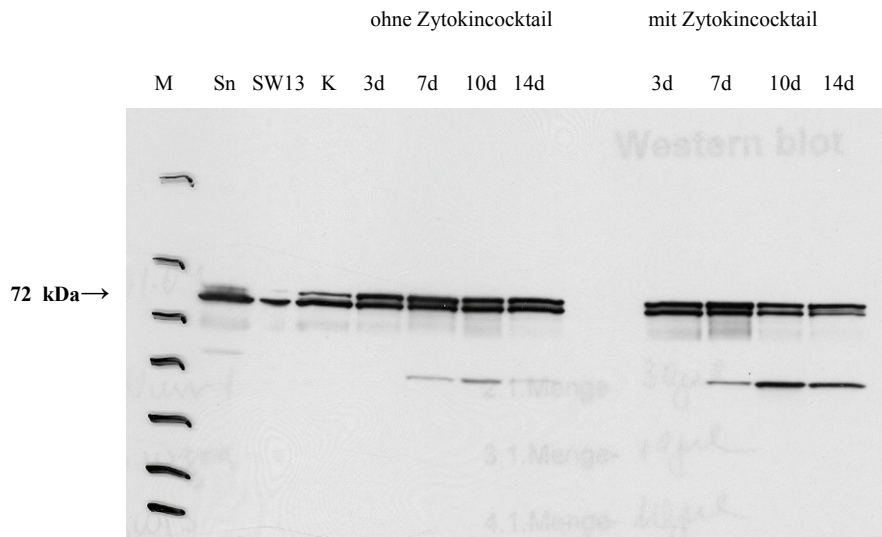


**Abb. 21:** Mittelwerte der optischen Dichten der TH Banden,  $\pm$  Standardfehler für Kontrollkulturen ( $33^{\circ}\text{C} + 10\% \text{ FCS}$ ) und für Kulturen ( $39^{\circ}\text{C} + 1\% \text{ FCS}$ ) an den Kulturtagen 3, 7, 10 und 14, die ohne Zytokincocktail oder mit Zytokincocktail kultiviert wurden. Während der Kulturdauer von 14 Tagen weisen die TH-Expression keinen Unterschied zwischen den Zellkulturen, die mit oder ohne Zytokincocktail behandelt wurden auf ( $p \geq 0,05$ ). Im Vergleich zu den Kontrollkulturen ( $33^{\circ}\text{C} + 10\% \text{ FCS}$ ) zeigen die Zellkulturen bei  $39^{\circ}\text{C}$  ohne und mit Zytokincocktail eine signifikant höhere TH-Expression ( $p^* \leq 0,001$ ).

#### GFAP:

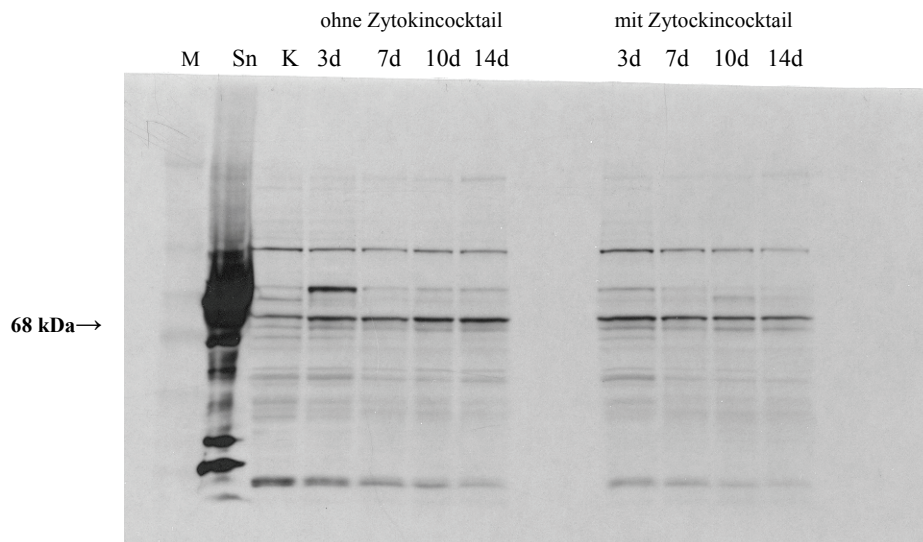
Parallel zu den neuronalen Markern wurde auch die Expression des astroglialen Markers GFAP untersucht. In Western Blots wird GFAP bei 50 kDa detektiert. In keinem der untersuchten Zelllysate von CSM14.1-Zellen, die unter verschiedenen Kulturbedingungen mit und ohne Zytokin-Gabe kultiviert wurden, konnte in den Western Blots eine GFAP-Expression nachgewiesen werden. Das entspricht den früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Haas und Wree 2002).

## Nurr1



A

## TH



B

**Abb. 22:** Western Blots von Nurr1 (A) und TH (B) von Lysaten von CSM14.1-Zellen unterschiedlicher Kulturbedingungen und Kulturdauer (K = 3 Tage, 33° C + 10% FCS; 3d, 7d, 10d, 14d: 3 - 14 Tage, 39° C + 1% FCS, ohne oder mit Zytokincocktail). Jede Probenflasche wurde mit 20 µl Lysepuffer (entsprechend 20 µg Gesamtprotein) der jeweiligen Probe gefüllt. (A): Nurr1 (~72 kDa): die zytokinbehandelten Zellen weisen an Tag 14 eine signifikant niedrige Nurr1-Expression auf (B) TH (~68 kDa): die TH-Expression nimmt am Tag 3 in den Kulturen mit und ohne Zytokincocktail zu. K = undifferenzierte CSM14.1-Zellen, Sn = Lysat aus Substantia nigra der Ratte, M = nachgetragene Banden des Proteinmarkers.



## 5. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden die *in vitro* Differenzierung der temperatursensitiv immortalisierten neuronalen CSM14.1-Zellen untersucht. Die Zellen wurden bei unterschiedlichen Kulturbedingungen kultiviert. Nach einer Kulturdauer bis zu 14 Tagen wurden sie mittels histologischer Färbungen, Immunzytochemie und Western Blots bearbeitet.

Zunächst wurde die Differenzierung der CSM14.1-Zellen bei permissiver Temperatur (33° C) und Serumreduktion (1% FCS) erfasst und die Ergebnisse mit denen von Zellen verglichen, die bei 33° C + 10% FCS kultiviert wurden. Alleinige Serumreduktion bei 33° C führte nur zu geringen morphologischen Veränderungen und, mit Ausnahme einer Reduktion der Large-T-Antigen-Expression und einer Steigerung der TH-Expression, zu relativ geringen Veränderungen in der Expression neuronaler Marker.

Im zweiten Schritt wurde das neuronale, insbesondere dopaminerge Differenzierungspotential der CSM14.1-Zellen unter den Einfluss von Zytokinen bei nicht permissiver Temperatur (39° C) und Serumreduktion (1% FCS) untersucht. Dazu wurde ein Zytokincocktail aus IL1, IL11, LIF und GDNF verwendet. Die Kulturen an Tag 14 bei 39° C + 1% FCS mit Zytokincocktail zeigten deutliche morphologische Unterschiede im Vergleich zu den Präparaten, die ohne Zytokincocktail kultiviert wurden. Die Zellen, die mit Zytokinen behandelt wurden, wiesen kleinere Perikarya auf und zeigten mehr und längere Fortsätze. Die Expression neuronaler Marker (NeuN, NSE, Nurr1, TH) wurde im Vergleich zu den Kontrollkulturen bei 33° C + 10% FCS in unterschiedlichem Ausmaß hochreguliert. Die durch eine zusätzliche Zytokin-Behandlung erzielten Veränderungen waren bezüglich der Expression neuronaler Marker eher gering. Zwischen den Kulturen ohne und mit Zytokincocktail ergaben sich signifikante Unterschiede nur bezüglich der Nurr1-Expression. Bei den zytokinbehandelten Zellkulturen war am Tag 14 die Nurr1-Expression signifikant niedriger ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1 Stammzellen und Transplantation

Bisherige Versuche zur Zelltherapie des Morbus Parkinson verwendeten hauptsächlich fetale, mesenzephalie Zellen (Freed et al. 2001). Ein für solche Verfahren limitierendes Problem stellt u.a. der Mangel an embryonalem Gewebe dar. Da nach heutigen Transplantationsprotokollen nur ca. 1 bis maximal 20% der transplantierten,

embryonalen Zellen langfristig überleben (Dunnett und Björklund 1999), wird Gewebe von mindestens vier bis acht Föten pro Striatum für eine signifikante Symptomreduktion benötigt (Brundin et al. 2000). Diese Methode mit ständigem Bedarf an humanen Föten ist für eine breite klinische Anwendung jedoch aus ethischen Gründen nicht vertretbar und kann zur Zeit nur als experimentelles Therapieverfahren eingesetzt werden (Boer 1994). Als Alternativen für humanes Gewebe wird zur Zeit vor allem der Einsatz von Xenotransplantaten oder Stammzellen untersucht. Gleichzeitig werden Wege zur Verbesserung des Überlebens des Transplantats gesucht, wie z.B. der Schutz durch neurotrophe Faktoren.

Erste Versuche mit Mittelhirn-Gewebe des Schweins als Xenotransplantat zeigten im Rattenmodell vielversprechende Ergebnisse (Galpern et al. 1996), ebenso wie erste Anwendungen bei Parkinson-Patienten (Deacon et al. 1997). Trotz der möglichen Erfolge ist die Methode der Xenotransplantation dennoch nicht unumstritten. Ein Grund ist das mögliche Auftreten von komplementvermittelten Transplantatabstoßungen (Weiss et al. 1996). Ein weiteres Risiko der Xenotransplantation ist der mögliche Transfer unbekannter, endogener Retroviren des Schweins auf den Menschen und als Folge das Auftreten von HIV-ähnlichen Epidemien (Butler 1998 a, b; Weiss et al. 1996).

Mit dem zelltherapeutischen Einsatz von embryonalen Stamm- und Vorläuferzellen bietet sich die Möglichkeit, Spendergewebe in ausreichendem Maße zu generieren.

Stammzellen sind Zellen, aus denen sich verschiedene Arten von Zelltypen entwickeln. Die sogenannten embryonalen Stammzellen sind durch ihr Potenzial, sich durch Zellteilung unlimitiert selbst zu erneuern und Zellen aller drei Keimblätter zu bilden, gekennzeichnet. Die embryonalen Stammzellen sind im Stadium der Totipotenz noch völlig undifferenziert und in der Lage, und zwar jede Zelle für sich allein, zu einem kompletten menschlichen Organismus heranzureifen. Untersuchungen haben ergeben, dass diese Fähigkeit im Vierzellstadium teilweise und im Achtzellstadium komplett verlorengegangen ist. In der weiteren Entwicklung des Embryos sind dann diese Stammzellen „nur“ noch pluripotent. Das bedeutet aber immer noch, dass sie sich in verschiedenste Organe und Körperteile zu entwickeln vermögen.

Die Nabelschnurstammzellen werden aus dem Nabelschnurblut neugeborener Kinder gewonnen und befinden sich naturgemäß in einem späteren, reiferen bzw. differenzierteren Entwicklungsstadium, in dem aus ihnen als sogenannte

gewebespezifische Vorläuferzellen nur noch bestimmte Zellarten entstehen können, z.B. aus Blutstammzellen die verschiedenen Blutkörperchen, aus Leber-, Herzmuskel- und Nervenstammzellen die entsprechenden Gewebearten. Bei dieser Entwicklung verlieren die Stammzellen dann allerdings ihre Pluripotenz und haben dann nur noch die Fähigkeit, sich in eine spezialisierte, voll ausdifferenzierte Körperzelle mit einer ganz bestimmten Aufgabe weiter zu entwickeln. Sie sind dann meist keine echten Stammzellen mehr. Die ZNS-Vorläuferzellen als Abkömmlinge embryonaler Stammzellen sind nur zu einer begrenzten Selbsterneuerung fähig, bevor sie zu Neuroblasten oder Glioblasten differenzieren (Gage 1998).

Obwohl die Pluripotenz der Stammzellen bei der Differenzierung verlorenggeht, gibt es auch im Organismus des Erwachsenen noch ruhende Stammzellen, z.B. im Blut, im Knochenmark und im Gehirn. Diese sind zwar in ihren Entwicklungsmöglichkeiten gegenüber den Stammzellen in früheren menschlichen Lebensformen (Embryo, Neugeborenes) stark eingeschränkt; man hofft aber, Wege zu finden, adulte Stammzellen wieder in das Stadium der pluripotenten Aktivität zurück zu versetzen. Das würde weitere Perspektiven für einen zelltherapeutischen Einsatz von Stammzellen bieten (Gage 2000; Temple 2001).

Für eine Therapie mit Stamm- oder Vorläuferzellen spielt aber, neben der Generierung ausreichender Zellmengen, die Möglichkeit zur gezielten Differenzierung und Prädifferenzierung der Zellen eine wichtige Rolle.

Als alternative Quelle dopaminerger Neurone für eine Zellersatztherapie beim M. Parkinson wird deren Generierung aus neuronalen Stammzellen oder Vorläuferzellen angesehen. Die neuronalen Stammzellen haben nur ein beschränktes Potenzial, sich *in vitro* weiter zu teilen. Die Immortalisierung von Vorläuferzellen des Zentralnervensystems bietet eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen. Durch die Immortalisierung bleiben die Zellen in einem kontinuierlichen Zellzyklus und gewinnen das Potenzial, einen Phenotyp ausdifferenzierter Neurone zu generieren. Durch diese ununterbrochene Zellteilung aber droht die Gefahr, dass die transplantierten Zellen einen Tumor bilden. Die Teilungsrate ist gering. Die Immortalisierung erfolgt mit viralem oder nicht viralem Gentransfer. Die am häufigsten transfizierten Gene sind Isoformen von myc, neu, p3, adenoviralem E1A und SV40 Large-T-Antigen. Diese Gene werden von der DNA der transfizierten Zellen aufgenommen und aktivieren die Gentranskription von Onkoproteinen. Diese Onkoproteine verleihen den Zellen dann ihr Potenzial, sich uneingeschränkt zu teilen

(Bartlett et al. 1988; Frederiksen et al. 1988). Bisher wurden verschiedene Zelllinien immortalisiert und untersucht: neuronale Prekursorzelllinien aus dem Hippocampus (HiB5), dem Cerebellum (C17.2), dem Hirnstamm (RN33B) oder dem Striatum und Mesenzephalon (ST14A, CSM14.1) (Renfranz et al. 1991; Whittemore und Onifer 2000; Durand et al. 1990; Shihabuddin et al. 2000; Lundberg et al. 1996; Cattaneo und Conti 1998). Ein Vorteil dieser Zelllinien besteht in der Möglichkeit weiterer Gentransfektionen. Durch diese können die Zellen bestimmte Eigenschaften gewinnen, z.B. die Expression von protektiven neurotrophen Faktoren, wie BDNF, NGF, GDNF, CNTF, NT3, NT4, bFGF (Martinez-Serrano et al. 1995, 1996; Eaton und Whittemore 1996; Cattaneo und Conti 1998) oder Enzymen wie TH (Anton et al. 1994), um die Differenzierung in Richtung des gewünschten Phenotyps zu leiten.

## **5.2 Differenzierungspotential der CSM14.1-Zellen nach Serumreduktion**

Die von uns verwendeten Progenitorzellen der Zelllinie CSM14.1 (Durand et al. 1990) sind aus dem ventralen Mesenzephalon von E14-Ratten gewonnen und immortalisiert worden. Für die Immortalisierung wurden sie mit einem retroviralen Vector transfiziert. Er enthält das Gen für das temperatursensitive Large-T-Antigen des Simian-Virus-40 (SV 40). Die immortalisierten Zellen wurden unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von DE Bredesen (University of California, San Diego, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Die optimale Temperatur für die Aktivierung des transfizierten Gens, dass das Large-T-Antigen kodiert, ist 33° C. Die andere Bedingung ist, dass das Medium (DMEM) 10% FCS erhält. So gewinnen wir für die Zellen eine Umgebung, die reich an Nährstoffen und Faktoren ist, die sie für ihre Vermehrung benötigen. Das Ziel dabei ist, eine möglichst große Menge der Stammzellen zu erhalten, die dabei keinesfalls die Eigenschaften von Stammzellen verlieren. Die Proliferation kann jeder Zeit durch die Erhöhung der Temperatur auf 39° C unterbrochen werden. Um eine Differenzierung der Zellen zu stimulieren, ist neben der Temperaturerhöhung auch eine Serumreduktion (1% FCS) im Nährmedium notwendig.

In den früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass CSM14.1-Zellen *in vitro* ein neurogenes Potenzial besitzen (Haas und Wree 2002). Sie exprimieren Nurr1, ein Protein, das direkt die Transkription des TH-Gen-Promotors reguliert. Damit wird die Entwicklung der dopaminergen Zellen reguliert und das Überleben der ventralen mesenzephalen Neurone und ihre Differenzierung zu dopaminergen Neuronen gefördert (Saucedo-Cardenas et al. 1998; Iwawaki et al.

2000).

Um die in zahlreichen Transplantationsexperimenten verwendeten CSM14.1-Zellen (Petrov et al., 2004) noch besser *in vitro* zu charakterisieren, untersuchten wir ihre weiteren Eigenschaften bei modifizierten Kulturbedingungen (33° C) und Serumreduktion (1% FCS). Obwohl mit der Serumreduktion im Medium nur eine Bedingung für die Zelldifferenzierung vorhanden war, konnten wir zahlreiche Veränderungen in den so behandelten Zellen nachweisen. Die Expression des immortalisierenden Genprodukts Large-T-Antigen nimmt am Kulturtag 10 stark ab und ist am Tag 14 in noch geringerer Menge nachweisbar ( $p \leq 0,05$ ). Diese Ergebnisse korrelieren mit der zunehmenden Zellzahl bis zum 10. Tag. Während dieser Zeit konnten auch Mitosen beobachtet werden. Diese Befunde sind unterschiedlich im Vergleich mit den Ergebnissen von Haas und Wree (2002), die in CSM14.1-Kulturen (39° C + 1% FCS) das Large-T-Antigen schon am Kulturtag 3 nicht mehr nachweisen konnten. Es kann daraus geschlossen werden, dass die Regulation des Large-T-Antigens primär durch den Temperaturwechsel auf die nicht permissive Temperatur erfolgt.

Die Morphologie der CSM14.1-Zellen unter modifizierten Bedingungen (33° C + 1% FCS) war gegenüber Zellen, die bei 33° C + 10% FCS kultiviert wurden, kaum verändert. Die flachen, epithelialen Zellen bildeten nur wenige kurze Ausläufer aus. Die Untersuchung von neuronalen und glialen Markern zeigte, dass die Zellen in einem prädifferentiierten Zustand bleiben. Die immunzytochemische Anfärbung für Marker unreifer Neurone (Nestin und MAP5) blieb unverändert. Der neuronale Marker NeuN nahm im Western Blot am Tag 3 leicht zu und blieb dann unverändert. Auch eine geringe Zunahme von NSE liess sich im Western Blot ab Tag 3 nachweisen. Eine sehr geringe (statistisch nicht signifikante) Zunahme der Nurr1-Expression und eine statistisch signifikante Zunahme der TH-Expression wurden nach Serumreduktion auf 1% FCS in den Western Blots beobachtet. Für TH zeigte sich eine statistisch signifikante ( $p \leq 0,05$ ) Zunahme der TH-Expression am 7. und 10. Kulturtag.

Die Untersuchungen der CSM14.1-Zellen, kultiviert bei 33° C + 1% FCS, zeigten gegenüber Zellen, die bei 33° C + 10% FCS kultiviert wurden, nur relativ geringe Veränderungen in der Expression neuronaler Marker. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen berichten Haas und Wree (2002), dass es bei CSM14.1-Zellen unter nicht permissiven Bedingungen (39° C + 1% FCS) zu einer starken neuronalen und dopaminergen Differenzierung kommt. Es kann daraus geschlossen werden, dass die

alleinige Serumreduktion auf 1% FCS bei permissiver Temperatur nur einen geringen Stimulus für eine neuronale, insbesondere dopaminerge Differenzierung darstellt. Damit die CSM14.1-Zellen sich weiter zu dopaminergen Neuronen differenzieren können, brauchen sie offensichtlich neben der Serumreduktion (1% FCS) eine Temperaturerhöhung auf 39° C.

Zu keinem Zeitpunkt wurde eine GFAP-Expression nachgewiesen. Auch Haas und Wree (2002) konnten in ihren Experimenten keine GFAP-Expression beobachten.

### **5.3 CSM14.1-Zellen und neurotrophe Faktoren**

Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Transplantation mit CSM14.1-Zellen in die Substantia nigra von unilateral mit 6-Hydroxydopamin läsierten Hemiparkinsonratten zeigte, dass CSM14.1-Zellen sich dort erfolgreich integrieren und überleben (drei Monate nach der Transplantation) und sich zu Neuronen oder Gliazellen differenzieren. Transplantierte CSM14.1-Zellen bilden keine Tumore im Wirtsgewebe (Petrov et al., 2004). Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass die CSM-14.1 Zellen *in vitro* den neurotrophen Faktor GDNF produzieren (Petrov et al. 2004; Haas et al. 2005).

GDNF ist ein neurotropher Faktor, der in zahlreichen Studien in Tiermodellen des Morbus Parkinson untersucht wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass GDNF neuroprotektive (verabreicht vor der Läsion) und neuroregenerative (verabreicht nach der Läsion) Eigenschaften besitzt. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass beim Morbus Parkinson infolge von GDNF Einwirkung der Prozess des dopaminergen Zellverlustes verlangsamt, verhindert oder gar rückgängig gemacht werden könnte. Die Transplantation von neuronalen Stammzellen und gleichzeitige Behandlung mit GDNF wurde (im Vergleich zu fehlender GDNF-Gabe) als potenter und erfolgreicher bei diesen Patienten angesehen (Kearns et al. 1997; Aebischer und Ridet 2001; Tuszynski et al. 2002; Gill et al. 2003; Kirik et al. 2004).

GDNF steigert die Menge der überlebenden Zellen nach einer neuronalen Transplantation in verschiedenen Regionen des ZNS (Rosenblad et al. 1999; Trok et al. 1996; Granholm et al. 1997; Sautter et al. 1998). Im Striatum steigert GDNF auch die Funktionalität der nigralen DA-Transplantate (Rosenblad et al. 1999; Granholm et al. 1997; Sautter et al. 1998). Es wurde nachgewiesen, dass GDNF einen spezifischen trophischen Effekt auf DA-Neurone besitzt (Lin et al. 1993; Beck et al. 1995; Nakao et al. 2000). GDNF führte zu einem verbesserten Überleben der dopaminergen Neurone,

einem Auswachsen dopaminerger Fasern und einer Verbesserung von Verhaltensdefiziten nach intrastriatalen Injektionen des Proteins (Tomac et al. 1995; Aoi et al. 2000 und 2001; Kirik et al. 2001) oder nach intranigraler (Hoffer et al. 1994; Kearns und Gash 1995; Lapchak et al. 1997) bzw. intrazerebroventrikulärer GDNF-Gabe (Bowenkamp et al. 1995; Kirik et al. 2001). Eine Vorbehandlung mit GDNF hat einen neuroprotektiven Effekt gegen 6-OHDA- (Kearns und Gash 1995; Sauer et al. 1995; Shults et al. 1996) und 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-Läsionen (Tomac et al. 1995) und gegen die Transektion des Tractus nigrostriatalis (Beck et al. 1995).

Als Alternative zu der direkten Infusionen des Proteins wurden GDNF-produzierende Zellen (Fibroblasten, P19 Karzinomazellen, Astrozyten oder Nierenzellen) in das Striatum oder die Substantia nigra bei Parkinsonmodellen der Ratte implantiert und gezeigt, dass dies einen nigralen dopaminergen Neuronentod nach Läsion verhindert (Linder et al. 1995; Akerud et al. 2001; Nakao et al. 2000; Cunningham und Su 2002). Eine andere Möglichkeit ist die Transplantation von GDNF-transfizierten neuronalen Stammzellen oder Knochenmarkzellen in Rattenmodelle des Morbus Parkinson. Hier wurde auch eine Verhaltensbesserung und eine Blockierung der läsionsbedingten dopaminergen Degeneration nachgewiesen (Akerud et al. 2001; Park et al. 2001; Gouhier et al. 2002).

Die GDNF-exprimierende CSM14.1-Progenitorzelllinie ist ein gutes Beispiel für eine Zelllinie, die sowohl in einer Zellersatztherapie eingesetzt werden könnte als auch als Quelle eines neurotrophen Faktors, von dessen neuroprotektiver Wirkung die transplantierten Zellen selber sowie die gehirneigenen Zellen profitieren können und mit deren Hilfe neue therapeutische Strategien, die die Neuroprotektion und die Neuroregeneration als Ziel haben, entwickelt werden können.

Andere neurotrophe Faktoren wurden auch als Zusatz zu Kulturmedien verwendet. Auf diese Weise wirkten sie als Stimulanz auf die neuronale Differenzierung und als Unterstützung des Überlebens von Neuronen. Es wurde der Einfluss unterschiedlicher Neurotrophine untersucht. EGF und bFGF wirken zusammen *in vitro* stimulierend auf die Proliferation der embryonalen Stammzellen und der aus Hippokampus und Bulbus olfactorius stammenden Zelllinien (Vescovi et al. 1993; Weiss et al. 1996; Svendsen et al. 1997). bFGF allein wirkt als Mitogen für unipotente und multipotente neuronale und gliale Progenitoren (Murphy et al. 1990; Vescovi et al. 1993; Ray und Gage 1994; Kilpatrick und Bartlett 1995; Palmer et al. 1995), und EGF fördert die Generierung

von Gliazellen nach der Transplantation im Rattengehirn (Winkler et al. 1998). Die Kombination von EGE, bFGE und LIF wurde von Fricker et al. (1999) für die Stimulation von humanen Progenitorzelllinien benutzt. Barberi et al. (2003) benutzten ein BDNF-angereichertes Medium, um die dopaminerge Differenzierung der untersuchten Zelllinie (MS5) anzuregen.

Burnstein et al. (2004) und Le Belle et al. (2004) arbeiteten mit menschlichen neuronalen Progenitorzellen (HNPCs), gewonnen aus embryonalem Kortex. Das Medium, das sie verwendeten, enthielt NT4. Die Behandlung mit diesem Medium erfolgte kurz vor der Transplantation, damit die Zellen einen prädifferentiierten Zustand erreichten. Die prädifferentiierten oder undifferentiierten HNPCs- Zellen wurden in die Substantia nigra des Rattenmodells des Morbus Parkinsons transplantiert. 12 Wochen nach der Transplantation wurden die histologischen und funktionellen Ergebnisse verglichen. Die Proben mit prädifferentiierten Zellen enthielten eindeutig mehr Neurone und Gliazellen. Auch zeigten die Tiere, die mit prädifferentiierten Zellen transplantiert wurden, eine verstärkte funktionelle Besserung im Rotationsverhalten.

#### **5.4 CSM14.1-Zellen und Zytokincocktail**

Andere Arbeitsgruppen untersuchten den Einfluss von Zytokinen auf neuronale und dopaminerge Differenzierung *in vitro*. Es werden zwei Zytokin-Superfamilien unterschieden: die TGF  $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ )-Familie und die Familie der Hämopoetine. Die letzteren werden auch hämolympopoetische Zytokine genannt. Zu ihnen gehören die Interleukine, die in erste Linie von Lymphozyten produziert werden. Die Zytokine haben zusammen mit den Neurotrophen einen bedeutenden Einfluss auf die Entwicklung des ZNS (Mehler et al. 1993). Ling et al. (1998) untersuchten *in vitro* 19 Interleukine und deren Einfluss auf Progenitorzellen, die aus der Germinalzone des embryonalen Mesenzephalons der Ratte isoliert wurden. Hier formieren sich die dopaminergen Neurone während der normalen Entwicklung (Specht et al. 1981; Ptak et al. 1995; Santa-Olalla und Covarrubias 1995). Bei gewöhnlichen Kulturbedingungen *in vitro* ohne Interleukinzusatz differenzieren sich diese Zellen selten zu dopaminergen Neuronen. Wurden die Interleukine als einzelne Substanzen dem Medium zugefügt, war nur IL1 in der Lage, in den Progenitorzellen eine erhöhte TH-Expression zu induzieren. Von den verschiedenen getesteten Cocktails aus den 19 Zytokinen zeigte nur der Cocktail aus IL1, IL11, LIF und GDNF eine noch stärkere



Erhöhung der Anzahl TH-positiver Zellen in den mesenzephalen Kulturen. Die mit dem Cocktail aus IL1, IL11, LIF und GDNF behandelten Zellen besaßen (verglichen mit Kulturen ohne Zytokin-Behandlung) längere Fortsätze und ähnelten morphologisch multipolaren dopaminergen Neuronen.

Der in der Studie von Ling et al. (1998) beschriebene Einfluss von IL1 auf die neuronale Differenzierung ist nachvollziehbar, weil viele hämatopoetische Zytokine, auch die Interleukine, im fetalen Gehirn während der Entwicklung nachweisbar sind (Hynes und Rosenthal 1999, 2000; Jessell und Dodd 1990; Kilpatrick und Bartlett, 1995; McKay 1999; Temple 2001). Der trophische Effekt von IL1 auf dopaminerge und katecholaminerge Neurone wurde bereits in *in vitro* und *in vivo* Experimenten nachgewiesen (Nakao et al. 2000).

IL1 stimuliert die Expression des gp130-Rezeptors, über den dann IL11 und LIF wirken können (Watanabe et al. 1996). Deshalb ist auch erklärbar, dass bei einem Mangel an IL1 eine Wirkung von IL11 und LIF nicht nachweisbar ist (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999)

Wie oben beschrieben, ist GDNF ein trophischer Faktor dopaminerger Neurone. GDNF induziert auch die Aktivität von Tyrosinkinase über die Aktivierung des ret-Rezeptors (Durbec et al. 1996; Jing et al. 1996; Trupp et al. 1997). Der Cocktail von IL1, IL11, LIF und GDNF und seine Wirkung auf die neuronale und dopaminerge Differenzierung der Progenitorzelllinien wurde bisher nur bei mesenzephalen subependymalen Progenitorzellen untersucht (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999; Carvey et al. 2001; Storch et al. 2001). Die zytokinbehandelten Kulturen dieser Autoren wurden immunreaktiv für TH, DA, Dopadecarboxylase und DA-Transporter, und die Morphologie von > 75% der Zellen zeigte multipolare Somata und lange Fortsätze: morphologisch ähnelten sie TH-Neuronen. Bei der Klonlinie MPC-C9 wurde die gesteigerte TH-Expression durch eine gesteigerte Nurr1-Expression unterstützt (Carvey et al. 2001). Zusätzliche *in vivo* Experimente wurden von Carvey et al. (2001) durchgeführt. Sie transplantierten prädifferentiierte Progenitorzellen der Klonlinie MPC-C9, die mit dem Zytokincocktail für 5 Stunden oder 3 Tage behandelt und dann transplantiert wurden. Die Rotationsergebnisse nach der Transplantation zeigten eine deutliche Reduktion der Rotationsasymmetrie, die Ergebnisse der beiden Zytokinexpositionszeiten (5 Stunden oder 3 Tage) differierten dabei nicht.

Die bisherigen Experimente unserer Arbeitsgruppe mit den CSM14.1-Zellen zeigten

bereits vielversprechende Ergebnisse: eine neuronale und dopaminerge Differenzierung *in vitro* und *in vivo*, die Expression des neurotrophen Faktors GDNF und einen therapeutischen Effekt nach Transplantation (Haas und Wree 2002; Petrov et al. 2004).

Insbesondere um den therapeutischen Effekt nach der Transplantation zu verbessern, ist eine Prädifferenzierung der zu transplantierenden Zellen von großem Interesse (Studer et al. 1998; Kawasaki et al. 2000; Sanchez-Pernaute et al. 2001; Sawamoto et al. 2001a, b; Storch et al. 2001, Barberi et al. 2003). Deshalb schien es sinnvoll, mit dem Einsatz eines Zytokincocktails zu versuchen, den gewünschten TH-Phänotyp vor der Transplantation verstärkt zu induzieren. Funktionelle Verbesserungen im Nagetiermodell des M. Parkinson konnten insbesondere in Studien nachgewiesen werden, die Zytokincocktails und angereicherte Populationen von aus neuronalen oder embryonalen Stammzellen prädifferentiierten dopaminergen Vorläufer zur Transplantation verwendeten (Studer et al. 1998; Kawasaki et al. 2000; Sanchez-Pernaute et al. 2001; Sawamoto et al. 2001a, b; Storch et al. 2001, Barberi et al. 2003).

In der vorliegenden Studie wurde deshalb untersucht, ob der Zytokincocktail aus IL1, IL11, LIF und GDNF eine stärkere und/oder schnellere dopaminerge Differenzierung der immortalisierten Progenitorzelllinie CSM14.1 *in vitro* hervorruft.

Der von uns verwendete Zytokincocktail enthielt: IL1–100 pg/ml, IL11-1 ng/ml, LIF 1ng/ml, GDNF-10ng/ml. Die CSM14.1-Progenitorzelllinie wurde *in vitro* hinsichtlich ihrer neuronalen, insbesondere dopaminergen Differenzierung untersucht. Es wurden zwei Zellkultur-Gruppen, solche ohne Zytokin-Gabe und solche mit Zytokin-Gabe bei 39° C + 1% FCS mittels histologischer und immunzytochemischer Färbungen und Western Blot qualitativ und quantitativ untersucht.

Die Morphologie der Zellen, die unter Zytokineinfluss gezüchtet wurden, zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Zellen, die ohne Zytokinmedium kultiviert wurden. Die Somata der Zellen beider Kulturen ähnelten multipolaren Neuronen. Die deutlichsten morphologischen Unterschiede wurden am Tag 14 beobachtet. Die Zellfläche, die Zelldichte und die Zellfortsatzlänge wurden bestimmt. In den Zellkulturen ohne Zytokin-Gabe kamen signifikant mehr Zellen pro mm<sup>2</sup> vor als in den Zellkulturen, die Zytokine erhielten (p = 0,001). Die Größe der Perikarya (Zellfläche) beider Versuchsansätze war nicht signifikant unterschiedlich. Die Kulturen, die mit Zytokincocktail behandelt wurden, wiesen jedoch eine signifikant größere

Zellfortsatzlänge auf ( $p = 0,02$ ).

Die Zytokine führen somit zu einem stärkeren Fortsatzwachstum und zu einer typischen Neuronenmorphologie. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von vorherigen Studien überein (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999; Carvey et al. 2001; Storch et al. 2001), durchgeführt an mesenzephalen subependymalen Progenitorzellen. In diesen Studien wurde gezeigt, dass der auch von uns verwendete Zytokincocktail die Zellreifung stimulierte, die Fortsatzbildung positiv beeinflusste und darüber hinaus zu Zellveränderungen führte, die typisch für dopaminerge Neurone waren. Es kann gefolgert werden, dass die CSM14.1-Zellen auf die Behandlung mit dem Zytokincocktail in ähnlicher Weise wie die mesenzephalen subependymalen Progenitorzellen (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999; Carvey et al. 2001; Storch et al. 2001) reagieren.

Die Expressionsveränderungen neuronaler Marker wurden in den Zellkulturen bei 39° C + 1% FCS (ohne und mit Zytokincocktail) beobachtet. Schon bei fehlender Zytokin-Behandlung wurde NeuN am Tag 3 vermehrt gebildet und blieb konstant bei 39° C + 1% FCS während der Kulturdauer von 14 Tagen. In den zytokinbehandelten Kulturen wurde die NeuN-Expression ebenfalls ab dem Tag 3 hochreguliert. Die zytokinbehandelten Kulturen zeigten am Tag 3 eine leicht verstärkte NSE-Expression im Vergleich zu den Zellkulturen, die ohne Zytokine kultiviert wurden. Ein deutlicher Unterschied zwischen den zytokinbehandelten und nicht behandelten Zellkulturen konnte jedoch für NSE nicht nachgewiesen werden. Die Behandlung mit dem Zytokincocktail hatte somit keinen wesentlichen Einfluss auf die NeuN- und NSE-Expression. CSM14.1-Zellen differenzieren sich bei 39° C + 1% FCS weitgehend unabhängig von der Zytokin-Gabe in Neurone.

Die Nurr1-Expression nahm während des untersuchten Zeitraums (14 Tage) in den Kulturen ohne Zytokincocktail zu und war gegenüber den Kontrollen (33° C + 10% FCS) signifikant erhöht. Dieses Phänomen war auch in den zytokinbehandelten Zellkulturen nachweisbar; nur am Tag 14 zeigten die zytokinbehandelten Kulturen eine deutliche Abnahme der Nurr1-Expression. Im Vergleich mit den Kulturen, die ohne Zytokine gezüchtet wurden, wiesen die Kulturen mit dem Zytokincocktail am Tag 14 eine geringere Nurr1-Expression (OD:  $p = 0,006$ , OF:  $p = 0,01$ ) auf. Eine zunehmende Expression von Nurr1 unter dem Einfluss von Zytokinen wurde bisher nur für die Klonlinie MPC-C9 (mesenzephal subependymale Progenitorzellen) nachgewiesen (Carvey et al. 2001). Die Befunde von Carvey et al. (2001) wurden

jedoch mit immunzytochemischen Methoden erhoben und beziehen sich lediglich auf eine Kulturdauer von 3 Tagen, so dass sie mit den Western Blot-Ergebnissen unserer Langzeitkulturen nicht direkt verglichen werden können. Insgesamt kann jedoch festgestellt werden, dass die Behandlung mit dem Zytokincocktail bei 39° C + 1% FCS keinen stärksten Einfluss auf die Expression von Nurr1 in den immortalisierten CSM14.1-Progenitorzellen hat. Dem gegenüber hat die Erhöhung der Kulturtemperatur von 33° C auf 39° C bei gleichzeitiger Serumreduktion einen hochsignifikanten Einfluss auf die Expression von Nurr1: eine Kultur bei nicht permissiver Temperatur (39° C) erhöht die Nurr1-Expression ( $p \leq 0,001$ ) (Abb. 21). Dieser durch Quantifizierung validierte Befund bestätigt und ergänzt bisherige Aussagen von Haas und Wree (2002). Für eine Hochregulation von Nurr1 ist somit primär die Temperaturerhöhung und nicht die Serumreduktion verantwortlich, da eine Serumreduktion auf 1% FCS ohne Temperaturerhöhung die Nurr1-Expression nicht verändert (Abb. 10).

Die TH-Expression nahm während der untersuchten Periode (14 Tage) in den Kulturen ohne Zytokincocktail bei 39° C + 1% FCS gegenüber den Kontrollen (33° C + 10% FCS) signifikant zu ( $p \leq 0,001$ ) (Abb. 21). Dieses Phänomen war auch in den zytokinbehandelten Zellkulturen nachweisbar ( $p \leq 0,001$ ). Der Vergleich der Kulturen, die bei 39° C + 1% FCS ohne oder mit Zytokinen gezüchtet wurden, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der TH-Expression. Untersuchungen zur TH-Expression mesenzephaler subependymaler Progenitorzellen unter einer Zytokin-Behandlung ergaben dagegen eine deutliche Zunahme der TH-Immunreaktivität unter dem Einfluss des auch von uns verwendeten Zytokincocktails (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999; Carvey et al. 2001; Storch et al. 2001). Diese Befunde beziehen sich auf eine Kulturdauer unter Zytokin-Einfluss von 5 Stunden bis zu 3 Tagen.

Es muss festgestellt werden, dass in den immortalisierten CSM14.1-Progenitorzellen die Behandlung mit dem Zytokincocktail bei 39° C + 1% FCS keinen zusätzlichen Einfluss auf die Expression von TH hat. Die Erhöhung der Kulturtemperatur von 33° C auf 39° C bei gleichzeitiger Serumreduktion steigert die Expression von TH jedoch signifikant ( $p \leq 0,001$ ) (Abb. 21). Mit den vorliegenden Ergebnissen können entsprechende Befunde von Haas und Wree (2002) bestätigt und durch Quantifizierung statistisch gesichert werden. Dass neben einer Temperaturerhöhung auch eine alleinige Serumreduktion bei permissiver Temperatur eine Hochregulation von TH verursacht,

kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit geschlossen werden: Serumreduktion auf 1% FCS ohne Temperaturerhöhung steigert die TH-Expression (Abb. 12). Die durch eine Temperaturerhöhung oder eine alleinige Serumreduktion bei permissiver Temperatur verursachten Steigerungen der TH-Konzentration sind vergleichbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Zytokin-Behandlung der Kulturen die Morphologie der CSM14.1-Zellen deutlich im Sinne einer stärkeren neuronalen Differenzierung beeinflusst, die Expression der untersuchten neuronalen Marker dagegen nur gering.

Für diese scheinbare Diskrepanz können verschiedene Erklärungen diskutiert werden. Es muss betont werden, dass in der Literatur bisher keine temperatursensitiv immortalisierten Zellen bei nicht permissiver Temperatur auf den Einfluss von Zytokinen hin untersucht wurden. Insofern ist der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Versuchsansatz neu und nicht in Literaturbefunde direkt einzuordnen. Die Literaturangaben zu Zytokineffekten beziehen sich auf Zellsysteme, die zwar immortalisiert waren, aber permanent bei 37° C gezüchtet wurden. In diesen normothermen Systemen ist der Einfluss einer Zytokin-Behandlung deutlich im Sinne einer verstärkt induzierbaren neuronalen und dopaminergen Differenzierung erkennbar (Ling et al. 1998; Potter et al. 1999; Carvey et al. 2001; Storch et al. 2001).

In unserem System, in dem die Zytokin-Behandlung zusammen mit der Temperaturerhöhung vorgenommen wurde, um zusätzlich zum teilweise bekannten Effekt einer Temperaturerhöhung einen eventuellen additiven Effekt durch Zytokine zu erreichen, scheint die durch die alleinige Temperaturerhöhung auf 39° C (ohne Zytokine) induzierbare verstärkte Expression der untersuchten neuronalen Marker so umfangreich zu sein, dass sie durch die zusätzliche Gabe von Zytokinen nicht weiter gesteigert werden kann.

Das morphologisch sichtbare Differenzierungspotenzial der CSM14.1-Zellen scheint von der Expression neuronaler Marker unabhängig reguliert zu werden. Alleinige Temperaturerhöhung auf 39° C (ohne Zytokine) führt schon zu einer ausgeprägten Fortsatzbildung der CSM14.1-Zellen. Eine zusätzliche Zytokin-Behandlung hat bezüglich dieses Parameters einen signifikanten additiven Effekt. Zukünftigen Untersuchungen muss es vorbehalten bleiben, die Signaltransduktionskaskade, die für

diesen Zytokin-Effekt verantwortlich sein könnte, zu klären.

## 6. Literaturverzeichnis

Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S (1979) Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204: 1434-1436

Aebischer P, Ridet J (2001) Recombinant proteins for neurodegenerative diseases: the delivery issue. *Trends Neurosci* 24: 533-540

Aebischer P, Tresco PA, Sagen J, Winn SR (1991) Transplantation of microencapsulated bovine chromaffin cells reduces lesion-induced rotational asymmetry in rats. *Brain Res*: 43-49

Airaksinen MS, Saarma M (2002) The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3: 383-394

Akerud P, Canals JM, Snyder EY, Arenas E (2001) Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cell in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 21: 8108-8118

Allan SM, Rothwell NJ (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2: 734-744

Aloisi F, Rosa S, Testa U, Bonsi P, Russo G, Peschle C, Levi G (1994) Regulation of leukemia inhibitory factor synthesis in cultured human astrocytes. *J Immunol* 152: 5022-5031

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

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

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

Aoi M, Date I, Tomita S, Ohmoto T (2000) GDNF induces recovery of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Acta Neurochir* 142: 805-810

Aoi M, Date I, Tomita S, Ohmoto T (2001) Single administration of GDNF into the striatum induced protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system in the intrastriatal 6-hydroxydopamine injection model of hemiparkinsonism. *Restor Neurol Neurosci* 17: 31-38

Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL (1995) Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1908-1915

Azzarelli B, Miravalle L, Vidal R (2004) Immunolocalization of the oligodendrocyte transcription factor 1 (Olig1) in brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 170-179

Bachoud-Levi AC, Remy P, Nguyen JP, Brugieres P, Lefaucheur JP, Bourdet C, Baudic S, Gaura V, Maison P, Haddad B, Boisse MF, Grandmougin T, Jeny R, Bartolomeo P, Dalla Barba G, Degos JD, Lisovoski F, Ergis AM, Pailhous E, Hantraye P, Cesaro P, Peschanski M (2000) Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356: 1945-1946

Bakardjiev A (1997) Biosynthesis of carnosine in primary cultures of rat olfactory bulb. *Neurosci Lett* 227: 115-118



Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J (1998) Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron* 21: 1291-1302

Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM, Milbrandt J (2000) The GDNF family ligands and receptors-implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 10: 103-110

Bannon MJ, Pruetz B, Manning-Bog AB, Whitty CJ, Michelhaugh SK, Sacchetti P, Granneman JG, Mash DC, Schmidt CJ (2004) Decreased expression of the transcription factor NURR1 in dopamine neurons of cocaine abusers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 6382-6385

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 Biotechnol* 21: 1200-1207

Bartlett PF, Reid HH, Bailey KA, Bernard O (1988) Immortalization of mouse neural precursor cells by the c-myc oncogene. *PNAS* 85: 3255-3259

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

Bernhardt R, Matus A (1984) Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol* 226: 203-221

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

Björklund L, Spenger C, Strömberg I (1997) Tirilazad mesylate increases dopaminergic neuronal survival in the oculo grafting model. *Exp Neurol* 148: 324-333

Black MM, Slaughter T, Fischer I (1994) Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *J Neurosci* 14: 857-870

Bloom GS, Endow SA (1995) Motor proteins 1: kinesins. *Protein Profile* 2: 1105-1171

Boer CJ (1994) Ethical guidelines for experimental and clinical neurotransplantation and research. Network of european CNS transplantation and restoration (NECTAR). *J Neurol* 242: 1-13

Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278: 477-483

Bowenkamp KE, Hoffman AF, Gerhardt GA, Henry MA, Biddle PT, Hoffer BJ, Granholm ACE (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. *J Comp Neurol* 355: 479-489

Boyne LJ, Martin K, Hockfield S, Fischer I (1995) Expression and distribution of phosphorylated MAP1b in growing axons of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 40: 439-450

Bradke F, Dotti CG (1997) Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron* 19: 1175-1186

Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A (2001) Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet* 27: 117-120

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 (1998) Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarooids in Parkinson's disease. *Brain* 123: 1380-1390

Brundin P, Karlsson J, Emgard M, Schierle GS, Hansson O, Petersen A, Castilho RF (2000) Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transplant* 9: 179-195

Buervenich S, Carmine A, Arvidsson M, Xiang F, Zhang Z, Sydow O, Jonsson EG, Sedvall GC, Leonard S, Ross RG, Freedman R, Chowdari KV, Nimgaonkar VL, Perlmann T, Anvret M, Olson L (2000) NURR1 mutations in cases of schizophrenia and manic-depressive disorder. *Am J Med Genet* 96: 808-813

Butler D (1998a) Last chance to stop and think on risk of xenotransplants. *Nature* 391: 320-324

Butler D (1998b) Poll reveals backing for xenotransplants. *Nature* 391: 315

Burnstein RM, Foltynie T, He X, Menon DK, Svendsen CN, Caldwell MA (2004) Differentiation and migration of long term expanded human neural progenitors in a partial lesion model of Parkinson's disease. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 702-713

Burstein SA, Mei RL, Henthorn J, Friese P, Turner K (1992) Leukemia inhibitory factor and interleukin-11 promote maturation of murine and human megakaryocytes in vitro. *J Cell Physiol* 153: 305-312

Cáceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M (1984) MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Dev Brain Res* 13: 314-318

Cáceres A, Banker GA, Binder L (1986) Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 6: 714-722

Calvert R, Anderton BH (1985) A microtubule-associated protein (MAP1) which is expressed at elevated levels during development of the rat cerebellum. *EMBO J* 4: 1171-1176

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

Carman-Krzan M, Vige X, Wise BC (1991) Regulation by interleukin-1 of nerve growth factor secretion and nerve growth factor mRNA expression in rat primary astroglial cultures. *J Neurochem* 56: 636-643

Carlson CD, Bai Y, Jonakait GM, Hart RP (1996) Interleukin-1 beta increases leukemia inhibitory factor mRNA levels through transient stimulation of transcription rate. *Glia* 18: 141-151

Carlson CD, Hart RP (1996) Activation of acidic sphingomyelinase and protein kinase C zeta is required for IL-1 induction of LIF mRNA in a Schwann cell line. *Glia* 18: 49-58

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

Casamenti F, Prosperi C, Scali C, Giovannelli L, Pepeu G (1998) Morphological, biochemical and behavioural changes induced by neurotoxic and inflammatory insults to the nucleus basalis. *Int J Dev Neurosci* 16: 705-714

Castillo SO, Baffi JS, Palkovits M, Goldstein DS, Kopin IJ, Witta J, Magnuson MA, Nikodem VM (1998) Dopamine biosynthesis is selectively abolished in substantia nigra/ventral tegmental area but not in hypothalamic neurons in mice with targeted disruption of the *Nurr1* gene. *Mol Cell Neurosci* 11: 36-46

Cattaneo E, McKay R (1990) Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347: 762-765

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

- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N (1992) Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360: 674-677
- Cheng A, Krueger BK, Bambrick LL (1999) MAP5 expression in proliferating neuroblasts. *Brain Res Dev Brain Res* 113: 107-113
- 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
- Choi-Lundberg DL, Bohn MC (1995) Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. *Brain Res Dev Brain Res* 85: 80-88
- Chou YH, Khuon S, Herrmann H, Goldman RD (2003) Nestin promotes the phosphorylation-dependent disassembly of vimentin intermediate filaments during mitosis. *Mol Biol* 14: 1468-1478
- Coons AH, Kaplan MH (1950) Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J Exp Med* 91: 1-13
- Coons AH, Leduc EH, Connolly JM (1955) Studies on antibody production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J Exp Med* 102: 49-60
- Cooper EH (1994) Neuron-specific enolase. *Int J Biol Markers* 9: 205-210
- Crandall JE, Jacobson M, Kosik KS (1986) Ontogenesis of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in embryonic mouse cortex. *Dev Brain Res* 28: 127-133
- Crossley PH, Martinez S, Martin GR (1996) Midbrain development induced by FGF8 in the chick embryo. *Nature* 380: 66-68
- Cunningham LA, Su C (2002) Astrocyte delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 174: 230-42

Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RDG, Lendahl U (1992) Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Neurosci* 103: 589-597

Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U (1995) Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 84: 109-129

Day IN, Thompson RJ (1984) Levels of immunoreactive aldolase C, creatine kinase-BB, neuronal and non-neuronal enolase, and 14-3-3 protein in circulating human blood cells. *Clin Chim Acta* 136: 219-228

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

de Armond SJ, Eng LF, Rubinstein LJ (1980) The application of glial fibrillary acidic (GFA) protein immunohistochemistry in neurooncology. A progress report. *Pathol Res Pract* 168: 374-394

Deck JH, Eng LF, Bigbee J, Woodcock SM (1978) The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 42: 183-190

Deloulme JC, Lucas M, Gaber C, Bouillon P, Keller A, Eclancher F, Sensenbrenner M (1996) Expression of the neuron-specific enolase gene by rat oligodendroglial cells during their differentiation. *J Neurochem* 66: 936-945

Deloulme JC, Helies A, Ledig M, Lucas M, Sensenbrenner M (1997) A comparative study of the distribution of alpha- and gamma-enolase subunits in cultured rat neural cells and fibroblasts. *Int J Dev Neurosci* 15: 183-194

Dinareello CA (1998) Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol*: 457-499 Review

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

DiTella MC, Feiguin F, Carri N, Kosik KS, Caceres A (1996) MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* 109: 467-477

Dotti CG, Banker GA, Binder LI (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* 23: 121-130

Dotti MT, Plewnia K, Cardaioli E, Manneschi L, Rufa A, Alema G, Federico A (1998) A case of ethambutol-induced optic neuropathy harbouring the primary mitochondrial LHON mutation at nt 11778. *J Neurol* 245: 302-303

Duffy PE (1982) Glial fibrillary acidic protein and induced differentiation of glia *in vitro*. *J Neurol Sci* 53: 443-460

Dunnett SB, Björklund A (1999) Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 399: A32-39

Dunnett SB, Björklund A, Lindvall O (2001) Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2: 365-369

Duprey P, Paulin D (1995) What can be learned from intermediate filament gene regulation in the mouse embryo. *Int J Dev Biol* 39: 443-457

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

Durbec PL, Larsson-Blomberg LB, Schuchardt A, Costantini F, Pachnis V (1996) Common origin and developmental dependence on c-ret of subsets of enteric and sympathetic neuroblasts. *Development* 122: 349-358

Dyer CA, Kendler A, Jean-Guillaume D, Awatramani R, Lee A, Mason LM, Kamholz J (2000) GFAP-positive and myelin marker-positive glia in normal and pathologic environments. *J Neurosci Res* 60: 412-426

Eaton MJ, Whittemore SR (1996) Autocrine BDNF secretion enhances the survival and serotonergic differentiation of raphe neuronal precursor cells grafted into the adult rat CNS. *Exp Neurol* 140: 105-114

Ebneth A, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E (1999) Phosphorylation of MAP2c and Map4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 44: 209-224

Eckenstein FP, Esch F, Holbert T, Blacher RW, Nishi R (1990) Purification and characterization of a trophic factor for embryonic peripheral neurons: comparison with fibroblast growth factors. *Neuron* 4: 623-631

Edelmann W, Zervas M, Costello P, Roback L, Fischer I, Hammarback JA, Cowan N, Davies P, Wainer B, Kucherlapati R (1996) Neuronal abnormalities in microtubule-associated protein 1B mutant mice. *PNAS* 93: 1270-1275

Eells JB, Lipska BK, Yeung SK, Misler JA, Nikodem VM (2002) Nurr1-null heterozygous mice have reduced mesolimbic and mesocortical dopamine levels and increased stress-induced locomotor activity. *Behav Brain Res* 136: 267-275

Elias JA, Zheng T, Whiting NL, Marcovici A, Trow TK (1994) Cytokine-cytokine synergy and protein kinase C in the regulation of lung fibroblast leukemia inhibitory factor. *Am J Physiol* 266: L426-35

Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M (1999) Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* 274: 23996-24006



Eng LF, Rubinstein LJ (1978) Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J Histochem Cytochem* 26: 513-522

Eng LF, Ghirnikar RS (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4: 229-237

Ericson J, Muhr J, Jessell TM, Edlund T (1995) Sonic hedgehog: a common signal for ventral patterning along the rostrocaudal axis of the neural tube. *Int J Dev Biol* 39: 809-816

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

Felgner H, Frank R, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E, Ludin B, Matus A, Schliwa M (1997) Domains of neuronal microtubule-associated proteins and flexural rigidity of microtubules. *J Cell Biol* 138: 1067-1075

Fischer I, Shea TB, Sapirstein VS, Kosik KS (1986) Expression and distribution of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuroblastoma and primary neuronal cells. *Dev Brain Res* 25: 99-109

Fischer I, Konola J, Cochary E (1990) Microtubule associated protein (MAP1b) is present in cultured oligodendrocytes and co-localizes with tubulin. *J Neurosci Res* 27: 112-124

Fischer I, Romano-Clarke G, Grynspan F (1991) Calpain-mediated proteolysis of microtubule associated proteins MAP1B and MAP2 in developing brain. *Neurochem Res* 16: 891-898

Franzen R, Tanner SL, Dashiell SM, Rottkamp CA, Hammer JA, Quarles RH (2001) Microtubule-associated protein 1b: a neuronal binding partner for myelin-associated glycoprotein. *J Cell Biol* 155: 893-898

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

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

Freed WJ, Poltorak M, Becker JB (1990) Intracerebral adrenal medulla grafts: a review. *Exp Neurol*: 139-166 Review

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

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

Fuchs E, Weber K (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63: 345-382

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

Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287: 1433-1438

Galpern WR, Burns LH, Deacon TW, Dinsmore J, Isacson O (1996) Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. *Exp Neurol* 140: 1-13

Gallo V, Armstrong RC (1994) Developmental and growth factor-induced regulation of nestin in oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci* 15: 394-406

Garner CC, Garner A, Huber G, Kozak C, Matus A (1990) Molecular cloning of microtubule-associated protein 1 (MAP1A) and microtubule-associated protein 5 (MAP1B): identification of distinct genes and their differential expression in developing brain. *J Neurochem* 55: 146-154

Gasse H, Meyer W (1995) Neuron-specific enolase as a marker of hypothalamo-neurohypophyseal development in postnatal *monodelphis domestica* (marsupialia). *Neurosci Lett* 189: 54-56

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

Giulian D, Baker TJ, Shih LC, Lachman LB (1986) Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med* 164: 594-604

Giulian D, Woodward J, Young DG, Krebs JF, Lachman LB (1988) Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization. *J Neurosci* 8: 2485-2490

Gomes FC, Paulin D, Moura Neto V (1999) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 32: 619-631

Gonzalez-Billault C, Avila J, Caceres A (2001) Evidence for the role of MAP1B in axon formation. *Mol Biol Cell* 12: 2087-2098

Gordon-Weeks PR, Fischer I (2000) MAP1B expression and microtubule stability in growing and regenerating axons. *Microsc Res Tech* 48: 63-74

Gouhier C, Chalon S, Aubert-Pouessel A, Venier-Julienne MC, Jollivet C, Benoit JP, Guilloteau D (2002) Protection of dopaminergic nigrostriatal afferents by GDNF delivered by microspheres in a rodent model of Parkinson's disease. *Synapse* 44: 124-131

Granholm AC, Mott JL, Bowenkamp K, Eken S, Henry S, Hoffer BJ, Lapchak PA, Palmer MR, van Horne C, Gerhardt GA (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum. *Exp Brain Res* 116: 29-38

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

Greenfield EM, Horowitz MC, Lavish SA (1996) Stimulation by parathyroid hormone of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor expression in osteoblasts is an immediate-early gene response induced by cAMP signal transduction. *J Biol Chem* 271: 10984-10989

Grosset C, Jazwiec B, Taupin JL, Liu H, Richard S, Mahon FX, Reiffers J, Moreau JF, Ripoche J (1995) In vitro biosynthesis of leukemia inhibitory factor/human interleukin for DA cells by human endothelial cells: differential regulation by interleukin-1 alpha and glucocorticoids. *Blood* 86: 3763-3770

Gundersen HJ, Jensen EB (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147: 229-263

Haas SJP, Beckmann S, Schmitt O, Petrov S, Wree A (2005) Transplantation of CSM14.1 cells in the neonatal dopaminergic defferentiated striatum leads to a therapeutic improvement and dopaminergic reinnervation. *Ann Anat im Druck*

Haas SJP, Wree A (2002) Dopaminergic differentiation of the Nurr1-expressing immortalized mesencephalic cell line CSM14.1 *in vitro*. *J Anat* 201: 61-69

Hamilton JA, Waring PM, Filonzi EL (1993) Induction of leukemia inhibitory factor in human synovial fibroblasts by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 150: 1496-1502

Hangoc G, Yin T, Cooper S, Schendel P, Yang YC, Broxmeyer HE (1993) In vivo effects of recombinant interleukin-11 on myelopoiesis in mice. *Blood* 81: 965-972

Hartner A, Sterzel RB, Reindl N, Hocke GM, Fey GH, Goppelt-Strube M (1994) Cytokine-induced expression of leukemia inhibitory factor in renal mesangial cells. *Kidney Int* 45: 1562-1571

Hattori T, Takei N, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S (1995) Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. *Neurosci Res* 21: 191-198

Hawley RG, Fong AZ, Ngan BY, de Lanux VM, Clark SC, Hawley TS (1993) Progenitor cell hyperplasia with rare development of myeloid leukemia in interleukin 11 bone marrow chimeras. *J Exp Med* 178: 1175-1188

Heitz P U, Komminoth P, Zimmermann D, Schüler G, Böcher W, Denk H (2001) Untersuchungsmethoden der Pathologie. *Pathologie S.*: 9-21, 2 Auflage, Urban und Fischer, München

Heller DP, Feeley MM, Raaphorst GP (1993) Changes in survival and potentially lethal damage recovery following periods of high and low metabolic activity in human glioma cells. *Oncol Res* 5: 475-482

Hellmich HL, Kos L, Cho ES, Mahon KA, Zimmer A (1996) Embryonic expression of glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) suggests multiple developmental roles in neural differentiation and epithelial-mesenchymal interactions. *Mech Dev* 54: 95-105

Herman JP, Abrous ND (1984) Dopaminergic neural grafts after fifteen years: results and perspectives. *Prog Neurobiol* 44: 1-35

Herrmann H, Aebi U (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 12: 79-90

Heymann D, Harb J, Ringeard S, Blanchard F, Lassort D, Raher S, Godard A (1995) Upmodulation of alpha v beta 1 integrin expression on human tumor cells by human interleukin for DA cells/leukemia inhibitory factor and oncostatin M: correlation with increased cell adhesion on fibronectin. *J Cell Biochem* 58: 305-314

Higgins D, Waxman A, Banker G (1988) The distribution of microtubule-associated protein 2 changes when dendritic growth is induced in rat sympathetic neurons *in vitro*. *Neuroscience* 24: 583-592

Hirokawa N (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6: 74-81

Hirokawa N, Funakoshi T, Sato-Harada R, Kanai Y (1996) Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2c in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol* 132: 667-679

Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA (1988) Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334: 345-348

Hoffer BJ, Hoffman A, Bowenkamp K, Huettl P, Hudson J, Martin D, Lin LF, Gerhardt GA (1994) Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci Lett* 182: 107-111.

Hökfelt T, Smith CB, Norell G, Peters A, Crane A, Goldstein M, Brownstein M, Sokoloff L (1984) Attempts to combine 2-deoxyglucose autoradiography and tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Neuroscience* 13: 495-512

Honig LS, Herrmann K, Shatz CJ (1996) Developmental changes revealed by immunohistochemical markers in human cerebral cortex. *Cereb Cortex* 6: 794-806

Hopkins SJ, Rothwell NJ (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends Neurosci* 18(2): 83-88 Review

Horton AR, Barlett PF, Pennica D, Davies AM (1998) Cytokines promote the survival of mouse cranial sensory neurones at different developmental stages. *Eur J Neurosci* 10: 673-679

Howard CV, Reed MG (1998) Unbiased stereology. BIOS Sci Publ Oxford.

Huber G, Matus A (1984) Differences in the cellular distributions of two microtubule-associated proteins, MAP2, in rat brain. *J Neurosci* 4: 151-160

Hudson J, Granholm AC, Gerhardt GA, Henry MA, Hoffman A, Biddle P, Leela NS, Mackerlova L, Lile JD, Collins F (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor augments midbrain dopaminergic circuits in vivo. *Brain Res Bull* 36: 425-32

Hummel T, Krukkert K, Roos J, Davis G, Klambt C (2000) Drosophila Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* 26: 357-370

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

Hynes M, Rosenthal A (2000) Embryonic stem cells go dopaminergic. *Neuron* 28: 11-14

Illenberger S, Drewes G, Trinczek B, Biernat J, Meyer HE, Olmsted JB, Mandelkow EM, Mandelkow E (1996) Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110mark. Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J Biol Chem* 271:10834-10843

Inagaki M, Nakamura Y, Takeda M, Nishimura T, Inagaki N (1994) Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. *Brain Pathol* 4: 239-243

Ishimi Y, Abe E, Jin CH, Miyaura C, Hong MH, Oshida M, Kurosawa H, Yamaguchi Y, Tomida M, Hozumi M (1992) Leukemia inhibitory factor/differentiation-stimulating factor (LIF/D-factor): regulation of its production and possible roles in bone metabolism. *J Cell Physiol* 152: 71-78

Itakura T, Komai N, Ryujin Y, Ooiwa Y, Nakai M, Yasui M (1994) Autologous transplantation of the cervical sympathetic ganglion into the parkinsonian brain: case report. *Neurosurgery*: 155-158

Iwawaki T, Kohno K, Kobayashi K (2000) Identification of a potential NURR1 response element that activates the tyrosine hydroxylase gene promoter in cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* 274: 590-595

Jagadha V, Halliday WC, Becker LE (1986) Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in oligodendrogliomas: a reflection of transient GFAP expression by immature oligodendroglia. *Can J Neurol Sci* 13: 307-311

Jalabi W, Cerghert M, Skoff RP, Ghandour MS (2003) Detection of oligodendrocytes in tissue sections using PCR synthesis of digoxigenin-labeled probes. *J Histochem* 51: 913-919

Jessell TM, Dodd J (1990) Floor plate-derived signals and the control of neural cell pattern in vertebrates. *Harvey Lect* 86: 87-128

Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW, Fox GM (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85: 1113-1124

Johansson M, Friedemann M, Hoffer B, Stromberg I (1995) Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on developing and mature ventral mesencephalic grafts in oculo. *Exp Neurol* 134: 25-34



Johe KK, Hazel TG, Muller T, Dugich-Djordjevic MM, McKay RD (1996) Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. *Genes Dev* 10: 3129-3140

Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N (2000) Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol*: 27-34

Kalsbeek A, Buijs RM (1992) Peptidergic transmitters of the suprachiasmatic nuclei and the control of circadian rhythmicity. *Prog Brain Res* 92: 321-333

Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y (2000) Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28: 31-40

Kearns CM, Gash DM (1995) GDNF protects nigral dopamine neurons against 6-hydroxydopamine *in vivo*. *Brain Res* 672: 104-111

Kearns CM, Cass WA, Smoot K, Kryscio R, Gash DM (1997) GDNF protection against 6-OHDA: time dependence and requirement for protein synthesis. *J Neurosci* 17: 7111-7118

Kermer P, Kraijewska M, Zapata JM, Takayama S, Mai J, Kraijewski S, Reed JC (2002) Bag1 is regulator and marker of neuronal differentiation. *Cell Death Differ* 9: 405-413

Kilpatrick TJ, Bartlett PF (1995) Cloned multipotential precursors from the mouse cerebrum require FGF-2, whereas glial restricted precursors are stimulated with either FGF-2 or EGF. *J Neurosci* 15: 3653-3661

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

Kim JH, Koh HC, Lee JY, Chang MY, Kim YC, Chung HY, Son H, Lee YS, Studer L, McKay R, Lee SH (2003) Dopaminergic neuronal differentiation from rat embryonic neuronal precursors by Nurr1 overexpression. *J Neurochem* 85: 1443-1454

Kingsley DM (1994) The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 8: 133-46

Kirik D, Winkler C, Björklund A (2001) Growth and functional efficiency of intrastriatal nigral transplants depend on the extent of nigrostriatal degeneration. *J Neurosci* 21: 2889-2896

Kirik D, Georgievska B, Björklund A (2004) Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson's disease. *Nature Neurosci* 7: 105-110

Kirschner MW, Mitchison T (1986) Microtubule dynamics. *Nature* 324: 621

Koblar SA, Turnley AM, Classon BJ, Reid KL, Ware CB, Cheema SS, Murphy M, Bartlett PF (1998) Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3178-3181

Koob GF, Nestler EJ (1997) The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9: 482-497

Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM Jr, Milbrandt J (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* 384: 467-470

Kumer SC, Mockus SM, Vrana KE (1996) A chimeric tyrosine/tryptophan hydroxylase. The tyrosine hydroxylase regulatory domain serves to stabilize enzyme activity. *J Mol Neurosci* 9: 35-48

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

Lapchak PA, Miller PJ, Collins F, Jiao S (1997) Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates behavioural deficits and regulates nigrostriatal dopaminergic and peptidergic markers in 6-hydroxydopamine-lesioned adult rats: comparison of intraventricular and intranigral delivery. *Neuroscience* 78: 61-72

Law SW, Conneely OM, DeMayo FJ, O'Malley BW (1992) Identification of a new brain-specific transcription factor, NURR1. *Mol Endocrinol* 6: 2129-2135

Lawrence CB, Allan SM, Rothwell NJ (1998) Interleukin-1 $\beta$  and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat. *Eur J Neurosci* 10: 1188-1195

Le W, Conneely OM, Zou L, He Y, Saucedo-Cardenas O, Jankovic J, Mosier DR, Appel SH (1999) Selective agenesis of mesencephalic dopaminergic neurons in Nurr1-deficient mice. *Exp Neurol* 159: 451-458

Le Belle JE, Caldwell MA, Svendsen CN (2004) Improving the survival of human CNS precursor-derived neurons after transplantation. *J Neurosci Res* 76: 174-183

Ledig M, Tholey G, Mandel P (1982) Neuron-specific and non-neuronal enolase in developing chick brain and primary cultures of chick neurons. *Brain Res* 256: 451-454

Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW (1993) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1  $\beta$ . *J Immunol* 150: 2659-2667

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

Leung DW, Parent AS, Cachianes G, Esch F, Coulombe JN, Nikolics K, Eckenstein FP, Nishi R (1992) Cloning, expression during development, and evidence for release of a trophic factor for ciliary ganglion neurons. *Neuron* 8: 1045-1053

Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, Raine CS (1996) GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17: 607-615

Lieth E, Towle AC, Lauder JM (1989) Neuronal-glial interactions: quantitation of astrocytic influences on development of catecholamine neurons. *Neurochem Res* 14: 979-985

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

Lin RC, Matesic DF, Marvin M, McKay RD, Brüstle O (1995) Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes. *Neurobiol Dis* 2: 79-85

Linder JC, Young SJ, Groves PM (1995) Electron microscopic evidence for neurotoxicity in the basal ganglia. *Neurochem Int* 26: 195-202

Lindsay RM, Yancopoulos GD (1996) GDNF binds with known orphan: accessory implicated in new twist. *Neuron* 17: 571-574

Lindvall O, Bjorklund A, Skagerberg G (1984) Selective histochemical demonstration of dopamine terminal systems in rat di- and telencephalon: new evidence for dopaminergic innervation of hypothalamic neurosecretory nuclei. *Brain Res* 306: 19-30

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

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

Liu JS, John GR, Sikora A, Lee SC, Brosnan CF (2000) Modulation of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha signaling by P2 purinergic receptors in human fetal astrocytes. *J Neurosci* 20: 5292-5299

Loddick SA, Rothwell NJ (1996) Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 932-940

Lorenzo JA, Jastrzebski SL, Kalinowski JF, Downie E, Korn JH (1994) Tumor necrosis factor alpha stimulates production of leukemia inhibitory factor in human dermal fibroblast cultures. *Clin Immunol Immunopathol* 70: 260-265

Lundberg C, Field PM, Ajayi YO, Raisman G, Björklud (1996) Conditionally immortalized neural progenitor cell lines integrate and differentiate after grafting to the adult rat striatum. A combined autoradiographic and electron microscopic study. *Brain Res* 737: 295-300

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

Ma D, Himes BT, Shea TB, Fischer I (2000) Axonal transport of microtubule-associated protein 1b (MAP1b) in the sciatic nerve of adult rat: distinct transport rates of different isoforms. *J Neurosci* 20: 2112-2120

Manaster JS, Feuerman T, Reynolds CP, Markham CH (1992) Transplantation of human neuroblastoma cells, catecholaminergic and non-catecholaminergic: effects on rotational behavior in Parkinson's rat model. *J Neural Transplant Plast*: 139-150

Manthorpe M, Skaper S, Adler R, Landa K, Varon S (1980) Cholinergic neuronotrophic factors: fractionation properties of an extract from selected chick embryonic eye tissues. *J Neurochem* 34: 69-75

Marangos PJ, Schmechel D, Zis AP, Goodwin FK (1979) The existence and neurobiological significance of neuronal and glial forms of the glycolytic enzyme enolase. *Biol Psychiatry* 14: 563-579

Marangos PJ, Schmechel DE, Parma AM, Goodwin FK (1980) Developmental profile of neuron-specific (NSE) and non-neuronal (NNE) enolase. *Brain Res* 190: 185-193

Marangos PJ, Schmechel DE (1987) Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells: *Annu Rev Neurosci* 10: 269-295

Marshall JS, Gauldie J, Nielsen L, Bienenstock J (1993) Leukemia inhibitory factor production by rat mast cells. *Eur J Immunol* 23: 2116-2120

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

Martínez-Serrano A, Fischer W, Björklund A (1995) Reversal of age-dependent cognitive impairments and cholinergic neuron atrophy by NGF-secreting neural progenitors grafted to the basal forebrain. *Neuron* 15: 473-484

Martinez-Serrano A, Hantzopoulos PA, Björklund A (1996) Ex vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor to the intact rat forebrain: neurotrophic effects on cholinergic neurons. *Eur J Neurosci* 8: 727-735

Marvin MJ, Dahlstrand J, Lendahl U, McKay RD (1998) A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J Cell Sci* 111: 1951-1961

Marzella PL, Clark GM, Shepherd RK, Bartlett PF, Kilpatrick TJ (1997) LIF potentiates the NT-3-mediated survival of spiral ganglia neurones in vitro. *Neuroreport* 8: 1641-1644

Matsuda M, Katoh-Semba R, Kitani H, Tomooka Y (1996) A possible role of the nestin protein in the developing central nervous system in rat embryos. *Brain Res* 723: 177-189

Matsuoka I, Nakane A, Kurihara K (1997) Induction of LIF-mRNA by TGF-beta 1 in Schwann cells. *Brain Res* 776: 170-180

Matus A (1988) Microtubule-associated proteins: their potential role in determining neuronal morphology. *Ann Rev Neurosci.* 11: 19-44

Matus A (1990) Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol (Paris)* 84: 134-137

McKay RDG (1999) Brain stem cells change their identity. *Nature Med* 5: 261-262

Meixner A, Haverkamp S, Wasse H, Fuhrer S, Thalhammer J, Kropf N, Bittner RE, Lassmann H, Wiche G, Probst F (2000) MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 151: 1169-1178

Mehler MF, Rozental R, Dougherty M, Spray DC, Kessler JA (1993) Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells. *Nature* 362: 62-65

Messam CA, Hou J, Major EO (2000) Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody. *Exp Neurol* 161: 585-596

Mickey B, Howard J (1995) Rigidity of microtubules is increased by stabilizing agents. *J Cell Biol* 130: 909-917

Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, Lampe PA, Heuckeroth RO, Kotzbauer PT, Simburger KS, Golden JP, Davies JA, Vejsada R, Kato AC, Hynes M, Sherman D, Nishimura M, Wang LC, Vandlen R, Moffat B, Klein RD, Poulsen K, Gray C, Garces A, Johnson EM Jr (1998) Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron* 20: 245-253

Mitchison T, Kirschner M (1988) Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1: 761-772

Miyaguchi K (1997) Ultrastructure of intermediate filaments of nestin- and vimentin-immunoreactive astrocytes in organotypic slice cultures of hippocampus. *J Struct Biol* 120: 61-68

Moon C, Yoo JY, Matarazzo V, Sung YK, Kim EJ, Ronnett GV (2002) Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9015-9020

Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A (1996) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 76-79

Moretto G, Walker DG, Lanteri P, Taioli F, Zaffagnini S, Xu RY, Rizzuto N (1996) Expression and regulation of glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in human astrocytes in vitro. *Cell Tissue Res* 286: 257-262

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

Murphy PR, Guo JZ, Friesen HG (1990) Messenger RNA stabilization accounts for elevated basic fibroblast growth factor transcript levels in a human astrocytoma cell line. *Mol Endocrinol* 4: 196-200



Murphy GM Jr, Song Y, Ong E, Lee YL, Schmidt KG, Bocchini V, Eng LF (1995) Leukemia inhibitory factor mRNA is expressed in cortical astrocyte cultures but not in an immortalized microglial cell line. *Neurosci Lett* 184: 48-51

Musashi M, Yang YC, Paul SR, Clark SC, Sudo T, Ogawa M (1991) Direct and synergistic effects of interleukin 11 on murine hemopoiesis in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 765-769

Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 239: 2910-2917

Nakao N, Yokote H, Nakai K, Itakura T (2000) Promotion of survival and regeneration of nigral dopamine neurons in a rat model of Parkinson's disease after implantation of embryonal carcinoma-derived neurons genetically engineered to produce glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosurg* 92: 659-670

Nakashima K, Wiese S, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsune T, Yoshida K, Kishimoto T, Sendtner M, Taga T (1999) Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *Neurosci* 19: 5429-5434

Nawa H, Nakanishi S, Patterson PH (1991) Recombinant cholinergic differentiation factor (leukemia inhibitory factor) regulates sympathetic neuron phenotype by alterations in the size and amounts of neuropeptide mRNAs. *J Neurochem* 56: 2147-2150

Nicola NA, Hilton DJ (1998) General classes and functions of four-helix bundle cytokines. *Adv Protein Chem* 52: 1-65

Nogami M, Takatsu A, Ishiyama I (1998) Immunohistochemical study of neuron-specific enolase in human brains from forensic autopsies. *Forensic Sci Int* 94: 97-109

Norberg J, Winther Kristensen B, Zimmer J (1999) Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Prot* 3: 278-290

Nosrat CA, Tomac A, Lindqvist E, Lindskog S, Humpel C, Stromberg I, Ebendal T, Hoffer BJ, Olson L (1996) Cellular expression of GDNF mRNA suggests multiple functions inside and outside the nervous system. *Cell Tissue Res* 286: 191-207

Nothias F, Fischer I, Murray M, Mirman S, Vincent J (1996) Expression of a phosphorylated isoform of MAP1b is maintained in adult central nervous system areas that retain capacity for structural plasticity. *J Comp Neurol* 368: 317-334

Nunes I, Tovmasian LT, Silva RM, Burke RE, Goff SP (2003) Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *PNAS* 100: 4245-4250

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

Opacka J, Brodie ME (1995) Dissociation between circling behaviour and striatal dopamine activity following unilateral deltamethrin administration to rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 331: 341-346

Ostenfeld T, Svendsen CN (2003) Recent advances in stem cell neurobiology. *Adv Tech Stand Neurosurg* 28: 3-89

Palmer TD, Ray J, Gage FH (1995) FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain. *Mol Cell Neurosci* 6: 474-486

Park KW, Eglitis MA, Mouradian MM (2001) Protection of nigral neurons by GDNF-engineered marrow cell transplantation. *Neurosci Res* 40: 315-323

Pedrotti B, Islam K (1996) Dephosphorylated but not phosphorylated microtubule associated protein MAP1B binds to microfilaments. *FEBS Lett* 388: 131-133

Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J (1999) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol* 145: 503-514

Pennypacker K, Fischer I, Levitt P (1991) Early *in vitro* genesis and differentiation of axons and dendrites by hippocampal neurons analyzed quantitatively with neurofilament-H and microtubule-associated protein 2 antibodies. *Exp Neurol* 111: 25-35

Perrone-Capano C, di Porzio U (1996) Epigenetic factors and midbrain dopaminergic neurone development. *Bioessays* 18: 817-24

Petrov S, Haas SJP, Konenber G, Wree A (2004) Intranigrally grafted neuronal stem cells (CSM14.1) have a therapeutic effect in Hemiparkinsonian rats. *Ann Anat* 186 (Suppl): 264

Pichel JG, Shen L, Sheng HZ, Granholm AC, Drago J, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Saarma M, Hoffer BJ, Sariola H, Westphal H (1996) Defects in enteric innervation and kidney development in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 73-76

Pochon NAM, Menoud A, Tseng JL, Zurn AD, Aebischer P (1997) Neuronal GDNF expression in the adult rat nervous system identified by *in situ* hybridization. *Eur J Neurosci* 19: 463-471

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

Ptak LR, Hart KR, Lin D, Carvey PM (1995) Isolation and manipulation of rostral mesencephalic tegmental progenitor cells from rat. *Cell Transplant* 4: 335-342

Rabejac D, Raymond J, Dechesne C (1994) Characterization of different neuron populations in mouse statoacoustic ganglion cultures. *Brain Res* 652: 249-256

Ramón-Cueto A, Avila J (1999) Two modes of microtubule-associated protein 1b phosphorylation are differentially regulated during peripheral nerve regeneration. *Brain Res*: 213-226

Ray J, Gage FH (1994) Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 14: 3548-3564

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

Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA (1989) Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *PNAS* 86: 5178-5182

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

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255: 1707-1710

Reynolds BA, Weiss S (1996) Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol*: 1-13

Richards LJ, Kilpatrick TJ, Bartlett PF (1992) De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *PNAS* 89: 8591-8595

Riederer BM (1995) Differential phosphorylation of MAP1b during postnatal development of the cat brain. *J Neurocytol* 24: 45-54

Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237: 1219-1223

Rodriguez D, Gauthier F, Bertini E, Bugiani M, Brenner M, N'guyen S, Goizet C, Gelot A, Surtees R, Pedespan JM, Hernandorena X, Troncoso M, Uziel G, Messing A, Ponsot G, Pham-Dinh D, Dautigny A, Boespflug-Tanguy O (2001) Infantile Alexander disease: spectrum of GFAP mutations and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 69: 1134-1140

Roos J, Kelly RB (2000) Preassembly and transport of nerve terminals: a new concept of axonal transport. *Nat Neurosci* 3: 415-417

Rosenblad C, Kirik D, Devaux B, Moffat B, Phillips HS, Björklund A (1999) Protection and regeneration of nigral dopaminergic neurons by neurturin or GDNF in a partial lesion model of Parkinson's disease after administration into the striatum or the lateral ventricle. *Eur J Neurosci* 11: 1554-1566

Rosenblad C, Gronborg M, Hansen C, Blom N, Meyer M, Johansen J, Dago L, Kirik D, Patel UA, Lundberg C, Trono D, Bjorklund A, Johansen TE (2000) In vivo protection of nigral dopamine neurons by lentiviral gene transfer of the novel GDNF-family member neublastin/artemin. *Mol Cell Neurosci* 15: 199-214

Rothwell NJ, Luheshi GN (2000) Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci* 23: 618-625 Review

Rutka J, Murakami M, Dirks P, Hubbard SL, Becker LE, Fukuyama K, Jung S, Matsuzawa K (1997) Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review. *J Neurosurg* 87: 420-430

Sacchetti P, Brownschidle LA, Granneman JG, Bannon MJ (1999) Characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine transporter gene. *Brain Res Mol Brain Res* 74: 167-174

Sacchetti P, Mitchell TR, Granneman JG, Bannon MJ (2001) Nurr1 enhances transcription of the human dopamin transporter gene through a novel mechanism. *J Neurochem* 76: 1565-1572

Sanberg PR, Borlongan CV, Othberg AI, Saporta S, Freeman TB, Cameron DF (1997) Testis-derived Sertoli cells have a trophic effect on dopamine neurons and alleviate hemiparkinsonism in rats. *Nat Med*: 1129-1132

Sanchez MP, Silos-Santiago I, Frisen J, He B, Lira SA, Barbacid M (1996) Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* 382: 70-73

Sanchez C, Perez M, Avila J (2000) GSK3 $\beta$ -mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2C (MAP2C) prevents microtubule bundling. *Eur J Cell Biol* 79: 252-260

Sanchez-Pernaute R, Studer L, Bankiewicz KS, Major EO, McKay RD (2001) *In vitro* generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J Neurosci Res* 65: 284-288

Santa-Olalla J, Covarrubias L (1995) Epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), and basic fibroblast growth factor (bFGF) differentially influence neural precursor cells of mouse embryonic mesencephalon. *J Neurosci Res* 42: 172-183

Sarnat HB, Nochin 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

Sato-Yoshitake R, Shiomura Y, Miyasaka H, Hirokawa N (1989) Microtubule-associated protein 1b: molecular structure, localization, and phosphorylation-dependent expression in developing neurons. *Neuron* 3: 229-238

Saucedo-Cardenas O, Conneely OM (1996) Comparative distribution of NURR1 and NUR77 nuclear receptors in the mouse central nervous system. *J Mol Neurosci* 7: 51-63

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. PNAS 95: 4013-4018

Sauer H, Rosenblad C, Bjorklund A (1995) Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. PNAS 92: 8935-8939

Saura J, Pares M, Bove J, Pezzi S, Alberch J, Marin C, Tolosa E, Marti MJ (2003) Intranigral infusion of interleukin-1 $\beta$  activates astrocytes and protects from subsequent 6-hydroxydopamine neurotoxicity. J Neurochem 85: 651-661

Sautter J, Meyer M, Spenger C, Seiler RW, Widmer HR (1998) Effects of combined BDNF and GDNF treatment on cultured dopaminergic midbrain neurons. Neuroreport 9: 1093-1096

Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, Ogawa Y, Toyama Y, Yamamoto A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Itakura T, Okano H (2001a) Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. J Neurosci 21: 3895-3903

Sawamoto K, Nakao N, Kobayashi K, Matsushita N, Takahashi H, Kakishita K, Yamamoto A, Yoshizaki T, Terashima T, Murakami F, Itakura T, Okano H (2001b) Visualization, direct isolation, and transplantation of midbrain dopaminergic neurons. PNAS 98: 6423-6428

Schaar DG, Sieber BA, Dreyfus CF, Black IB (1993) Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. Exp Neurol 124: 368-371

Schluns KS, Cook JE, Le PT (1997) TGF-beta differentially modulates epidermal growth factor-mediated increases in leukemia-inhibitory factor, IL-6, IL-1 alpha, and IL-1 beta in human thymic epithelial cells. J Immunol 158: 2704-2712

Schoenfeld TA, Obar RA (1994) Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol* 151: 67-137

Seeman P, Tallerico T, Corbett R, Van Tol HH, Kamboj RK (1997) Role of dopamine D2, D4 and serotonin(2A) receptors in antipsychotic and anticataleptic action. *J Psychopharmacol* 11: 15-17

Seidman K, Teng A, Rosenkopf R, Spilotro P, Weyhenmeyer J (1997) Isolation, cloning and characterization of a putative type-1 astrocyte cell line. *Brain Res* 753: 18-26

Self DW, McClenahan AW, Beitner-Johnson D, Terwilliger RZ, Nestler EJ (1995) Biochemical adaptations in the mesolimbic dopamine system in response to heroin self-administration. *Synapse* 21: 312-318

Semina EV, Reiter RS, Murray JC (1997) Isolation of a new homeobox gene belonging to the Pitx/Rieg family: expression during lens development and mapping to the aphakia region on mouse chromosome 19. *Hum Mol Genet* 6: 2109-2116

Semina EV, Ferrell RE, Mintz-Hittner HA, Bitoun P, Alward WL, Reiter RS, Funkhauser C, Daack-Hirsch S, Murray JC (1998) A novel homeobox gene PITX3 is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat Genet* 19: 167-170

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

Shaw G, Banker G, Weber K (1985) An immunfluorescence study of neurofilament protein expression by developing hippocampal neurons in tissue culture. *Eur J Cell Biol* 39: 205-216

Shea TB, Beermann ML (1994) Respective roles of neurofilaments, microtubules, MAP1B, and tau in neurite outgrowth and stabilization. *Mol Biol Cell* 5: 863-875



Sheng JG, Ito K, Skinner RD, Mrak RE, Rovnaghi CR, Van Eldik LJ, Griffin WS (1996) In vivo and in vitro evidence supporting a role for the inflammatory cytokine interleukin-1 as a driving force in Alzheimer pathogenesis. *Neurobiol Aging* 17: 761-766

Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH (2000) Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20: 8727-8735

Shinohara H, Semba R, Kato K, Kashiwamata S, Tanaka O (1986) Immunohistochemical localization of  $\gamma$  enolase in early human embryos. *Brain Res* 382: 33-38

Shintani A, Ono Y, Kaisho Y, Igarashi K (1992) Characterization of the 5'-flanking region of the human brain-derived neurotrophic factor gene. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 325-332

Shiroma N, Kanazawa N, Izumi M, Sugai K, Fukumizu M, Sasaki M, Hanaoka S, Kaga M, Tsujino S (2001) Diagnosis of Alexander disease in a Japanese patient by molecular genetic analysis. *J Hum Genet* 46: 579-582

Shults CW, Kimber T, Martin D (1996) Intrastriatal injection of GDNF attenuates the effects of 6-hydroxydopamine. *Neuroreport* 7: 627-631

Sims KB, Crandall JE, Kosik KS, Williams R S (1988) Microtubule-associated protein 2 (MAP2) immunoreactivity in human fetal neocortex. *Brain Res* 449: 192-200

Sinclair SR, Svendsen CN, Torres EM, Martin D, Fawcett JW, Dunnett SB (1996) GDNF enhances dopaminergic cell survival and fibre outgrowth in embryonic nigral grafts. *Neuroreport* 7: 2547-2552

Smidt MP, van Schaick HS, Lanctot C, Tremblay JJ, Cox JJ, van der Kleij AA, Wolterink G, Drouin J, Burbach JP (1997) A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. PNAS 94: 13305-13310

Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature 336: 688-690

Schmitt O, Preuße S, Haas SJP (2004) Comparison of contrast, sensitivity and efficiency of signal amplified and nonamplified immunohistochemical reactions suitable for videomicroscopy-based quantification and neuroimaging. Brain Res Brain Res Protoc 12: 157-171.

Specht LA, Pickel VM, Joh TH, Reis DJ (1981) Fine structure of the nigrostriatal anlage in fetal rat brain by immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase. Brain Res 218: 49-65

Springer JE, Mu X, Bergmann W, Trojanowski JQ (1994) Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. Exp Neurol 127: 167-170

Steinert PM, Chou YH, Prahlad V, Parry DA, Marekov LN, Wu KC, Jang SI, Goldman RD (1999) A high molecular weight intermediate filament-associated protein in BHK-21 cells is nestin, a type VI intermediate filament protein. Limited co-assembly *in vitro* to form heteropolymers with type III vimentin and type IV alpha-internexin. J Biol Chem 274: 9881-9890

Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, Schwarz J (2001) Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. Exp Neurol 170(2): 317-325

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

Studer L, Tabar V, McKay RD (1998) Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1: 290-295

Subramanian SV, Orosz CG, Strauch AR (1998) Vascular smooth muscle alpha-actin expression as an indicator of parenchymal cell reprogramming in cardiac allografts. *Transplantation*: 1652-1656.

Suter-Crazzolara C, Unsicker K (1996) GDNF mRNA levels are induced by FGF-2 in rat C6 glioblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 41: 175-182

Suvanto P, Hiltunen JO, Arumae U, Moshnyakov M, Sariola H, Sainio K, Saarma M (1996) Localization of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in embryonic rat by in situ hybridization. *Eur J Neurosci* 8: 816-822

Svendsen CN, Skepper J, Rosser AE, ter Borg MG, Tyres P, Ryken T (1997) Restricted growth potential of rat neural precursors as compared to mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 99: 253-258

Taga T (1996) Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines. *J Neurochem* 67: 1-10

Taga T, Kishimoto T (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 15: 797-819

Takei Y, Kondo S, Harada A, Inomata S, Noda T, Hirokawa N (1997) Delayed development of nervous system in mice homozygous for disrupted microtubule-associated protein 1B (MAP1B) gene. *J Cell Biol* 137: 1615-1626

Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N (2000) Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and MAP1b genes. *J Cell Biol* 150: 989-1000

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

Tanner SL, Franzen R, Jaffe H, Quarles RH (2000) Evidence for expression of some microtubule-associated protein 1B in neurons as a plasma membrane glycoprotein. *J Neurochem* 75: 553-562

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

Teng J, Takei Y, Harada A, Nakata T, Chen J, Hirokawa N (2001) Synergistic effects of MAP2 and MAP1b knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* 155: 65-76

Todd AJ, Spike RC, Polgar E (1998) A quantitative study of neurons which express neurokinin-1 or somatostatin sst2a receptor in rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 85: 459-473

Tögel M, Wiche G, Propst F (1998) Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J Cell Biol* 143: 695-707

Tomac A, Widenfalk J, Lin LF, Kohno T, Ebendal T, Hoffer BJ, Olson L (1995) Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8274-8278

Trapp BD, Marangos PJ, Webster HD (1981) Immunocytochemical localization and developmental profile of neuron specific enolase (NSE) and non-neuronal enolase (NNE) in aggregating cell cultures of fetal rat brain. *Brain Res* 220: 121-130

Trinczek B, Ebner A, Mandelkow EM, Mandelkow E (1999) Tau regulates the attachment/detachment but not the speed of motors in microtubule-dependent transport of single vesicles and organelles. *J Cell Sci* 112: 2355-2367

Trok K, Hoffer B, Olson L (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances survival and growth of prenatal and postnatal spinal cord transplants. *Neuroscience* 71: 231-241

Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H, Ibanez CF (1997) Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret protooncogene, and GDNF receptor-  $\alpha$  indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci* 17: 3554-3567

Tucker RP (1990) The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Rev* 15: 101-120

Turnley AM, Bartlett PF (2000) Cytokines that signal through the leukemia inhibitory factor receptor- $\beta$  complex in the nervous system. *J Neurochem* 74: 889-899

Tuszynski MH, Conner J, Blesch A, Smith D, Merrill DA, Vahlsing HL (2002) New strategies in neural repair. *Prog Brain Res* 138 :401-409

Ulloa L, Avila J, Diaz-Nido J (1993a) Heterogeneity in the phosphorylation of microtubule-associated protein MAP1B during rat brain development. *J Neurochem* 61: 961-972

Ulloa L, Dombradi V, Diaz-Nido J, Szucs K, Gergely P, Friedrich P, Avila J (1993b) Dephosphorylation of distinct sites on microtubule-associated protein MAP1B by protein phosphatases 1, 2A and 2B. *FEBS Lett* 330: 85-89

Umeyama T, Okabe S, Kanai Y, Hirokawa N (1993) Dynamics of microtubules bundled by microtubule associated protein 2C (MAP2C). *J Cell Biol* 120: 451-465

Unsicker K (1996) GDNF: a cytokine at the interface of TGF-betas and neurotrophins. *Cell Tissue Res* 286: 175-178

Valtz NL, Hayes TE, Norregaard T, Liu SM, McKay RD (1991) An embryonic origin for medulloblastoma. *New Biol* 3: 364-371

Verity AN, Wyatt TL, Lee W, Hajos B, Baecker PA, Eglen RM, Johnson RM (1999) Differential regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) expression in human neuroblastoma and glioblastoma cell lines. *J Neurosci Res* 55: 187-197

Vescovi AL, Reynolds BA, Fraser DD, Weiss S (1993) bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11: 951-966

Vinores SA, Herman MM, Rubinstein LJ (1986) Electron-immunocytochemical localization of neuron-specific enolase in cytoplasm and on membranes of primary and metastatic cerebral tumours and on glial filaments of glioma cells. *Histopathology* 10: 891-908

Vinores SA, Herman MM, Rubinstein LJ (1987) Localisation of neuron-specific ( $\gamma\gamma$ ) enolase in proliferating (supportive and neoplastic) Schwann cells. An immunohisto- and electron-immunocytochemical study of ganglioneuroblastoma and schwannomas. *Histochem J* 19: 438-448

Volpicelli F, Perrone-Capano C, Da Pozzo P, Colucci-D'Amato L, di Porzio U (2004) Modulation of Nurr1 gene expression in mesencephalic dopaminergic neurones. *J Neurochem* 88: 1283-1294

Vitkovic L, Konsman JP, Bockaert J, Dantzer R, Homburger V, Jacque C (2000) Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* 5: 604-615

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. *Nat Biotechnol* 17: 653-659

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

Wang MZ, Jin P, Bumcrot DA, Marigo V, McMahon AP, Wang EA, Woolf T, Pang K (1995) Induction of dopaminergic neuron phenotype in the midbrain by Sonic hedgehog protein. *Nat Med* 1: 1184-1188

Wang LJ, Colella R, Roisen FJ (1998) Ganglioside GM1 alters neuronal morphology by modulating the association of MAP2 with microtubules and actin filaments. *Dev Brain Res* 105: 227-239

Watanabe M, Koshimizu U, Taga T, Saito M, Shirayoshi Y, Kishimoto T, Nakatsuji N (1996) Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells *in vitro* and derivation of embryonic germ (EG) cells. *Development* 122: 1235-1242

Weibel ER (1979) *Stereological Methods*. Vol. 1. Academic Press, London

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

Weyer A, Schilling K (2003) Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res* 73: 400-409

Winkler C, Fricker RA, Gates MA, Olsson M, Hammang JP, Carpenter MK, Bjorklund A (1998) Incorporation and glial differentiation of mouse EGF-responsive neural progenitor cells after transplantation into the embryonic rat brain. *Mol Cell Neurosci* 11(3): 99-116

White LA, Keane RW, Whittemore SR (1994) Differentiation of an immortalized CNS neuronal cell line decrease their susceptibility to cytotoxic T cell lysis *in vitro*. *J Neuroimmunol* 49: 135-143

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

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

Wright LS, Li J, Caldwell MA, Wallace K, Johnson JA, Svendsen CN (2003) Gene expression in human neural stem cells: effects of leukemia inhibitory factor. *J Neurochem* 86: 179-195

Xu PY, Liang R, Jankovic J, Hunter C, Zeng YX, Ashizawa T, Lai D, Le WD (2002) Association of homozygous 7048G7049 variant in the intron six of Nurr1 gene with Parkinson's disease. *Neurology* 58: 881-884

Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K (1995) Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 26: 676-681

Yanagisawa M, Nakashima K, Arakawa H, Ikenaka K, Yoshida K, Kishimoto T, Hisatsume T, Taga T (2000) Astrocyte differentiation of the fetal neuroepithelial cells by interleukin-11 via activation of a common cytokine signal transducer, gp130, and a transcription factor, STAT3. *J Neurochem* 74: 1498-1504

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

Yuan Y, Lee JA, Napier A, Cole GJ (1997) Molecular cloning of a new intermediate filament protein expressed by radial glia and demonstration of alternative splicing in a novel heptad repeat region located in the carboxy-terminal tail domain. *Mol Cell Neurosci* 10: 71-86



Zetterstrom RH, Solomin L, Mitsiadis T, Olson L, Perlmann T (1996a) Retinoid X receptor heterodimerization and developmental expression distinguish the orphan nuclear receptors NGFI-B, Nurr1, and Nor1. *Mol Endocrinol* 10: 1656-1666

Zetterstrom RH, Williams R, Perlmann T, Olson L (1996b) Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* 41: 111-120

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

Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vassileva G, McMahon A (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12: 11-24

Zhang SC (2001) Defining glial cells during CNS development. *Nature Rev Neurosci* 2: 840-843

Zhong LT, Sarafian T, Kane DJ, Charles AC, Mah SP, Edwards RH, Bredesen DE (1993) Bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. *PNAS* 90: 4533-4537

## 7. Thesen

1. Morbus Parkinson ist eine neurodegenerative Krankheit, die mit dem Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra verbunden ist. Die Vorstellung, einen Verlust von Neuronen durch gezielte Transplantation von Nervenzellen ausgleichen zu können, ist konzeptionell unmittelbar einsichtig und kommt Idealen einer kausalen Therapie sehr nahe.
2. Die Transplantation immortalisierter Progenitorzellen ist eine vielversprechende Möglichkeit für die Zellersatztherapie bei M. Parkinson. Diese Zellen sind leicht zu generieren, haben ein Proliferationspotential, das man leicht steuern kann, und können durch gezielten Gentransfer zur Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren oder Enzyme angeregt werden.
3. Die von uns verwendete immortalisierte Progenitorzelllinie CSM14.1 ist aus dem ventralen Mesenzephalon von E14-Ratten gewonnen. Diese Zelllinie besitzt *in vitro* ein neurogenes und dopaminerges Differenzierungspotenzial.
4. Zytokine sind Glykoproteine, die überwiegend von Zellen des Immunsystems sezerniert wurden. Sie regulieren die Hämatopoese, die Aktivierung und Reifung von Immunzellen und ihr Zusammenspiel während der Immunantwort und die Entwicklung des Nervensystems. Zu den neuroregulatorischen Zytokinen gehören IL1, IL11, LIF und GDNF.
5. Ziel dieser Arbeit ist es, aufgrund der potentiellen Bedeutung der CSM14.1-Zellen für Transplantationen in experimentellen Tiermodellen, eine weiterführende Charakterisierung der CSM14.1-Zellen unter unterschiedlichen Differenzierungsbedingungen *in vitro* zu erarbeiten. Die Fragen, die beantwortet werden sollen sind: 1) Wie verändert sich das Expressionsmuster verschiedener neuronaler Proteine bei permissiver Temperatur (33° C) und Serumreduktion (1% FCS), und 2) welchen Einfluß haben Zytokine auf die Expression neuronaler Proteine und die Morphologie der Zellen. Zellkulturen mit einer Kulturdauer bis zu 14 Tagen wurden bei permissiver (33° C) und nicht permissiver (39° C) Temperatur untersucht.

6. Eine geringe neuronale Differenzierung von CSM14.1-Zellen wurde bei Serumreduktion (1% FCS) und permissiver Temperatur (33° C) gefunden. Die Expression von Nestin, MAP5 und NSE blieb unverändert während der Kulturdauer. Das immortalisierende Genprodukt Large-T-Antigen war am Kulturtag 10 und 14 signifikant ( $p \leq 0,05$ ) reduziert. Die NeuN-Expression wurde am Tag 3 hochreguliert und blieb konstant während der Kulturdauer. Ein Anstieg der Nurr1-Expression wurde während der Kulturdauer von 14 Tage nachgewiesen. TH-Expression wurde ebenfalls hochreguliert ( $p \leq 0,05$ ).

7. CSM14.1-Zellen wurden *in vitro* bei 39° C + 1% FCS mit einem Cocktail aus IL1, IL11, LIF und GDNF behandelt. Diese Zellen wurden mit Zellen, die ohne Zytokin-Gabe kultiviert wurden, verglichen.

8. Die Morphologie der Zellen, die unter Zytokineinfluss gezüchtet wurden, zeigte deutliche Unterschiede im Vergleich mit den Zellen, die ohne Zytokinmedium kultiviert wurden. Die Somata der Zellen beider Kulturen ähnelten multipolarer Neuronen. Die Zellen, die mit Zytokinen behandelt wurden, zeigten signifikant längere Fortsätze ( $p = 0,02$ ). Eine Zytokin-Behandlung hat hinsichtlich der Fortsatzbildung einen signifikanten additiven Effekt zur Temperaturerhöhung.

9. Die neuronalen Marker NeuN und NSE wurden in beiden Zellkulturen im Vergleich zu Kontrollen (33° C + 10% FCS) hochreguliert, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen Kulturen mit und ohne Zytokincocktail zu zeigen. Bei den Zellkulturen ohne Zytokin-Gabe nahm die Nurr1-Expression am Tag 3 zu und erreichte ihr Maximum am Tag 14. Zytokinbehandelte Zellkulturen zeigten eine starke Zunahme am Tag 3 und 7, danach folgte eine deutliche Herunterregulation. Die TH-Expression in den Zellkulturen mit und ohne Zytokin-Gabe wurde ab Tag 3 hochreguliert und blieb konstant bis Tag 14. Eine Zytokin-Behandlung bei 39° C + 1% FCS hatte auf die Expression der unterschiedlichen neuronalen Marker keinen zusätzlichen Effekt zur Temperaturerhöhung.

10. Das morphologisch sichtbare Differenzierungspotenzial der CSM14.1-Zellen scheint von der Expression neuronaler Marker unabhängig reguliert zu werden. Alleinige Temperaturerhöhung auf 39° C (ohne Zytokine) führt schon zu einer ausgeprägten Fortsatzbildung der CSM14.1-Zellen. Eine zusätzliche Zytokinbehandlung hat bezüglich dieses Parameters einen signifikanten additiven Effekt. Zukünftigen Untersuchungen muss es vorbehalten bleiben, die Signaltransduktionskaskade, die für diesen Zytokin-Effekt verantwortlich sein könnte, zu klären.

## **8. Persönliche Angaben und Dank**

### **8.1 Erklärung**

Ich erkläre, dass ich ein Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades bisher an keiner wissenschaftlichen Einrichtung beantragt habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht genutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den .....

.....

Mariya Spasova

## **8.2 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. A. Wree für die Bereitstellung des Themas sowie für die kontinuierliche fachliche Betreuung und freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ich möchte neben Herrn Prof. Wree insbesondere Herrn PD Dr. O. Schmitt aus unserem Institut danken für die bereitwillige Beratung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein weiterer Dank gilt Herrn S. J. P. Haas für seine Geduld bei der Einführung eines unerfahrenen Doktoranden in die Methoden der Histochemie und Immunhistologie.

Nicht zuletzt möchte ich den Medizinisch technischen Assistentinnen, insbesondere Frau Kuhnke und Frau Waldmann, für die geleistete Arbeit herzlichen Dank sagen.

Allen anderen Mitgliedern des Anatomischen Institutes der Universität Rostock, die mir mit konstruktiver Kritik und ihrem Interesse an dieser Arbeit geholfen haben, sei ebenfalls herzlich gedankt.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und Förderung während des Studiums und der Fertigstellung dieser Arbeit in jeder Hinsicht.

### 8.3 Lebenslauf

Name: Mariya Spasova

Geburtsdatum: 20.12.1975

Geburtsort: Sevlievo, Bulgarien

Staatsangehörigkeit: Bulgarisch

Geschlecht: weiblich

Familienstand: ledig

Adresse : Henrik-Ibsenstr.1, 18106 Rostock

E-mail: mariya.spasova@med.uni-rostock.de/mariassdr@yahoo.com

#### **Studium:**

- ab 04.2002 Promotionsstudentin, Medizinische Fakultät, Universität Rostock
- 09.1994 – 11.2000 Medizinstudium mit Staatsexamina und Approbation als Arzt, Medizinische Universität Sofia, Bulgarien
- 1989 – 1994 108. Allgemeinbildende Oberschule, Sofia, Bulgarien

#### **Berufserfahrung:**

- ab 10.2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Arbeitsgruppe Neuroanatomie, Institut für Anatomie, Universität Rostock
- 10.1998 - 08.2000 Mitarbeiterin in der chirurgischen Abteilung des „Zariza Joanna“-Krankenhauses, Sofia, Bulgarien
- 01.08- 30.08.1999 Famulatur- Klinik und Poliklinik für Pädiatrie, Sevlievo, Bulgarien
- 01.08- 30.08.1998 Famulatur- Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Pleven, Bulgarien
- 01.08- 30.08.1997 Famulatur- Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Pleven, Bulgarien

**Sprachen:**

- Bulgarisch: Muttersprache
- Englisch: Sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift, medizinisches Englisch.
- Deutsch: Sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift, medizinisches Deutsch.
- Russisch: 8 Jahre in der Grund- und Hauptschule und 3 Jahre in der medizinischen Universität

**Andere:**

- 1998 Teilnahme an dem XIV. internationalen Kongress für Studenten, Istanbul, Türkei. Präsentiertes Thema: Konventionelle oder endoskopische Cholecystektomie.

**Publikationen**

Spasova M, Schmitt O, Wree A (2004) *In vitro*-Charakterisierung der mesenzephalen immortalisierten Progenitorzelllinie CSM14.1. Ann Anat 186 (Suppl): 280 (Kurzfassung)

Spasova M, Schmitt O, Wree A (2005) Cytokine induced differentiation of the CSM14.1 cell line *in vitro*. Ann Anat 187 (Suppl): 178 (Kurzfassung)