

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Humangenetik

(Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger)

der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München

Optimierung eines *in vitro*-Kultursystems für die neuronalen
Vorläuferzellen aus dem embryonalen Mittelhirngewebe der Maus

Dipak Raj Pahari

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Medizin genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Th. A. Meitinger

2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 30.01.2012 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.2013
angenommen

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Morbus Parkinson.....	6
1.1.1	Epidemiologie	6
1.1.2	Pathologie.....	6
1.1.3	Ätiologie und Neurobiologie.....	7
1.1.4	Klinische Manifestation und Symptome	8
1.2	Pharmakotherapeutische Behandlungsmöglichkeiten	9
1.2.1	L-DOPA	9
1.2.2	Dopamin-Agonisten	9
1.2.3	Monoaminoxidase B (MAO-B)-Hemmer	9
1.2.4	Weitere pharmakologische Therapieansätze	10
1.3	Chirurgisch-interventionelle Therapieverfahren	10
1.3.1	Tiefe Hirnstimulation	10
1.3.2	Intrazerebrale Transplantation von dopaminproduzierenden Zellen.....	11
1.3.3	Gentherapeutische Verfahren	12
1.4	Grundlagen und Ziele der Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Primärzellen und Gewebekulturen	14
2.1.1	Dissektion und Trituration von ventralem Mesencephalon der Maus	14
2.1.2	Zell-Zählung (Fuchs-Rosenthal-Kammer).....	16
2.1.3	Kultivierung der primären Zellkulturen	16
2.2	Histologische Aufarbeitung der Kulturen.....	17
2.2.1	Immuncytochemie	17
2.3	Nicht-virale Transfektion	18
2.3.1	Verwendung von Versuchslipiden (Qiagen)	18
2.3.2	Transfektion von Primärzellkultur aus ventralem Mesencephalon mit Effectene (Qiagen).....	18
2.3.3	Auswertung	19
2.4	Isolierung von RNA.....	20
2.5	Reverse Transcriptase.....	20
2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.7	Statistische Auswertung	21

3	Ergebnisse	22
3.1	Expansion und Differenzierung der dopaminergen Vorläuferzellen aus embryonalem ventralen Mittelhirngewebe der Maus.....	22
3.1.1	Expansion von dopaminergen Vorläuferzellen als frei schwimmende Sphären 23	
3.1.2	Charakterisierung von expandierten VM-Kulturen nach der Differenzierung ..	25
3.1.3	Expression von GDNF Rezeptor-Komponenten in VM Kulturen	29
3.1.4	Effekte von GDNF auf die Primärzellkultur während der Differenzierungsphase	30
3.2	Transfektionsoptimierung von Primärzellkultur aus dem ventralen Mesencephalon mit Effectene (Qiagen).....	31
4	Diskussion	33
4.1	Expansion der dopaminergen Vorläuferzellen	34
4.2	Differenzierte VM Kulturen	35
4.3	Effekte von GDNF auf differenzierte dopaminerge Vorläuferzellen	37
4.4	Transfektion der Primärzellkultur mit Effectene	37
5	Zusammenfassung	39
6	Literaturverzeichnis.....	40
7	Danksagung	47
8	Ehrenwörtliche Erklärung	48
9	Lebenslauf	49

Abkürzungen

AADC	L-Aminosäure-Decarboxylase
AAV	Adenoassoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
bFGF	basic fibroblastic growth factor
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalie-Virus
COMT	Catecholamin-O-Methyl-Transferase
D6	Differenzierungstag 6
Dapi	4'-6-diamidino-2-phenylindole
DBS	deep brain stimulation
DIV	Tage <i>in vitro</i> (engl.: days <i>in vitro</i>)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle medium: nutrient mixture F-12
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E3	Expansionstag 3
E6	Expansionstag 6
E12	Embryonaltag 12
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGF	epithelial growth factor
eGFP	enhanced green fluorescence protein
FITC	fluorescein isothiocyanate
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GDNF	glia cell line-derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein

GFR α 1	GDNF-family receptor- α (glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha1)
Gpi	Globus pallidus internus
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	4-2-hydroxyethyl-1-piperazineethanesulfonic acid
HSV	Herpes-Simplex-Virus
kD	kilo-Dalton: Einheit des Molekulargewichts
LB	Lewy bodies
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylamin
MP	Morbus Parkinson
MPP	1-methyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
PBS	phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Parkinson's disease
PET	Positronenemissionstomographie
RET	receptor tyrosine kinase (rearranged in transfection)
RLT	RNeasy lysis buffer
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase -PCR
SN	Substantia nigra
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
STN	Nucleus subthalamicus
TH	Tyrosinhydroxylase
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(and-6-)isothiocyanate
β -TUB III	Beta-Tubulin III
VIM	ventral intermediate nucleus of thalamus
VM	Ventrales Mesencephalon

1 EINLEITUNG

1.1 Morbus Parkinson

James Parkinson beschrieb Anfang des 19. Jahrhunderts die nach ihm benannte Erkrankung (Parkinson J. 1817). Die klassische Trias klinischer Symptome besteht aus Rigor, Tremor und Akinese. Beschreibungen von Erkrankungen mit vergleichbaren Symptomen finden sich aber auch schon in alten indischen Schriften von 4500 - 1000 v. Chr. (Manyam et al. 1990), oder bei Leonardo da Vinci am Ende des 15. Jahrhunderts.

1.1.1 Epidemiologie

Morbus Parkinson (MP) ist nach der Alzheimerschen Erkrankung die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung des Menschen. MP tritt weltweit auf, wobei die Prävalenz dieser Erkrankung in Nordeuropa und Nordamerika höher zu sein scheint als in Südeuropa, Asien und Afrika (Masuhr K. F. Duale Reihe 1998). In Europa liegt die Prävalenz dieser Erkrankung bei über 65-Jährigen bei ca. 2 %, wobei die Inzidenz mit fortschreitendem Alter kontinuierlich steigt (de Rijk et al. 2000).

1.1.2 Pathologie

Die Pathologie des MP ist gekennzeichnet durch den Verlust dopaminerger Nervenzellpopulationen des Hirnstamms. So finden sich degenerative Prozesse in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra pars compacta (SN), der ventralen tegmentalen Area, im cholinergen Nucleus basalis Meynert, im noradrenergen Locus coeruleus, im serotonergen Nucleus raphe, im autonomen Nervensystem, im Hypothalamus und im Striatum. Von entscheidender Bedeutung für das Auftreten der Krankheitssymptome ist jedoch vor allem die Degeneration der dopaminergen Neurone der SN (Forno 1996) mit dem daraus resultierenden Dopaminmangel im Striatum. Zum Zeitpunkt der Erstmanifestation sind bereits 50 % der dopaminergen Neurone degeneriert (Fearnley et al. 1991), und die Menge an Dopamin ist im Striatum um 70 bis 80 % vermindert (Bernheimer et al. 1973). Ein weiteres typisches pathomorphologisches Charakteristikum des MP ist der Nachweis von Lewy Körpern ("Lewy bodies"; LB). Diese eosinophilen, intracytoplasmatischen Einschlusskörper können in allen betroffenen Regionen des Hirnstammes, aber auch in kortikalen Gehirnregionen nachgewiesen werden (Gai et al. 1995). Ein Hauptbestandteil der LB ist das Protein α -Synuclein (Spillantini et al. 1997).

1.1.3 Ätiologie und Neurobiologie

Für das idiopathische Parkinson Syndrom wird eine multifaktorielle Genese angenommen, wobei sowohl genetische wie auch Umweltfaktoren eine Rolle zu spielen scheinen. Als einer der Faktoren, der zur Degeneration dopaminerger Neurone führt und als Auswirkung endogener und exogener prädisponierender Faktoren unter anderem diskutiert wird, ist eine vermehrte Exposition gegenüber oxidativem Stress. Die Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale ("Reactive oxygen species"; ROS) ist ein normaler Vorgang im Zellmetabolismus und für deren Detoxifizierung haben Zellen eine Reihe von Abwehrmechanismen entwickelt (Ebadi et al. 1996). In dopaminergen Neuronen findet man per se höhere Konzentrationen von ROS. Ein Grund dafür könnte der hohe Eisengehalt dopaminerger Neuronen und die Entstehung toxischer Nebenprodukte im endogenen Dopaminstoffwechsel sein (Jenner et al. 1998). Zudem wurden erniedrigte Konzentrationen an reduziertem Glutathion in der SN von Patienten mit MP nachgewiesen, was auf eine verminderte Kapazität zur Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies hinweisen könnte (Jenner et al. 1996). Damit scheinen dopaminerge Neurone per se vulnerabler als andere Neuronenpopulationen zu sein.

Erste Hinweise für die Beteiligung exogener Faktoren bei der Genese der Parkinsonschen Erkrankung ergaben sich aus der Identifizierung des Neurotoxins MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin), das in verunreinigtem Heroin gefunden wurde und bei i.v. Drogenkonsumenten zu einem Parkinson-Syndrom geführt hatte, das klinisch nicht unterscheidbar war vom Bild eines MP (Langston et al. 1983; Jenner et al. 1981).

Obwohl die Tatsache, dass bei circa 10% der Patienten mit einem Parkinson-Syndrom weitere Familienangehörige betroffen sind, schon lange bekannt und dokumentiert ist (Gasser et al. 1994, 1998), wurde erst vor gut 10 Jahren eine Mutation in dem Gen α -Synuclein entdeckt, bei dessen Vorliegen es zu 100% zum Auftreten eines Parkinson-Syndroms kommt (Polymeropoulos et al. 1996). Im Verlauf wurden dann weitere autosomal dominante und rezessiv vererbte Mutationen in Genen identifiziert, die jedoch klinisch eher von geringer Relevanz waren, da sie meist nur in einigen wenigen Familien nachgewiesen werden konnten (Kitada et al. 1998; Hardy et al. 2003). Mit der Identifizierung von unterschiedlichen Mutationen im LRRK2 Gen bei drei Familien (Zimprich et al. 2004) und dem Nachweis der Mutationen bei bis zu einem Prozent der Patienten mit sporadischem Parkinson Syndrom, wurde die Hypothese einer nicht unerheblichen genetischen Prädisposition hinsichtlich des Auftretens der Erkrankung weiter untermauert.

Neurotrophe Faktoren, die in der Substantia nigra und Striatum von Gliazellen oder neuronalen Zielzellen exprimiert werden, tragen wesentlich zur Funktion und Aufrechterhaltung dopaminerger Neurone bei. Obwohl bis dato keine Mutationen in Genen, die für neurotrophe Faktoren kodieren, bei Patienten mit einem familiären Parkinson-Syndrom identifiziert werden konnten, wurden in RNA Microarray-Analysen eine verminderte Expression von Signaltransduktions-Komponenten von Neurotrophinen (NTs), *glia cell line-derived neurothrophic factor* (GDNF) und *brain-derived neurothrophic factor* (BDNF) nachgewiesen (Bossers et al. 2009).

1.1.4 Klinische Manifestation und Symptome

Die ersten klinischen Symptome der Parkinsonschen Erkrankung können relativ unspezifisch sein und bieten ein breites Spektrum an Manifestationen wie Dysästhesien, muskelkaterartige Schmerzen, Gewichtsverlust und Geruchsstörungen. Ebenfalls sind depressive Symptome und Störungen des Antriebs nicht selten (Berg et al. 2008). Meist erst im weiteren Krankheitsverlauf sind die klassischen Symptome mit Rigor, Tremor, Bradykinese und posturaler Instabilität nachweisbar.

Neben dem Vorliegen einer Bradykinesie in Kombination mit einem weiteren klassischen Symptom stellt die anhaltende Besserung der Symptome auf eine L-DOPA-Therapie ein wichtiges diagnostisches Kriterium dar, wobei dessen Fehlen immer an der Diagnose eines idiopathischen Parkinson-Syndroms zweifeln lassen sollte. Im weiteren Therapieverlauf mit L-DOPA treten nach durchschnittlich 5 Jahren zunehmend Wirkungsfluktuationen mit „Wearing Off“, „Peak-dose Hyperkinesien“ und „End-of-dose“ Dystonien auf (Marsden 1994). Nach 10-jähriger Behandlungsdauer können bei fast allen Patienten Wirkungsfluktuationen nachgewiesen werden (Marsden 1994). Durch den Einsatz von Dopaminagonisten kann jedoch das Auftreten von Wirkungsfluktuationen zu einem gewissen Grad hinausgezögert werden.

Neben extrapyramidal-motorischer Symptomatik tritt bei ca. 40% der Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom eine Demenz auf, wobei im Gegensatz zur Alzheimer Demenz initial weniger eine Gedächtnisstörung, sondern vielmehr eine Störung der Exekutivfunktionen im Vordergrund steht (Williams-Gray et al. 2007). Als weitere Symptome im späteren Verlauf der Erkrankung werden zudem vegetative Symptome beschrieben.

1.2 Pharmakotherapeutische Behandlungsmöglichkeiten

Zur Behandlung des Morbus Parkinson stehen eine Vielzahl von Medikamenten zur Verfügung, wobei nach wie vor Substanzen zur Substitution der dopaminergen Transmission die Basis der Behandlung darstellen. Für keines der derzeit am Markt erhältlichen Medikamente ist zweifelsfrei ein krankheitsmodifizierender Effekt nachgewiesen worden.

1.2.1 L-DOPA

L-DOPA ist nach wie vor die effektivste Therapie des MP. L-DOPA ist eine Vorstufe von Dopamin und wird durch das Enzym Dopa-Decarboxylase zu diesem decarboxyliert. Um das Auftreten peripherer, dopaminassoziierter Nebenwirkungen zu vermindern, wird dem eigentlichen Wirkstoff ein Decarboxylasehemmer (z.B. Carbidopa oder Benserazid) zugesetzt, der jedoch in weit geringerem Maße als L-DOPA die Blut-Hirnschranke überwinden kann. Neben den unter einer Langzeitgabe auftretenden L-DOPA assoziierten Wirkungsfluktuationen können wie bei allen dopaminerg wirksamen Medikamenten orthostatische Hypotensionen, Übelkeit und paranoid-halluzinatorische Symptome auftreten.

1.2.2 Dopamin-Agonisten

Dopamin-Agonisten wirken über die direkte Stimulation striataler, prä- und postsynaptischer Dopaminrezeptoren. Im Gegensatz zu L-DOPA wird jedoch eine geringere Symptomreduktion erreicht und es treten häufiger Nebenwirkungen auf (Lang et al. 1998). Der Vorteil eines Therapiebeginns mit Dopamin-Agonisten ist ein späteres Auftreten von Wirkungsfluktuationen (Widnell 2005).

1.2.3 Monoaminoxidase B (MAO-B) Hemmer

Selegilin und Rasagilin hemmen irreversibel das dopamin-abbauende Enzym Monoaminoxidase B. Die Wirkung beider Vertreter dieser Stoffklasse ist im Vergleich zu L-DOPA eher gering, wird jedoch in frühen Krankheitsstadien eingesetzt, um die Gabe von L-DOPA zu verzögern. Studien haben gezeigt, dass Rasagilin durch die Hemmung der MAO-B z.B. die Metabolisierung des Neurotoxins MPTP zu MPP^+ und das damit verbundene, vermehrte Auftreten von freien Radikalen verhindert. Nicht unumstrittene Studien haben zudem gezeigt, dass unter Gabe von Rasagilin die Degeneration der dopaminergen Neurone bei Patienten mit MP weniger rasch voranschreitet (Schapira 2008).

1.2.4 Weitere pharmakologische Therapieansätze

Der Einsatz von Amantadin und Anticholinergika beschränkt sich im Wesentlichen auf die Anfangsphase des Krankheitsverlaufs. Amantadin kann zusätzlich als Medikament zur Einsparung von L-DOPA beim Auftreten von Wirkungsfluktuationen eingesetzt werden. Beide Medikamente bergen jedoch besonders bei älteren Patienten das Risiko von Nebenwirkungen. Vor allem unter Anticholinergika treten gehäuft neuropsychiatrische Nebenwirkungen wie Gedächtnisstörungen und delirante Zustände auf. Catecholamin-O-Methyl-Transferase-Hemmer (COMT-Hemmer) werden bei Auftreten von „End of dose“-Phänomenen eingesetzt.

1.3 Chirurgisch-interventionelle Therapieverfahren

Die Erkenntnis, dass es nahezu bei allen Patienten im Verlauf der Erkrankung und unter medikamentöser Therapie zu Spätkomplikationen und letztlich zu einem Verlust der Wirksamkeit der Medikamente kommt, hat operativ-stereotaktische Verfahren wieder mehr in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt.

1.3.1 Tiefe Hirnstimulation

Die tiefe Hirnstimulation („Deep brain stimulation“ – DBS) erlebt aufgrund verbesserter Erkenntnisse über die funktionelle Vernetzung des nigro-striatalen Systems und dessen Veränderungen bei Patienten mit MP, der technischen Weiterentwicklungen bei bildgebenden Verfahren und stereotaktischen Methoden derzeit eine Renaissance. Ziel der DBS ist die Wiederherstellung der physiologischen Erregungsmuster in unterschiedlichen Kernregionen der Basalganglien durch Hochfrequenzstimulation. Zielorte hierfür sind i) der „ventral intermediate nucleus of thalamus“ (VIM), ii) der Globus pallidus internus (Gpi) oder iii) der Nucleus subthalamicus (STN). Die Wahl der Zielstruktur wird von der jeweiligen klinischen Symptomatik bestimmt. Die Stimulation des VIM führt in erster Linie zu einer Reduktion der Tremor-Symptomatik, während durch Ausschaltung des Gpi oder STN zusätzlich eine Verminderung der Bradykinese und der Dyskinesien beobachtet werden kann (Fahn 2008).

1.3.2 Intrazerebrale Transplantation von dopaminproduzierenden Zellen

Die Transplantation von dopaminproduzierenden Zellen basiert auf der Vorstellung, dass embryonale, dopaminerge Neurone nach einer Transplantation ins Striatum in der Lage sind, die Funktion der degenerierten Neurone der SN zu übernehmen und als "biologische Pumpe" eine Symptomreduktion zu bewirken. Der Grundstein der Neurotransplantation bei MP wurden bereits Ende der siebziger Jahre gelegt: Im Tierversuch wurde fetales, neuronales Gewebe in die Striata von 6-Hydroxydopamin lädierten Ratten transplantiert (Perlow et al. 1979). 1988 wurde erstmals eine Transplantation mit humanem, fetalem Gewebe bei einem Parkinson-Patienten durchgeführt (Madrazo et al. 1988). Zur Umgehung der ethischen Probleme, die mit der Verwendung von humanem embryonalem Gewebe einhergehen, wurden erstmalig im Jahre 1997 Xenotransplantationsversuche im Menschen, bei denen fetales, dopaminerges Gewebe des Schweins bei Parkinson-Patienten verwendet wurde, durchgeführt. Die dabei erzielte klinische Verbesserung der Symptomatik war jedoch marginal, was nicht zuletzt auf das schlechte Überleben der dopaminergen Neurone innerhalb des Transplantats zurückzuführen ist (Deacon et al. 1997; Schumacher et al. 2000).

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten placebo-kontrollierten Studien, im Rahmen derer bei Patienten mit MP humane fetale dopaminerge Neurone transplantiert wurden, konnte i) in der Studienpopulation keine signifikante Verbesserung des Parkinson-Syndroms nachgewiesen werden und ii) ist es bei einem Teil der Patienten zu schwer behandelbaren „off-Dyskinesien“ gekommen (Freed et al. 2001; Olanow et al. 2003). Auf Grund der zuletzt genannten Ergebnisse wurden in der westlichen Welt seitdem keine Transplantationen von fetalem dopaminergen Gewebe mehr durchgeführt. Andere Ansätze, bei denen dopaminerge Glomuszellen (Mínguez-Castellanos et al. 2003) oder retinale Pigmentepithelzellen transplantiert wurden (Stover et al. 2005), zeigten zum Teil eine Verbesserung der Parkinsonsymptomatik. Die positiven Effekte müssen jedoch noch in placebokontrollierten Studien bestätigt werden. Neue Möglichkeiten im Bereich der Neurotransplantation werden sich möglicherweise mit der Verwendung von differenzierten humanen embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) eröffnen (Rodríguez-Gómez et al. 2007)

1.3.3 Genterapeutische Verfahren

Derzeit klinisch relevante, genterapeutische Ansätze zielen i) auf die Veränderung der Neurotransmitter-Konzentration in unterschiedlichen Kerngebieten der Basalganglien und ii) auf die ektopische Expression neurotropher Faktoren ab, stellen jedoch im Ganzen eine symptomatische Form der Therapie dar.

Neben der Art der genetischen Modifikation kommt dem verwendeten Vektorsystem eine entscheidende Rolle zu, zumal dessen Sicherheit und Effizienz die Hauptdeterminanten für den Einsatz im Rahmen von klinischen Studien sind. Für den Gentransfer im präklinischen Tierversuch stehen unterschiedliche virale Vektoren zur Verfügung, darunter Herpes-Simplex-Virus (HSV), adenoassoziiertes Virus (AAV), adenovirus- und lentivirusbasierte Systeme (zur Übersicht s.a. Bauer et al. 1999). Klinische Relevanz im Bereich genterapeutischer Ansätze im ZNS hat derzeit lediglich AAV Serotyp2 (AAV2). AAV2 transduziert fast ausschließlich Neurone, ist nur wenig immunogen und verursacht als Wildtypvariante keine Erkrankung im Menschen. Nicht-virale Vektoren wären hinsichtlich ihrer Sicherheit vorteilhafter als virale Vektoren. Mit den existierenden nicht-viralen Gentransfermethoden lassen sich ausdifferenzierte und sich nicht-teilende Neurone jedoch unzureichend transfizieren. Dadurch wird der Einsatz dieser Methoden insbesondere bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen deutlich eingeschränkt.

Aktuell wird die Sicherheit drei genterapeutischer Therapieansätze bei Patienten mit MP untersucht (Phase I/II Studien): AAV2 vermittelt wird Glutamat Decarboxylase (GAD) ektop im STN exprimiert, was eine vermehrte Synthese des hemmenden Neurotransmitters GABA zur Folge hat und somit die bei Parkinson-Patienten vorliegende Überaktivität des STNs vermindern soll (Kaplitt et al. 2007). In zwei weiteren Phase I/II Studien wird ebenfalls AAV2 vektorbasiert i) das Gen für das Enzym L-Aminosäure Decarboxylase (AADC) und ii) der neurotrophe Faktor Neurturin intrastriatal exprimiert (Fiandaca et al. 2008).

1.4 Grundlagen und Ziele der Arbeit

Die bei der Parkinsonschen Erkrankung vorliegende Degeneration dopaminerger Neurone ist in den allermeisten Fällen multifaktorieller Genese und nach wie vor nur teilweise verstanden. *In vitro*-Versuche mit neuronalen Zelllinien sind ein essentieller Bestandteil derzeitiger Forschung, um grundlegende Mechanismen von Nervenzelldegeneration zu untersuchen. Neuronale Zelllinien haben jedoch den Nachteil, dass für dopaminerge Neurone spezifische Gene unter Umständen nicht exprimiert sind. Die Verwendung von kultivierten primären dopaminerger Neuronen könnte daher ein nützliches System darstellen, die in Zelllinien gefundenen Mechanismen in einem spezifischeren zellulären Hintergrund zu evaluieren. Der Nachteil bei der Verwendung von primären embryonalen Neuronen ist jedoch die limitierte Anzahl und die eingeschränkte Propagierbarkeit neuronaler Vorläuferzellen, die sich zu dopaminerger Neuronen differenzieren lassen. Vorarbeiten hierzu wurden unter Verwendung von embryonalem Mittelhirngewebe der Ratte publiziert (Studer et al. 1998), wobei durch eine genau definierte Abfolge von Kulturbedingungen dopaminerge Vorläuferzellen expandiert und anschließend differenziert wurden und dadurch eine Vervielfachung der Anzahl dopaminerger Neurone erreicht wurde. In Anbetracht der Tatsache, dass bereits Vielzahl von transgenen Parkinson-Mausmodellen existiert und insbesondere das Zusammenspiel exogener Faktoren und genetischer Veränderungen ein attraktives Feld für *in vitro*-Versuche mit primären dopaminerger Neuronen darstellt, war es das Ziel der vorgelegten Arbeit, primäre dopaminerge Kulturen aus embryonalem Mittelhirngewebe der Maus zu etablieren.

Es wurden dazu a) die Effekte unterschiedlicher Kulturbedingungen auf die Proliferation und Differenzierung dopaminerger Vorläuferzellen der Maus untersucht, b) die zelluläre Zusammensetzung und die Expression von Rezeptorkomponenten des für das Überleben dopaminerger Neurone wichtigen neurotrophen Faktors GDNF in differenzierten Kulturen dokumentiert und c) der lipidvermittelte Gentransfer in dopaminerger Vorläuferzellen optimiert.

2 Material und Methoden

Für die Verwendung von fetalem Gewebe der Mäuse und dessen genetischer Modifikation lagen die Genehmigungen der entsprechenden staatlichen Stellen vor. Versuche mit primärem Gewebe wurden am Institut für Klinische Molekularbiologie, Helmholtzzentrum München und am Institut für Humangenetik Helmholtzzentrum München und TU München, durchgeführt. Bezugsquellen von Verbrauchsmaterial und Chemikalien sind in Klammern angegeben.

2.1 Primärzellen und Gewebekulturen

Ventrales Mesencephalon (VM) wurde aus Embryonen der Maus (Charles River, Laboratories, Sulzfeld und Tierstall, Helmholtzzentrum München) am Embryonaltag 12 (E12) dissektiert und anschließend kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung von sterilen Materialien, Geräten, Lösungen und Medien. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus Instruments) bei 37 °C, 90% Luftfeuchtigkeit und unter Anreicherung der Raumluft mit 5% CO₂ kultiviert.

2.1.1 Dissektion und Trituration von ventralem Mesencephalon der Maus

Zeitlich verpaarte Mäuse wurden 12 Tage nach Konzeption (E12) unter CO₂-Narkose cervical disloziert. Das Peritoneum wurde durch einen Medianschnitt eröffnet und die Uteri mit den Embryonen entfernt. Nach mehrmaligem Waschen der Uteri mit phosphat-gepufferter Lösung (PBS, GibcoBRL, Karlsruhe) entfernten wir die Embryonen aus den Uterushörnern und überführten sie in steriles HBSS (Hanks' balanced salt solution) (GibcoBRL, Karlsruhe) mit 1% Glucose. Die Köpfe der Embryonen wurden durch einen cervicalen Schnitt isoliert. Die weitere Präparation erfolgte unter Verwendung eines binokularen Mikroskops (Zeiss, Stemi SV 6).

Zur Isolierung des ventralen Mesencephalons, in dem sich die dopaminergen Vorläuferzellen befinden, wurden zuerst die kaudalen Anteile und anschließend die dorsalen Anteile des Mesencephalons entfernt (**Abb. 1**). Das VM wurde dann rostral durch einen sektorförmigen Schnitt von dem restlichen Gehirn getrennt (Dunnett und Björklund 1992).

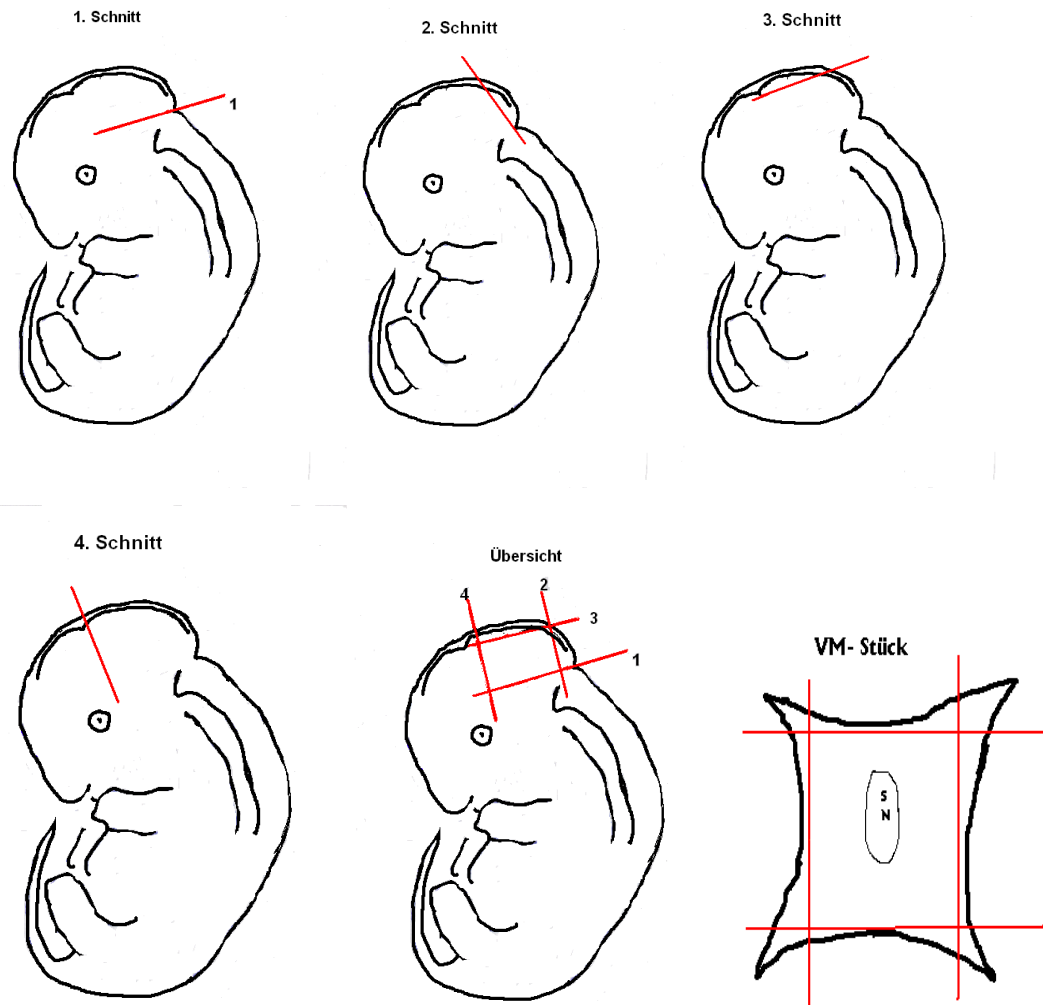


Abb. 1. Schematische Darstellung der Embryonenpräparation. Die roten Striche entsprechen den jeweiligen Skalpellenschnitten; der Kopf wurde vor der Präparation cervical vom Rumpf abgetrennt. Nach den 4 einzelnen Schnitten erhält man ein VM-Stück in Form eines Schmetterlings, das die Anlage der Substantia nigra (SN) und somit die dopaminergen Vorläuferzellen enthält.

Die VM-Stücke wurden nach der Präparation in einer Lösung aus HBSS und Glucose aufbewahrt. Pro verpaarte Maus konnten 10-12 Embryonen präpariert werden. Zur Zellvereinzelnung wurden die VM-Stücke vorsichtig mit einer großlumigen Spitze in ein 1.5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml Triturationsmedium überführt (Zusammensetzung: 20ml HBSS, 200 µl 45% Glucose, 200 µl 100mM Pyruvat und 22 µl 7,5% Natriumbicarbonat). Danach erfolgte die Trituration des VM-Gewebes mit feuerpolierten Pasteur-Pipetten unterschiedlicher Öffnungsgröße jeweils 10-mal, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Nach der Trituration wurde die Zellsuspension mit 200 g für 3 Minuten zentrifugiert. Nach

Abnahme des Überstandes wurden die abzentrifugierten Zellen mit 1 ml Medium aus DMEN/F12 (Dulbecco's modified Eagle medium: Nutrient mixture F-12) (siehe Kultivierung unten) resuspendiert.

2.1.2 Zell-Zählung (Fuchs-Rosenthal-Kammer)

Aus der Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und mit 990 µl Trypan-Blau gemischt und unter dem Mikroskop durch Auszählung einer definierten Fläche quantifiziert und die Zellzahl pro Mikroliter (µl) bestimmt.

2.1.3 Kultivierung der primären Zellkulturen

Embryonale Zellen des ventralen Mesencephalons wurden in einer Zellsuspension mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro 200 µl in 96-Lochplatten (Nunc) kultiviert. Das Kulturmedium setzte sich wie folgt zusammen: 50ml DMEM /F12 (Dulbecco's modified Eagle medium: Nutrient mixture F-12) (GibcoBRL), 500µl N2 oder 1000µl B27 Supplement (GibcoBRL), 500µl 100mM Natriumpyruvat (GibcoBRL), 500µl 45% Glucose Lösung (GibcoBRL), 0,5µg/ml Penicillin-Streptomycin und 4µg/ml Insulin. Je nach Versuchsaufbau wurden 20 ng/ml "*basic fibroblastic growth factor*" (bFGF) und/oder „*epithelial growth factor*“ (EGF) (Strathmann Biotech) jeden Tag zugegeben. Die embryonalen VM-Zellen wurden je nach Versuchsbedingung 3 bis 6 Tage kultiviert (Expansionsphase). Die so kultivierten Zellen bildeten innerhalb eines Tages rundliche Kolonien („Sphären“). Um das Anhaften der Sphären an der Kulturschale zu vermeiden, wurden sie jeden Tag während der Expansionsphase vorsichtig mit einer Pipette suspendiert. Nach Expansion wurde die Hälfte der Sphären in 24-Lochplatten (Nunc) auf Poly-D-Lysin (10µg/ml H₂O, 2 Stunden bei 37°C) beschichteten Platten in 400µl Medium für insgesamt 6 Tage kultiviert. 50% des Mediums wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

2.2 Histologische Aufarbeitung der Kulturen

2.2.1 Immunzytochemie

Die Zellen auf den Glasplättchen wurden mit PBS (phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung) gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd-PBS für 15 Minuten bei 37 °C fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Kulturen für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einer Lösung bestehend aus 10% Pferdeserum und 0,4% Triton-X-100 in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen erneut zweimal mit PBS gewaschen. Die Primärantikörper wurden in den angegebenen Konzentrationen (s.a. **Tabelle 1**) eingesetzt und in 2,5% Pferdeserum und 0,1% Triton-X-100 in PBS gelöst. Die Antikörperlösung wurde bei 4 °C über Nacht (ca. 15 - 20 Stunden) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS, wurden die fluorochrom-markierten Sekundärantikörper (1:100 verdünnt in 2,5% Pferdeserum und 0,1% Triton-X-100 in PBS) für 2 Stunden inkubiert. Zur Verwendung kamen ein rhodamin-(TRITC)-konjugierter, gegen Kaninchen IgG gerichteter Antikörper (Dako, Carpinteria, USA) und ein fluorescein-(FITC)-konjugierter, gegen Maus IgG gerichteter Antikörper (Dako, Carpinteria, USA). In manchen Versuchen wurde zur Darstellung der Zellkerne 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (Dapi) zur Lösung mit dem Zweitantikörper in einer Konzentration von 3µM zugesetzt. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Kulturen auf den Glasplättchen auf einen Objektträger übertragen, mit 50% Glycerin-PBS beschichtet und mit einem Glasplättchen abgedeckt. Die so antikörper-markierten Zellen wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Axioskop) ausgewertet.

Tabelle 1: Liste von verwendeten Primärantikörpern

Primärantikörper gegen	Verdünnung	Spezies
Green fluorescent protein (GFP, Clontech, Palo Alto, USA)	1 : 1000	Kaninchen
Glial fibrillary acidic protein (GFAP, Chemicon, Temecula, USA)	1 : 500	Maus
β-Tubulin III (Chemicon, Temecula, USA)	1 : 400	Maus
Nestin (PharMingen, San Diego, USA)	1 : 1000	Maus
Tyrosinhydroxylase (TH, Chemicon, Temecula, USA)	1 : 500	Maus

2.3 Nicht-virale Transfektion

2.3.1 Verwendung von Versuchslipiden (Qiagen)

Für die Transfektion der primären Zellkulturen wurden von der Firma Qiagen (Hilden) sechs nicht kommerziell erhältliche Lipide für eine Testung zu Verfügung gestellt. Die Versuchslipide (Lipid 1 - 6) (Qiagen, Hilden) wurden in Mengen von 1,125 µl bis 11,25µl mit EC-Buffer auf 90µl aufgefüllt. In einem weiteren Ansatz wurden 1,35 µg Vektor DNA in 113µl EC-Buffer gelöst. Danach wurde Komponente 1 im Verhältnis 1 (DNA in µg) zu 16 (Komponente 1 in µl) zugegeben, gevortext und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Ansatz dem Lipid-Ansatz hinzugefügt und nach wiederholtem Vortexen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Vorlage von 450 µl Expansionsmedium pro Vertiefung (24 Loch-Platte) wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 6 oder 16 Stunden unter normalen Kulturbedingungen wurde das Medium abgesaugt und durch Differenzierungsmedium ersetzt.

2.3.2 Transfektion von Primärzellkultur aus ventralem Mesencephalon mit Effectene (Qiagen)

Die Transfektion der Kulturen wurde am Tag 3 nach der Ausplattierung („3 days in vitro“ DIV 3) durchgeführt. Vektor-DNA (Konzentrationen sind in **Tabelle 2** aufgelistet) wurde in Puffer EC (Qiagen) suspendiert und mit Enhancer (Qiagen) versetzt. Für 1 µg DNA wurden 8 µl Enhancer I oder 16 µl Enhancer II verwendet. Das DNA-Transfektionsgemisch wurde für 2 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Effectene (Qiagen, Konzentrationen s. u. die **Tabelle 2**) zugegeben und nach einer 5 bis 10 minütigen Inkubationszeit in die 24-Lochplatten mit den ausplattierten Zellen gegeben. Nach 48 Stunden wurden die transfizierten, GFP-positiven Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Axioskop) ausgewertet.

Tabelle 2: Tabellarische Übersicht von Lipid, Vektor und Enhancer

Vektor-DNA in μg	Enhancer I in μl	Effectene in μl	Verhältnis: DNA zu Effectene
0,1	0,8	1	1 : 10
		2,5	1 : 25
		5	1 : 50
0,2	1,6	2	1 : 10
		5	1 : 25
		10	1 : 50
0,4	3,2	4	1 : 10
		10	1 : 25
		20	1 : 50
Vektor-DNA in μg	Enhancer II in μl	Effectene in μl	Verhältnis: DNA zu Effectene
0,1	1,6	1	1 : 10
		2,5	1 : 25
		5	1 : 50
0,2	3,2	2	1 : 10
		5	1 : 25
		10	1 : 50

2.3.3 Auswertung

Die Anzahl der GFP-positiven Zellen wurde prozentual berechnet. Es wurden zuerst alle GFP-positiven Zellen pro Kulturschale gezählt. Parallel dazu wurde eine gleich behandelte Kultur mittels Trypsinbehandlung vereinzelt und die Gesamtzahl der Zellen durch Zählung in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt. So ergab sich das prozentuale Verhältnis von transfizierten zu gesamten Zellen. Die Auswertung erfolgte frühestens 24 und 48 Stunden nach der Transfektion.

2.4 Isolierung von RNA

Tiefgefrorenes Gewebe und Zellen wurden nach dem Auftauen mit Lysepuffer (Puffer RLT mit β -Mercaptoethanol, Qiagen) vermischt. Zu etwa 4-5 VM-Explantaten (entspricht etwa 400.000-500.000 Zellen) erfolgte eine Zugabe von 100 μ l RLT Puffergemisch. Nach Homogenisierung und Zugabe von weiteren 250 μ l RLT Puffer wurde das Gemisch für 2 Minuten inkubiert. Nach 3 minütigem Zentrifugieren bei 15.000 rpm nahm man den Überstand ab und vermischte ihn mit 350 μ l 70% Ethanol. Die Suspension wurde dann in eine RNase-freie „RNeasy mini spin column“ (Qiagen) übertragen und für 15 Sekunden bei 10.000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der Säule mit RW1 und RPE Puffer (Qiagen). Die RNA wurde im Anschluss in 30 μ l RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation der Säulen gelöst. Die gelöste RNA lagerte man bei -80 °C. Die Konzentration der RNA in Lösung wurde mit einem Spektralphotometer (Kontron) über die UV-Absorption bestimmt.

2.5 Reverse Transcriptase

Pro 20 μ l Ansatz wurden 1000ng Gesamt-RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Vor der Reaktion erfolgte die Denaturierung der RNA für 5 Minuten bei 65 °C. Das Reaktionsgemisch bestand aus 2 μ l RT Puffer (Qiagen), 2 μ l Desoxyribonukleosidtriphosphat-Lösung (dNTPs, 10mM), 2 μ l Oligo-dT Primer (10 μ M), sowie 1 μ l Reverser Transkriptase (Qiagen, 10 Einheiten) und destilliertem Wasser. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Es wurde die Expression von zwei verschiedenen GDNF-Rezeptorkomponenten, GFR α -1 und C-RET, in Primärgewebe und VM-Kulturen nachgewiesen. Dazu wurden jeweils 2 μ l cDNA aus dem RT Ansatz für die PCR eingesetzt. Ein 20 μ l Ansatz bestand aus 2 μ l Reaktionspuffer (Invitrogen), 2 μ l Desoxyribonukleosidtriphosphat Lösung (dNTPs, 10mM), 2 μ l Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 μ M), sowie 0,5 μ l Taq-Polymerase (Invitrogen, 10 Einheiten). Folgende Primer wurden benutzt: GFR α -1-forward (5'- GCG GGC AAG GAA ACC AACT - 3') und GFR α -1- reverse (5'- CAT AGG AGC ACA CAG GGA CG - 3'); C-RET-forward (5'-AGC AGA GAC TAC TTG GAC CTG GC-3') und C-RET-reverse (5'-CGG G AG GGG AGC ATT GTT AC-3'). Es folgten 40 Zyklen mit folgenden Temperaturen und Zeiten: 30 Sekunden bei 95 °C, 30 Sekunden bei 65 °C und 45 Sekunden bei 72 °C. Nach den 40 Zyklen wurde das Reaktionsgemisch über 10 Minuten auf 72 °C erhitzt und anschließend auf 4 °C

abgekühlt. Die Größe des PCR-Produkts wurde auf einem 1%igem Ethidiumbromid-Agarose-Gel überprüft.

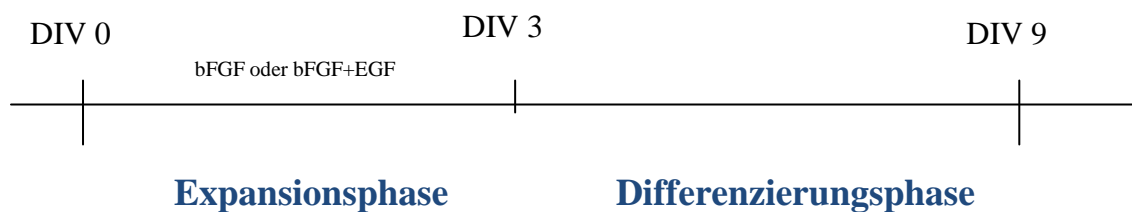
2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mittels der in Microsoft Excel integrierter Analyse-Software durchgeführt. Die Messwerte wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung ausgewiesen. Zum Vergleich zweier Gruppen wurde ein t-test, zum Vergleich mehrerer Behandlungsgruppen eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Expansion und Differenzierung der dopaminergen Vorläuferzellen aus embryonalem ventralem Mittelhirngewebe der Maus

Das ventrale Mittelhirn (VM) von Mäuseembryonen, die bis zum Tag 12 (Embryonaltag 12, E12) ausgetragen wurden, wurde isoliert und anschließend trituriert, so dass eine homogene Einzelzellsuspension entstand. 100.000 Zellen wurden in 200 µl serumfreiem Kulturmedium, das entweder N2 oder B27 Supplement-Medium enthielt, in unbeschichtete Kulturschalen überführt. Für einen Zeitraum von 3 oder 6 Tagen wurden die Wachstumsfaktoren bFGF („basic fibroblast growth factor“) und/oder EGF („epidermal growth factor“) jeden Tag in einer Konzentration von jeweils 20ng/ml Medium zugegeben (Expansionsphase). Anschließend wurden die als Sphären im Medium schwimmend wachsenden Vorläuferzellen in Kulturschalen mit Poly-D-Lysin beschichtete Glasplättchen überführt und ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren für weitere 6 Tage kultiviert (Differenzierungsphase) (zur Übersicht siehe **Abb. 2**).



oder

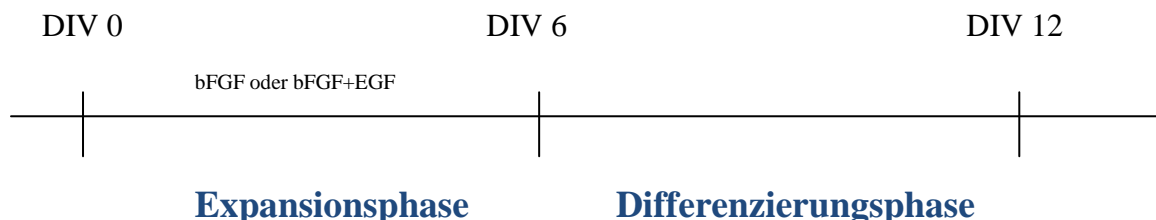


Abb. 2. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Expansion der VM-Kulturen mit Wachstumsfaktoren und anschließende Differenzierung.

3.1.1 Expansion von dopaminergen Vorläuferzellen als frei schwimmende Sphären

Das Zellwachstum wurde nach einer drei- beziehungsweise sechstägigen Expansionsphase anhand der Anzahl der Sphären („Zellcluster“), sowie deren Größe untersucht (**Abb. 3**).

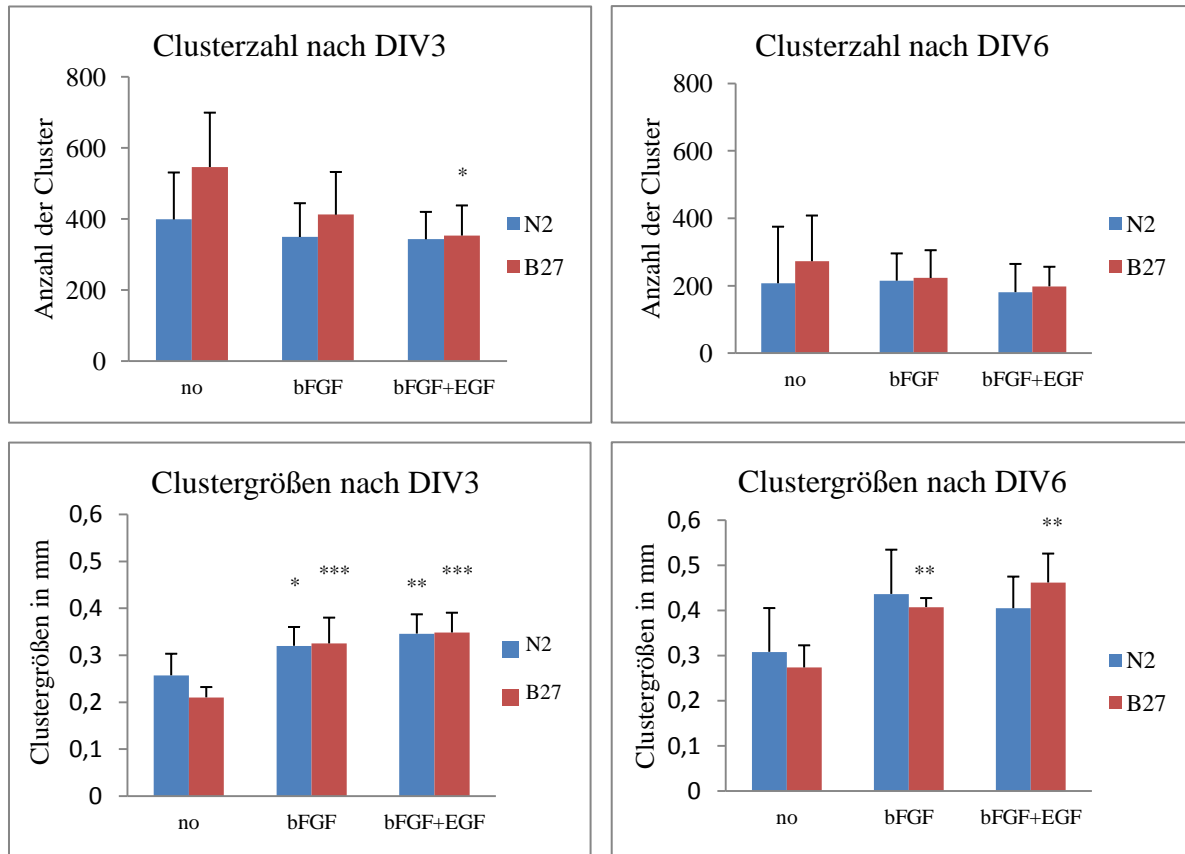


Abb. 3. Sphärenanzahlen und deren Größe nach drei- (DIV3) bzw. sechstägiger (DIV6) Expansion mit bFGF und bFGF+EGF. Die Versuche wurden in 2 unterschiedlichen Kulturmedien mit N2- oder B27-Supplement durchgeführt. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** , $p < 0,001$ ***

Nach DIV 3 gab es im N2-Kulturmedium keinen signifikanten Unterschied in der Clusterzahl zwischen der Kontrollgruppe (399 \pm 132, n=10) und den mit Wachstumsfaktoren (bFGF: 349 \pm 95, n=10; $p=0,51$ sowie bFGF und EGF: 343 \pm 77, n=10; $p=0,43$) behandelten Gruppen. In B27-Kulturmedium fanden sich nach DIV 3 in der Kontrollgruppe (546 \pm 153, n=10) mehr Cluster als in der mit bFGF (412 \pm 120, n=10) behandelten Gruppe ($p > 0,05$). Eine signifikant geringere Clusterzahl war in den mit bFGF und EGF behandelten Gruppen (353 \pm 84, n=10) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (546 \pm 153, n=10) nach DIV 3 in B27-Kulturmedium zu verzeichnen ($p < 0,05$).

Im N2-Kulturmedium nach DIV 3 enthielten die mit bFGF behandelten Gruppen 1,3-fach ($0,32 \pm 0,04$, $n=10$) größere Cluster ($p < 0,05$) bzw. die mit bFGF und EGF behandelten Gruppen 1,35-fach ($0,34 \pm 0,041$, $n=10$) größere Cluster ($p < 0,01$) als die Kontrollgruppen ($0,25 \pm 0,046$ mm, $n=10$). In B27-Kulturmedium waren die Cluster in den mit bFGF behandelten Gruppen 1,5fach ($0,32 \pm 0,055$, $n=10$) sowie den mit bFGF und EGF behandelten Gruppen 1,65fach ($0,34 \pm 0,042$; alle $n=10$) größer als in den Kontrollgruppen ($0,21 \pm 0,022$ mm, $n=10$) ($p < 0,001$). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden mit Wachstumsfaktoren behandelten Gruppen in N2- bzw. B27-Kulturmedium sowohl in der Clusterzahl als auch in der Clustergröße ($p > 0,05$).

Nach 6 Tagen in vitro (DIV 6) war die Clusteranzahl im N2-Kulturmedium unter mit Wachstumsfaktoren behandelten Bedingungen (bFGF- 215 ± 80 , $n=6$; bFGF und EGF- 181 ± 83 , $n=8$) im Vergleich zu Kontrollgruppe (207 ± 167 , $n=6$) vergleichbar ($p > 0,05$). Ebenso konnten im B27-Kulturmedium keine signifikanten Unterschiede in der Clusterzahl unter den beiden Gruppen (Kontroll- 272 ± 135 , $n=8$ versus bFGF- 223 ± 82 , $n=8$ sowie bFGF und EGF- 198 ± 58 , $n=10$) verzeichnet werden ($p > 0,05$). Währenddessen fand sich im B27-Kulturmedium im Gegensatz zum N2-Kulturmedium ein signifikanter Unterschied bezogen auf Clustergrößen nach DIV 6. Die Clustergrößen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Kontrollgruppe mit N2-Kulturmedium ($0,27 \pm 0,049$, $n=6$) und in der bFGF behandelten Gruppe ($0,40 \pm 0,020$, $n=6$) bzw. in der mit bFGF und EGF behandelten Gruppe ($0,46 \pm 0,064$, $n=8$) ($p > 0,05$). Im B27-Kulturmedium enthielten die mit bFGF behandelte Gruppen 1,5-fach ($0,40 \pm 0,020$, $n=8$) größere Cluster ($p < 0,01$) bzw. die mit bFGF und EGF behandelten Gruppen 1,7-fach ($0,46 \pm 0,064$, $n=10$) größere Cluster als die Kontrollgruppen ($0,27 \pm 0,049$, $n=6$) ($p < 0,01$).

Nach Expansion der VM-Vorläuferzellen als frei schwimmende Sphären in 96-Lochplatten (**Abb. 4A**), können diese auf Poly-D-Lysin-beschichteten Platten differenziert werden. Innerhalb eines Tages haften die Sphären am Boden der Kulturschale an und bildeten Fortsätze aus (**Abb. 4 B-D**).

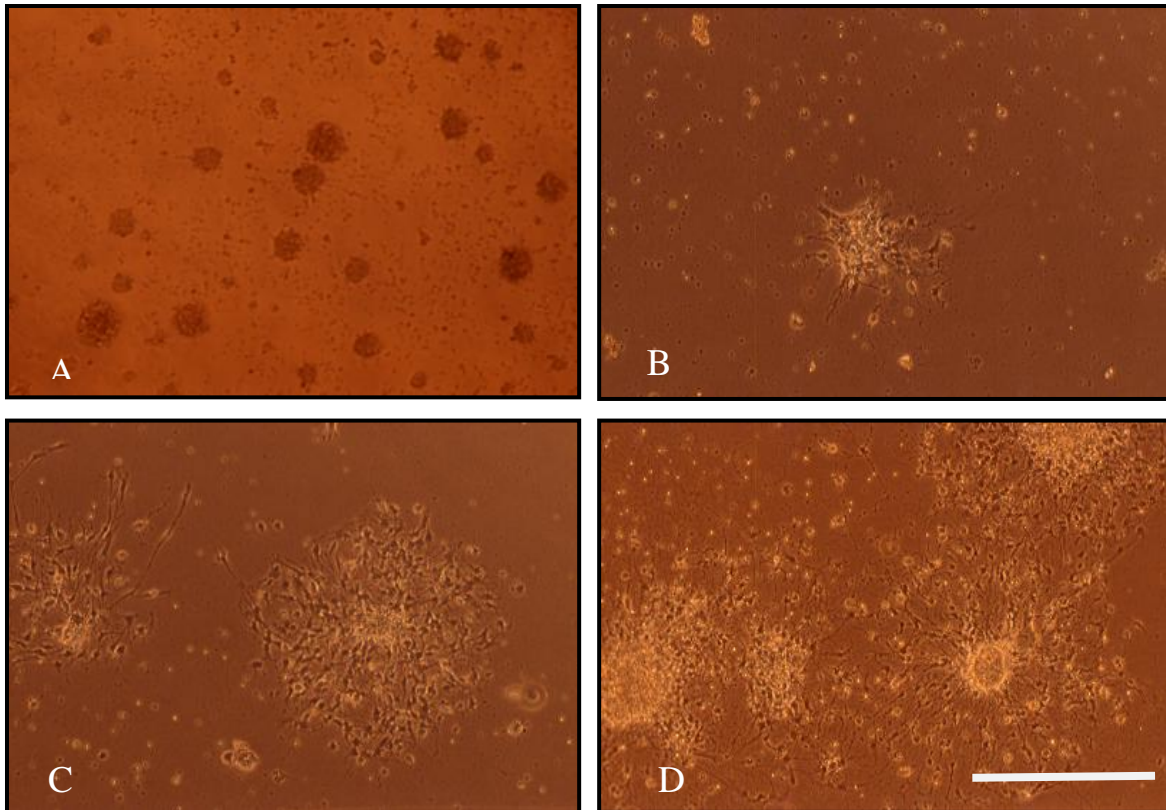


Abb. 4. Hellfeldmikroskopische Bilder der VM-Kulturen in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung: (A) schwimmende Sphären nach dreitägiger Expansion (bFGF, N2-Medium) in 96-Lochplatten. Auf pD-Lysin differenzierte VM-Vorläuferzellen nach einem (B), drei (C) und sechs Tagen (D). Skalierungsbalken entspricht 500µm.

3.1.2 Charakterisierung von expandierten VM-Kulturen nach der Differenzierung

Um den Embryonaltag 12 (E12) unterliegt das ventrale Mesencephalon einem starken Wandel bezüglich der Entwicklung und der Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen *in vivo* (Studer et al., 1998). Um die zelluläre Zusammensetzung der differenzierten Kulturen in Abhängigkeit von unterschiedlichen Expansionsprotokollen *in vitro* zu untersuchen, wurden diese immunhistochemisch charakterisiert.

In **Tabelle 3** sind die Antigene und die dazugehörigen Zelltypen aufgeführt.

Tabelle 3: Auflistung unterschiedlicher, durch Antikörper nachgewiesener Antigene, die typischerweise in Neurone, Gliazellen und undifferenzierte Vorläuferzellen exprimiert sind.

Antigen	Markierter Zelltyp
Nestin	Neuroepitheliale Vorläuferzellen
β -Tubulin III	Neuronen
GFAP	Gliazellen
TH	Dopaminerge Neuronen

In den Kulturen, die nicht mit Wachstumsfaktoren expandiert wurden, konnten nur vereinzelte TH- und β -Tubulin III-positive Zellen nachgewiesen werden. Immunhistochemische Marker für Gliazellen (GFAP) und undifferenzierte Vorläuferzellen (Nestin) waren in Kulturen, die nicht mit Wachstumsfaktoren behandelten wurden, ebenfalls nicht nachweisbar.

Im Gegensatz dazu werden alle oben aufgeführten Marker in bFGF-expandierten und anschließend differenzierten Kulturen exprimiert. Die **Abb. 5A-D** zeigen jeweils TH-, β -Tubulin III-, Nestin- und GFAP-positive Zellen nach 9-tägiger Kulturzeit (3-tägige Expansionszeit mit bFGF, gefolgt von weiterer 6-tägiger Differenzierungszeit).

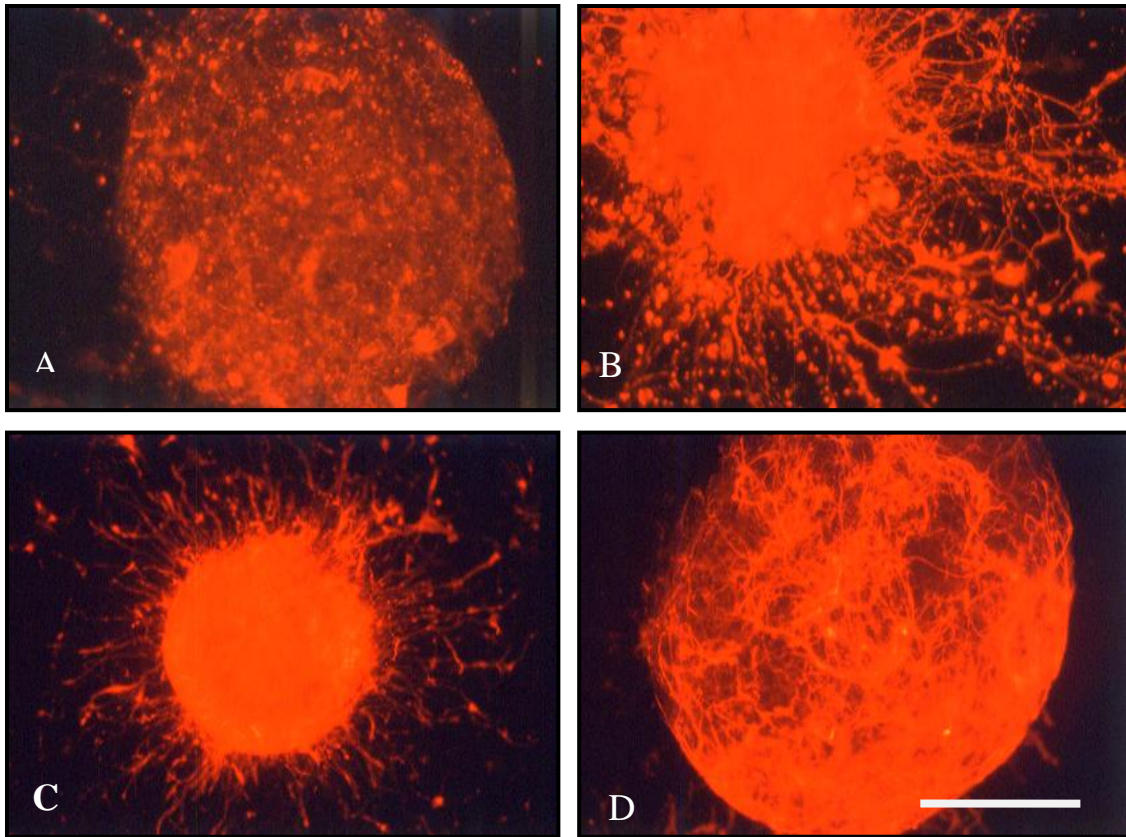


Abb. 5. Immunhistochemische Charakterisierung der VM-Kulturen der Maus: Darstellung von TH- (A), β -tubulin III- (B), Nestin- (C) und GFAP-positive (D) Zellen nach DIV9 (nach 3-tägiger Behandlung mit bFGF und anschließender Differenzierung für ebenfalls 6 Tage). Skalierungsbalken entspricht 300 μ m.

Die Anzahl der TH-positiven Neurone wurde abhängig von den verwendeten Wachstumsfaktoren (bFGF oder bFGF+EGF), der Medienzusätze (B27 oder N2) und der Länge der Expansionsphase (3 oder 6 Tage) evaluiert (**Abb. 6**).

Nach 3-tägiger Expansionszeit mit bFGF konnten im N2-Kulturmedium 9,1-fach mehr TH-positive Zellen (236 \pm 50, n=7) nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe (25,7 \pm 26, n=6) (p<0,001). Nach der gleichen Expansionszeit mit bFGF und EGF fanden sich im N2-Kulturmedium 9,2-fach (237 \pm 65, n=8) mehr TH-positive Zellen als in der Kontrollgruppe (p<0,001). Im B27-Kulturmedium wurden nach 3-tägiger Expansion im Vergleich zu der Kontrollgruppe (19 \pm 19,4, n=6) in der mit bFGF-behandelten Gruppe 14,4-fach (275 \pm 61, n=8) bzw. in der mit bFGF und EGF-behandelten Gruppe 16,6-fach (317 \pm 131, n=8) mehr TH-positive Zellen nachgewiesen (p<0,001). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der TH-positiven Zellzahl zwischen den bFGF und bFGF+EGF behandelten Gruppen nach 3-

tägiger Expansion. Bezüglich der Zahl TH-positiver Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen N2- und B27-Kulturmedien festgestellt werden (**Abb. 6A**).

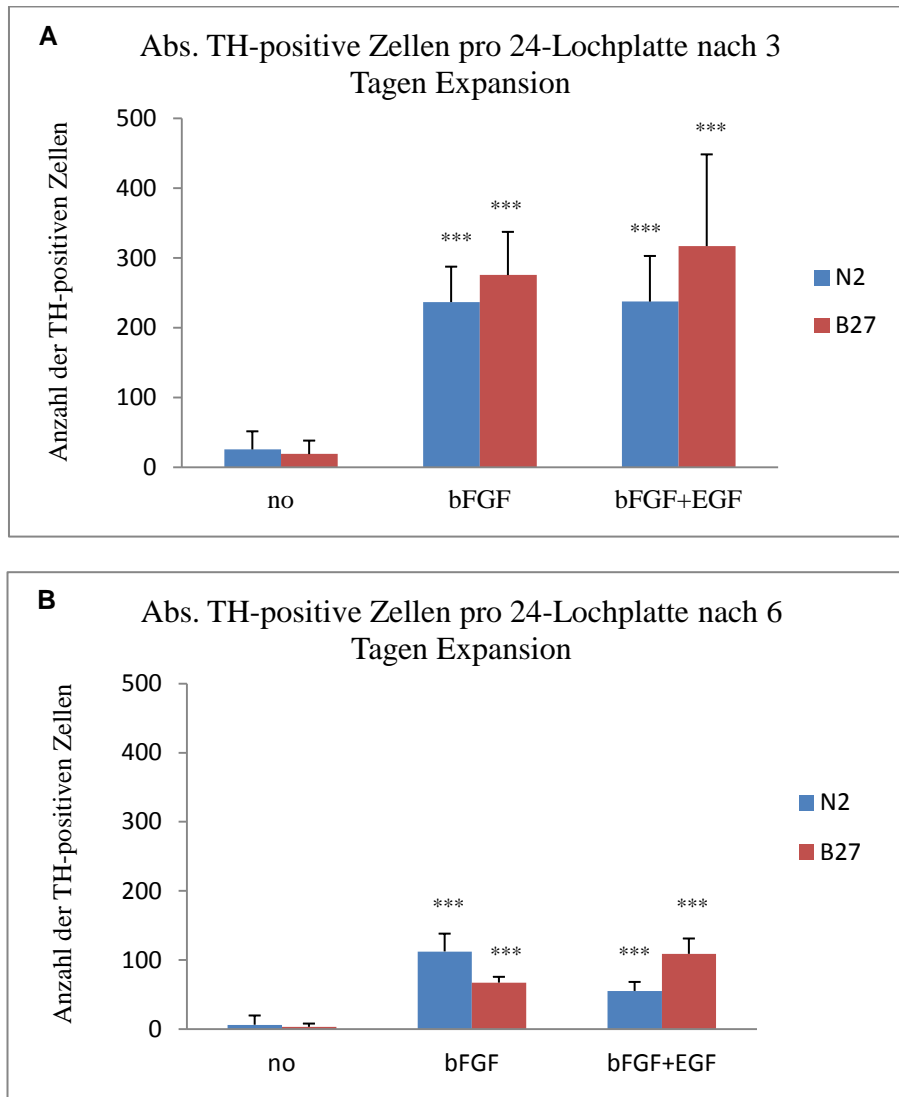


Abb. 6. Anzahl der TH-positiven Zellen pro $\frac{1}{2}$ VM (50,000 Zellen) nach 3 (A) und 6 Tagen (B) Expansion mit bFGF oder bFGF/EGF in N2- und B27-supplementiertem Medium. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$.

Nach 6-tägiger Expansion mit bFGF konnten in N2-Kulturmedien (112 ± 25 , $n=7$) 18,6-fach mehr TH-positive Zellen ermittelt werden als in den Kontrollgruppen ($6 \pm 5,5$, $n=5$) ($p < 0,001$). Bei der Expansion der Zellkultur im N2-Kulturmedium mit bFGF und EGF für 6 Tage wurden 9,1-fach mehr TH-positive Zellen (55 ± 13 , $n=7$) nachgewiesen als in den Kontrollgruppen ($p < 0,001$). Im B27-Kulturmedium fanden sich nach 6-tägiger Expansion mit bFGF 16,7-fach mehr TH-positive Zellen (67 ± 8 , $n=7$) bzw. mit bFGF+EGF 27-fach mehr TH-positive Zellen (108 ± 22 , $n=7$) als in der Kontrollgruppe ($4 \pm 4,7$, $n=5$) ($p < 0,001$).

Während im N2-Kulturmedium signifikant weniger TH-positive Zellen nach der 6-tägigen Expansion mit bFGF+EGF (55+/-13, n=7) im Vergleich mit der mit bFGF (112+/-25, n=7) behandelten Gruppe detektiert werden konnten ($p < 0,001$), stellte sich heraus, dass im B27-Kulturmedium unter der gleichen Expansionszeit mit bFGF+EGF (108+/-22, n=7) signifikant mehr TH-positive Zellen vorhanden waren als mit bFGF alleine (67+/-8, n=7) ($p < 0,001$). Ebenfalls konnte im Vergleich der Zahl TH-positiver Zellen in N2- und B27-Kulturmedien sowohl in den mit bFGF als auch in den mit bFGF+EGF behandelten Gruppen signifikanter Unterschied beobachtet werden ($p < 0,001$) (**Abb. 6B**).

3.1.3 Expression von GDNF-Rezeptor-Komponenten in VM-Kulturen

„*Glial cell line derived neurotrophic factor*“ (GDNF) ist einer der wirkungsvollsten neurotrophen Faktoren für dopaminerge Zellen (Lin et al., 1993). GDNF bindet unter anderem an „*Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 1*“ ($GFR\alpha 1$) und aktiviert dadurch die Rezeptortyrosinkinase RET („*rearranged in transfection*“). $GFR\alpha 1$ als auch der RET-Rezeptor sind *in vivo* sowohl in sich entwickelnden als auch in murenen dopaminergen Neuronen exprimiert (Airaksinen, M. Saarma et al. 2002). Um zu untersuchen, inwieweit die GDNF-Rezeptorkomponenten auch in expandierten *in vitro*-VM-Kulturen vorhanden sind, wurde die Expression von $GFR\alpha 1$ und C-RET mittels PCR zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (**Abb. 7**).

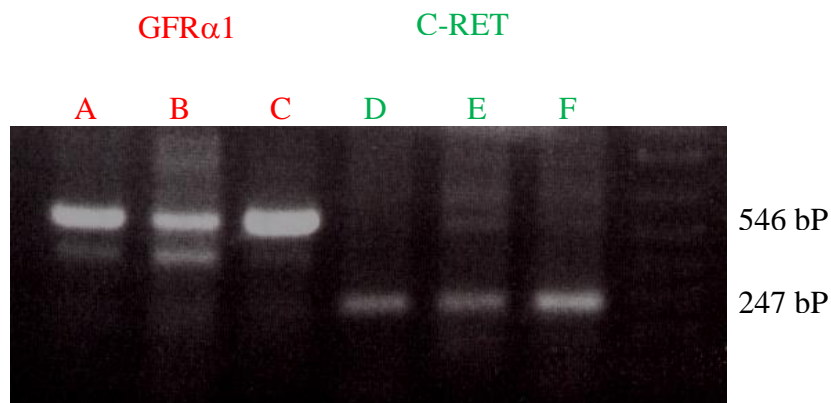


Abb. 7. Nachweis der $GFR\alpha 1$ - und RET-Rezeptoren in der PCR. (A) $GFR\alpha 1$ -Amplifikat nach DIV 6, (B) nach DIV 3, und (C) aus dem Primärgebe. (D) C-RET-Amplifikat nach DIV 6, (E) DIV 3, und (F) aus Primärgebe. Die Zellkulturen wurden jeweils für 3 Tage mit bFGF expandiert. PCR-Amplifikate wurden mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

GFR α 1 und c-Ret mRNA ist sowohl in Primärgewebe als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten während Expansion in VM-Kulturen exprimiert.

3.1.4 Effekte von GDNF auf die Primärzellkultur während der Differenzierungsphase

Die Zellkultur wurde in einem B27-Kulturmedium für 3 Tage mit bFGF expandiert. Anschließend wurden während der Differenzierungsphase (6 oder 12 Tage) die Zellen alle 2 Tage mit 20 ng/ml GDNF behandelt. In den mit GDNF-behandelten Kulturen waren nach 6 Tagen 1,17-fach (270 +/- 44, n=5, vs. Kontrollen: 230 +/- 51, n=6) beziehungsweise nach 12 Tagen 1,85-fach (385 +/- 40, n=5, vs. Kontrollen: 207 +/- 26, n=6, $p < 0,001$) mehr TH-positive Zellen nachzuweisen als in den jeweiligen Kontrollgruppen. Die Anzahl der TH-positiven Neuronen in den Kontroll-Kulturen hat nach 12 Tagen Differenzierung im Vergleich zu der 6-tägigen Differenzierung nur minimal abgenommen (**Abb. 8**). Im Gegensatz dazu waren in den mit GDNF behandelten Gruppen nach verlängerter Behandlungsdauer signifikant mehr TH-positive Zellen zu verzeichnen ($p < 0,0027$). Außerdem ergab die immunhistochemische Untersuchung der GDNF-behandelten Zellen ein ausgeprägteres Axonen- und Dendritennetz der dopaminergen Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

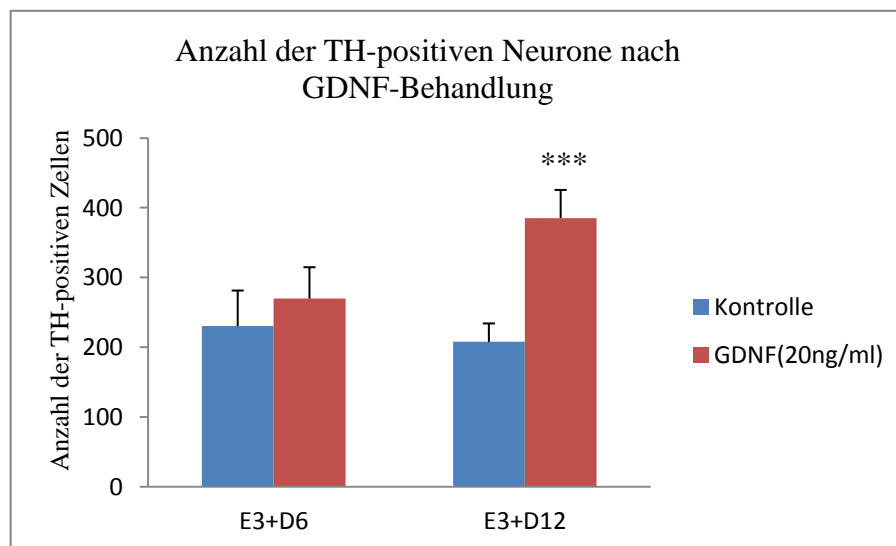


Abb. 8. Anzahl der TH-positiven Neuronen nach GDNF-Behandlung während der Differenzierungsphase. Anzahl TH-positiver Zellen nach 6- (links) und 12-tägiger (rechts) Differenzierung. $p < 0,001$ ***.

3.2 Transfektionsoptimierung von Primärzellkultur aus dem ventralen Mesencephalon mit Effectene (Qiagen)

Für die Transfektionsversuche der mesencephalen Kulturen wurde Effectene (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Transfektion erfolgte am DIV 3 in 96-Lochplatten mit bFGF-expandierten Kulturen. Die Kulturen wurden mit ansteigenden Mengen (0,1-0,4µg) eines plasmidalen Vectors (pCMVeGFP), der für das „*enhanced green fluorescence protein*“ (eGFP) kodiert war, transfiziert.

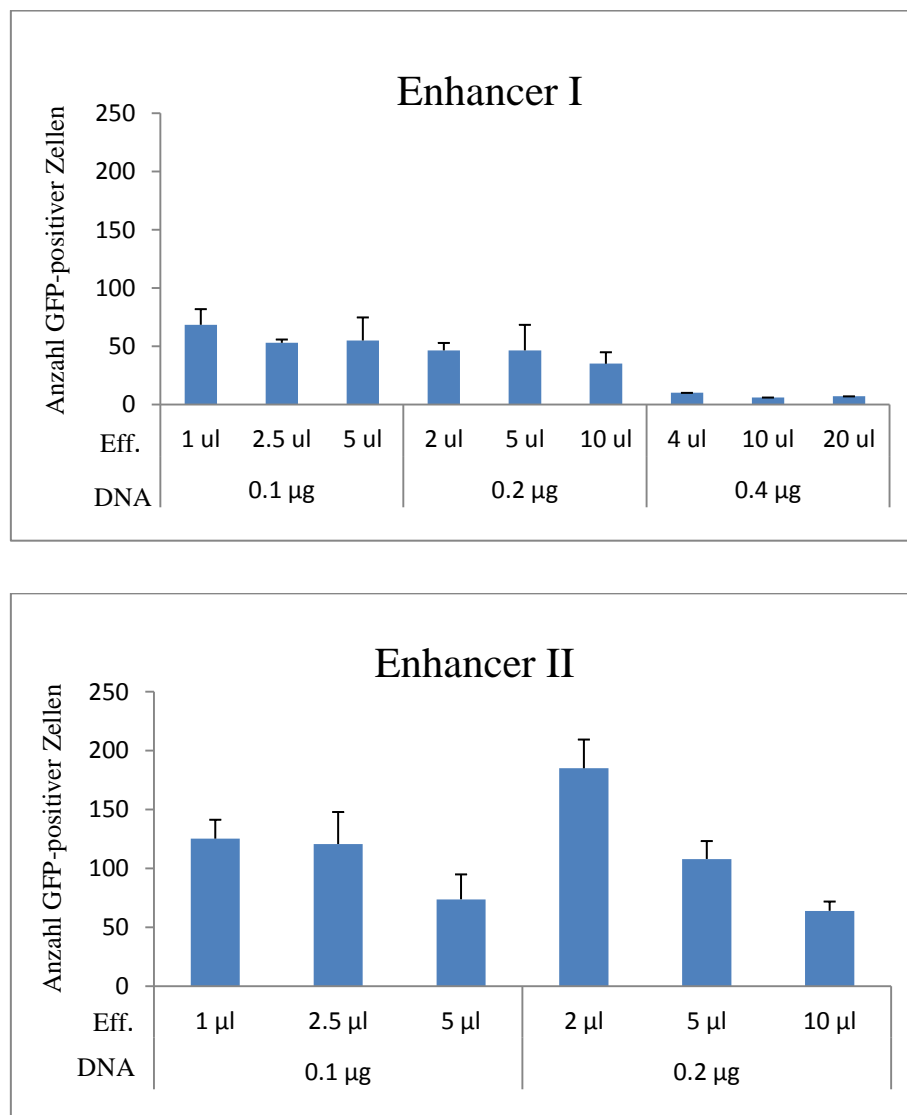


Abb. 9. Abhängigkeit der Anzahl der transfizierten Zellen von unterschiedlichen Transfektionsparametern. 100,000 Zellen wurden isoliert, in 96-Lochplatten für 3 Tage mit bFGF expandiert und anschließend mit unterschiedlichen Effectene-DNA-Mischungen transfiziert. Die DNA-Mengen betragen 0,1, 0,2 und 0,4 µg, Effectene wurde in einem µg-µl Verhältnis von 1 zu 10, 25 und 50 eingesetzt. Es wurden zusätzlich 2 unterschiedliche Enhancer (1 und 2) verwendet.

Zur Identifizierung der idealen Transfektionsbedingungen untersuchten wir unterschiedliche DNA-Lipid-Verhältnisse (1:10, 1:25 und 1:50 μg zu μl).

Zur quantitativen Untersuchung der GFP-positiven Zellen wurden die lebenden Kulturen 48 Stunden nach der Transfektion unter dem UV-Mikroskop quantifiziert. Bei Verwendung des Enhancers 1 war die Transfektionseffizienz mit 0,1 μg und 0,2 μg unter den verschiedenen Bedingungen vergleichbar (1 μl Effectene und 0,1 μg DNA: 68 \pm 13, n=4). Unter Verwendung von 0,4 μg Plasmid-DNA fiel die Transfektionseffizienz deutlich ab. Mit Enhancer 2 wurden etwas höhere Transfektionseffizienzen erreicht (2 μl Effecten und 0,2 μg DNA: 185 \pm 24, n=4) (**Abb. 9**). Somit hatte weniger das Mischungsverhältnis von DNA und Lipid sondern eher die absolute Menge der Vektor-DNA einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz. Auf Grund der komplexen zellulären Zusammensetzung der Kulturen konnten nicht regelhaft die relativen Transfektionsraten erhoben werden, insgesamt lag die relative Transfektionseffizienz jedoch deutlich unter 1 % (**Abb. 10**).

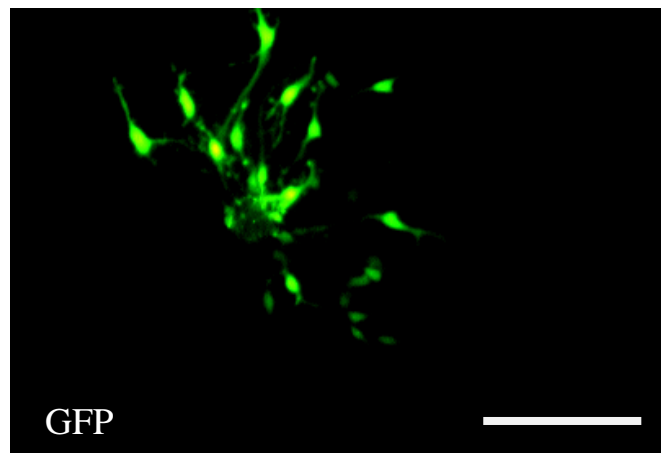


Abb. 10. eGFP-positive VM-Zellen 4 Tage nach Transfektion mit pCMVeGFP. Expandierte VM-Zellen wurden an DIV 3 transfiziert und nach 4 Tagen fixiert. Skalierungsbalken entspricht 100 μm .

Immunhistochemische Untersuchungen mit den in **Tabelle 3** aufgeführten Markern haben keinen Aufschluss darüber gegeben, um welche Art es sich bei den transfizierten Zellen handelt.

4 Diskussion

Obwohl mögliche Funktionsstörungen unterschiedlicher zellulärer Strukturen, die bei der Entstehung der Parkinsonschen Erkrankung eine Rolle spielen, intensiv beforscht werden, steht bis dato noch kein in sich schlüssiges pathogenetisches Konzept zur Erklärung der zellulären Veränderungen zur Verfügung (Hardy et al. 2006; Trojanowski et al. 1998). Unterschiedliche genetische (Preeti et al. 2010 und Lin et al. 2009) und auf Neurotoxin-Behandlung basierende Tiermodelle (Katagiri et al. 2010; Walker et al. 2010) sowie zelllinienbasierte Modelle (Andrew et al. 2009) werden derzeit in der Grundlagenforschung verwendet, wobei *in vivo*-Ansätze sehr aufwendig sind und klassische Zelllinien zumeist nicht genügend Ähnlichkeiten mit den bei der Parkinsonschen Erkrankung präferentiell betroffenen dopaminergen Neuronen haben. Eine elegante Möglichkeit die Vorteile beider Ansätze zu verbinden, ist die Verwendung von primären dopaminergen Neuronen. Hierzu können primäre dopaminerge Neurone aus der embryonalen Mittelhirnanlage von Ratten oder Mäusen entnommen und in Form von Gewebestücken als organotypische Kulturen (Bauer et al. 2002) oder nach Zellvereinzelnung als „monolayer“ Kulturen (Bauer et al. 2008) verwendet werden. Einschränkungen hinsichtlich der Verwendung embryonaler Neurone gegenüber etablierten Zelllinien bestehen hinsichtlich i) der limitierten Anzahl von dopaminergen Neuronen je Embryo, ii) der Heterogenität der Kulturen, iii) der zeitlich begrenzten Kultivierbarkeit und iv) der eingeschränkten Transfizierbarkeit mit kommerziell erhältlichen nicht-viralen Transfektionsreagenzien. Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit existierten zwar bereits Protokolle für dopaminerge Vorläuferzellen der Ratte (z.B. Studer et al. 1998), Kulturprotokolle zur wesentlich schwierigeren Propagierung und Differenzierung von dopaminergen Vorläuferzellen der Maus standen jedoch nur eingeschränkt zur Verfügung.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit sollte deshalb ein standardisiertes Protokoll zur Kultivierung dopaminergere Vorläuferzellen der Maus etabliert werden. Mittels der Verwendung unterschiedlicher Expansionsschemata wurde versucht die Anzahl dopaminergere Neurone in differenzierten primären Kulturen zu erhöhen, die zelluläre Zusammensetzung wurde dokumentiert und es wurden unterschiedliche, nicht kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien hinsichtlich deren Transfektionseffizienz untersucht. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit Komponenten des GDNF-Signalweges unter optimierten Kulturbedingungen in expandierten primären Kulturen exprimiert sind und welche Effekte GDNF auf das Überleben expandierter dopaminergere Neurone hat.

4.1 Expansion der dopaminergen Vorläuferzellen

Die *in vivo*-Differenzierung von Vorläuferzellen des ventralen Mittelhirns in dopaminerge Neurone findet bei der Maus zwischen dem 11. und 15. Embryonaltag (E11-E15) statt (Bayer et al. 1995). Unter der Annahme, dass am E12 noch eine für die Expansion ausreichende Anzahl dopaminergere Vorläuferzellen teilungsfähig ist (Studer et al. 1998) und zu diesem Zeitpunkt das ventrale Mesencephalon eine Größe hat, die technisch für eine standardisierte Präparation gut geeignet ist, wurde für die Versuche ausschließlich Mittelhirngewebe von 12 Tage alten Embryonen verwendet. In initialen, hier nicht gezeigten Versuchen waren dissoziierte Zellen direkt auf unterschiedlich beschichtete (Poly-L-Ornithin und Fibronectin, Laminin oder Poly-D-Lysin) Glasplättchen ausplattiert und mittels unterschiedlicher Kulturprotokolle expandiert und differenziert worden. Auf Poly-D-Lysin beschichteten Plättchen wurden vereinzelt TH-positive Neurone nachgewiesen, die absolute Anzahl war jedoch so gering und die daraus resultierende Schwankungsbreite so hoch, dass dieser Ansatz im Rahmen der Arbeit nicht weiter verfolgt wurde.

Entscheidend für die Integrität und das Überleben dopaminergere Vorläuferzellen *in vivo* und *in vitro* ist ein fein reguliertes Zusammenspiel von intrinsischen und extrinsischen Faktoren. Zu den intrinsischen Faktoren zählen unter anderem Transkriptionsfaktoren wie Lmx1a/b, En1/2, Ptx3 und Nurr1. Extrinsische Faktoren sind Proteine, die von umgebenden Zellen exprimiert und z.T. sezerniert werden und an Rezeptoren, die von dopaminergere Vorläuferzellen exprimiert werden, binden (Prakash et al. 2006). Entscheidend für die Wirksamkeit extrinsischer Faktoren ist deren Konzentration und im Falle von zellgebundenen Proteinen, der räumliche Kontakt mit den dopaminergere Vorläuferzellen (Bauer et al. 2008). Zur besseren Gewährleistung von Zell-zu-Zell-Kontakt wurde das Kultivierungsschema deshalb modifiziert und die Vorläuferzellen wurden nach der Vereinzelung als Sphären expandiert (**Abb. 4A**).

Für die Expansion der Vorläuferzellen des ventralen Mittelhirns wurden bFGF oder bFGF in Kombination mit EGF verwendet. Die *in vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass durch bFGF das Überleben und die Proliferation von Vorläuferzellen unterstützt werden und möglicherweise die Expression von EGF-Rezeptoren induziert wird (Studer et al. 1998; Santa-Ollala, Bouvier et al. 1995 und Covarrubias 1999). Eine erst kürzlich erschienene Publikation legt zudem nahe, dass bFGF auch *in vivo* ein entscheidender extrinsischer Faktor für die Entwicklung dopaminergere Vorläuferzellen ist (Klejbor et al. 2009). Dementsprechend wurden in eigenen Versuchen unter bFGF- und bFGF/EGF-Behandlung im Vergleich zu den

nicht behandelten Kontrollen signifikant größere Sphären nachgewiesen, wobei keine Unterschiede zwischen beiden Behandlungsgruppen bestanden (**Abb. 3**). Die Verlängerung der Expansionszeit von 3 auf 6 Tage resultierte in einer weiteren Zunahme der Größe der Sphären, die Verwendung unterschiedlicher Medienzusätze (N2- oder B27-Supplement) hatte keinen differenten Effekt (**Abb. 3**).

4.2 Differenzierte VM-Kulturen

Zur Charakterisierung der Kulturen wurde die Expression von Proteinen die in i) neuroepitheliale Vorläuferzellen (Nestin), ii) maturen Gliazellen (GFAP) und iii) maturen Neuronen (β -Tubulin III) exprimiert sind, immunhistochemisch nachgewiesen.

Das Intermediärfilament Nestin ist ein zellulärer Marker für immature Vorläuferzellen, der während der Entwicklung des Zentralnervensystems ubiquitär exprimiert ist (Lendahl et al. 1990). Die Expression von Nestin im Mittelhirn ist transient und wird im Rahmen des Prozesses der Differenzierung durch die Expression von Neuronen-spezifischen (Neurofilament) oder Glia-spezifischen (GFAP) Intermediärfilamenten abgelöst (Wiese et al. 2004). Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei nestin-positiven Zellen im nicht-pathologisch veränderten Zentralnervensystem um mitotisch aktive Zellen handelt (Michalczyk und Ziman 2005). In wachstumsfaktorbehandelten Kulturen, nicht jedoch in Kontrollkulturen wurden nach der Differenzierung nestin-positive Zellen nachgewiesen (**Abb. 5C**), wobei davon auszugehen ist, dass während der Kultivierung als Sphären auch in den Kontrollkulturen Nestin exprimiert wurde, eine immunhistochemische Untersuchung aus technischen Gründen jedoch nicht durchgeführt wurde. Bemerkenswert ist jedoch, dass auch nach Entzug von bFGF und Kultivierung unter differenzierungsunterstützenden Bedingungen ein Teil der Zellen als immature, nestin-positive Vorläuferzelle persistierten. Dieser Befund deckt sich mit anderen Beobachtungen, bei denen sich durch kurzzeitige bFGF-Gabe Expressionsmuster anhaltend veränderten (Santa-Ollala und Covarrubias 1999).

Darüber hinaus konnte in den Kontrollkulturen auch keine Expression von GFAP nachgewiesen werden. Zwei Faktoren, die hier eine Rolle spielen, sind die relativ geringe Dichte der differenzierten Zellen (**Abb. 5D**) und die Verwendung von serumfreiem Medium (Walicke und Baird 1988). Da die gleichen Bedingungen jedoch auch für die wachstumsfaktorbehandelten Kulturen galten, muss von einem bFGF-spezifischem Effekt auf die Gliogenese ausgegangen werden, wobei in der Literatur sowohl eine Propagierung von astrozytären Vorläuferzellen (Lin und Goldman 2009) als auch die Induktion von

gliazellspezifischen Proteinen in suszeptiblen Zellen (Goddard et al. 2002) beschrieben wurde.

Ein primäres Ziel dieser Arbeit war es, ein standardisiertes Protokoll zur Generierung einer ausreichenden Anzahl von dopaminergen Neuronen aus Mittelhirngewebe der Maus zu etablieren. Studer und Mitarbeiter berichteten über eine 8-fache Erhöhung der absoluten Anzahl dopaminergere Neurone nach bFGF-vermittelter Expansion von dopaminergen Vorläuferzellen der Ratte (Studer et al. 1998), wobei die Expansionsphase 7 Tage betrug. In eigenen Versuchen mit bFGF- und bFGF/EGF-expandierten Vorläuferzellen der Maus wurden im Mittel 500 dopaminerge Neurone je ventralem Mittelhirn generiert (**Abb. 6A**). Geht man von absolut 10.000 dopaminergen Neuronen je Mittelhirn bei neonatalen Mäusen aus (Bayer et al. 1995), reduziert sich die Anzahl der *in vitro* kultivierbaren Neuronen auf 5%. Eine Verlängerung der Expansionszeit von 3 auf 6 Tage führte zu einer weiteren Halbierung der Ausbeute (**Abb. 6B**). Diese deutliche Diskrepanz zwischen Ratte und Maus bei Verwendung ähnlicher Kulturprotokolle ist hinweisend auf einen fundamentalen Unterschied der Kultivierbarkeit dopaminergere Vorläuferzellen beider Spezies. Hinweise für ein unterschiedliches Expansionsverhalten von neuronalen Vorläuferzellen von Ratte und Maus wurden bereits in der Literatur beschrieben (Kelly et al. 2005). Systematische Arbeiten zur Untersuchung der molekularen Ursache dieses Unterschiedes wurden in der *Pubmed*-Datenbank jedoch nicht gefunden. Unabhängig von dem zuvor erwähnten Speziesunterschied fiel auf, dass in den Kontrollkulturen nur vereinzelt TH-positive Neurone nachgewiesen werden konnten. Dieses könnte auf zu geringe Konzentrationen von endogen produziertem bFGF zurückgeführt werden (Klejbor et al. 2009). Eine andere Möglichkeit hierfür wäre ein fehlender oder zumindest deutlich verminderter gliavermittelter Effekt, zumal seit langem bekannt ist, dass Gliazellen neurotrophe Aktivität besitzen und das Überleben und die Differenzierung der dopaminergere Neurone verbessern (Bayer et al. 1991; Gaul und Lubbert 1992; O'Malley et al. 1994).

4.3 Effekte von GDNF auf differenzierte dopaminerge Vorläuferzellen

GDNF wurde aus Zellkultur-Überständen der B49 Gliom-Zelllinie isoliert und als neurotropher Faktor beschrieben, der das Überleben und die Differenzierung von kultivierten embryonalen dopaminergen Neuronen verbessert (Lin et al. 1993). Bis jetzt wurden insgesamt 4 verschiedene GFR α -Rezeptoren (GFR α 1-4) identifiziert, wobei GDNF eine Präferenz für die Bindung an GFR α 1 hat und mit geringerer Affinität an GFR α 2-4 bindet (Airaksinen et al. 2002). Nach Bindung von GDNF an GFR α 1 interagiert dieser Rezeptorkomplex mit der Transmembran-Rezeptortyrosinkinase RET („*rearranged during transformation*“), was zu der Bildung eines aktiven GFR α 1-RET-Heterotetramer-Komplexes führt und eine Aktivierung von RET über die Autophosphorylierung intrazellulärer Tyrosingruppen zur Folge hat (Bespalov und Saarma 2007). In einer Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass GDNF das Überleben dopaminergener Neurone und das Aussprossen von Neuriten verbessert (Meyer et al. 2001; Bauer et al. 2002; Kirik et al. 2004).

Ziel eigener Experimente war es, das neu etablierte Kultursystem anhand der Untersuchung bereits bekannter Effekte des neurotrophen Faktors GDNF zu evaluieren. In einem ersten Schritt wurde hierzu die Expression des GDNF-Signalweges auf mRNA-Niveau untersucht. Die Expression von GFR α 1 und RET konnte an unterschiedlichen Zeitpunkten der Expansionsphase der dopaminergen Vorläuferzellen nachgewiesen werden (**Abb. 7**). Die Anzahl der TH-positiven Neurone in den mit GDNF-behandelten Kulturen war nach einer Kulturzeit von 12 Tagen um das 1,8-fache erhöht (**Abb. 8**). Vergleichbare Effekte auf das Überleben dopaminergener Neurone wurden bei der Kultivierung von primären dopaminergen Neuronen der Ratte beobachtet (Meyer et al. 2001; Bauer et al. 2002).

4.4 Transfektion der Primärzellkultur mit Effectene

Der lipidvermittelte Transfer von plasmidaler DNA („Transfektion“) ist eine technisch einfache und kostengünstige Methode zur Einbringung fremden genetischen Materials in eine Zelle. Die Transfektion von etablierten Zelllinien gehört zwar zu den Standardmethoden jedes molekularbiologischen Labors, der lipidvermittelte Gentransfer in primäre Zellen neuronalen Ursprungs ist jedoch aus folgenden Gründen weniger verbreitet: i) In aller Regel sind nur mitotisch aktive Zellen der Transfektion zugänglich, ii) auch unter optimierten Bedingungen ist die Transfektionseffizienz relativ gering und iii) bereits bei geringen DNA-Lipid-Konzentrationen zeigen sich zytotoxische Effekte.

Da Moleküle über 70 kDa nur über transportspezifische Kernporen in den Zellkern gelangen (Dowty et al. 1995), ist eine freie Diffusion der DNA oder DNA-Lipid-Komplexe in den Kern meist nicht möglich. Bei sich teilenden Zellen kommt es im Rahmen der mitotischen Vorgänge zu einer Auflösung der Kernmembran. Nach erfolgter Teilung wird die Kernmembran um die dabei entstandenen Zellkerne und im Falle von transfizierten Zellen um die im Zytoplasma befindlichen Plasmide neu ausgebildet (Felgner und Ringold 1989). Je häufiger sich eine Zelle teilt, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit, dass die zuvor in das Zytoplasma eingebrachte DNA in den Zellkern gelangt. Dieser Annahme entsprechend konnten in nicht-bFGF-expandierten Kulturen keine transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Erst bei Transfektionen von Vorläuferzellen, die mit bFGF expandiert wurden, exprimierten ein geringer Teil (<0.1%) der anschließend differenzierten Zellen das eingebrachte Transgen GFP (**s.a. Abb. 10**). Unabhängig von der Verwendung unterschiedlicher Lipidkomponenten nahm die Transfektionseffizienz mit steigender DNA-Lipid-Konzentration ab (**s.a. Abb. 9**) und bei Verwendung von über einem 1 µg DNA je Ansatz zeigten sich deutliche zytotoxische Effekte. Als mögliche Ursache für die zytotoxischen Effekte bei lipidvermitteltem Gentransfer wurde die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies beschrieben (Aramaki et al. 1999, 2000). Diese Radikale werden vor allem durch das Enzym Lipoxygenase gebildet und induzieren durch die Zunahme von oxydativem Stress die Apoptose der Zellen (Takano et al. 2001). Die immunhistochemische Charakterisierung der transfizierten, GFP-positiven Zellen zeigte keine Co-Lokalisation mit Nestin, GFAP, β -Tubulin III oder TH. Hinsichtlich deren Morphologie (**s.a. Abb. 10**) und in Anbetracht anderer Transfektionsversuche von primärem Mittelhirngewebe (Bauer et al. 2001) kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um ehemals nestin-positive Vorläuferzellen gehandelt hat.

5. Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurden die Proliferationsfähigkeit, die Differenzierung und das Überleben von dissoziierten, neuronalen Vorläuferzellen des ventralen Mesencephalons (VM) der Maus untersucht und ein reproduzierbares Kultursystem etabliert. Es besteht damit die Möglichkeit, Untersuchungen mit primären dopaminergen Neuronen mit einem veränderten genetischen Hintergrund unter Verwendung von Mittelhirngewebe von transgenen oder Knockout-Mäusen durchzuführen, um z.B. vor aufwendigen *in vivo*-Versuchen Kandidatenmoleküle aus der pharmakologischen Forschung vorab *in vitro* zu testen.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, das neu etablierte Kultursystem anhand der Untersuchung bereits bekannter Effekte des neurotrophen Faktors GDNF zu evaluieren. In einem ersten Schritt wurde hierzu die Expression des GDNF-Signalweges auf mRNA-Niveau untersucht. Die Expression von GFR α 1 und RET konnte mittels PCR an unterschiedlichen Zeitpunkten der Expansionsphase der dopaminergen Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Desweiteren konnte es gezeigt werden, dass die Anzahl der TH-positiven Neurone in den mit GDNF-behandelten Kulturen nach einer Kulturzeit von 12 Tagen um das 1,8-fache höher als in den Kulturen ohne GDNF-Behandlung lag.

Unter den optimierten Bedingungen wurden die mit bFGF expandierten Kulturen aus primärem ventralen Mesencephalon Effectene-vermittelt transfiziert. Obwohl es gelungen ist, reproduzierbar Zellen von expandierten Mittelhirnkulturen mittels lipidvermitteltem Gentransfer zu transfizieren, sind diesem Ansatz enge Grenzen gesetzt. Es konnte nur ein kleiner Teil undifferenzierter Zellen genetisch modifiziert werden (<0,1%). Außerdem konnte im Rahmen der gezeigten Untersuchungen die Art der transfizierten Zellen nicht identifiziert werden, was die Nützlichkeit dieser Methode zusätzlich einschränkt. Der verwendete lipidvermittelte Gentransfer ist eine sichere und nach entsprechender Optimierung effiziente Methode zur genetischen Modifikation primärer VM-Kulturen der Maus.

6. Literaturverzeichnis

Abney ER, Bartlett PP, Raff MC. Astrocytes, ependymal cells, and oligodendrocytes develop on schedule in dissociated cell cultures of embryonic rat brain. *Dev Biol* 1981;83:301-10.

Airaksinen MS, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling four masters, one servant? *Mol Cell Neurosci* 1999;13:313-25.

Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev* 2002;3:383-94.

Andrew J. Linsenhardt, Gerald H. Wilken, Thomas C. Westfall, Heather Macarthur. Cytotoxicity of dopaminochrome in the mesencephalic cell line, MN9D, is dependent upon oxidative stress. *Neurotoxicology* 2009;30:1030-35.

Aramaki Y, Takano S, Tsuchiya S. Induction of apoptosis in macrophages by cationic liposomes. *FEBS Letters* 1999;460:472-6.

Aramaki Y, Takano S, Arima H, Tsuchiya S. Induction of apoptosis in WEHI 231 cells by cationic liposomes. *Pharm Res* 2000;17:515-20.

Barker RA, Dunnett SB, Faissner A, Fawcett JW. The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. *Exp Neurol* 1996;141:79-93.

Bauer M, Suppmann S, Meyer M, Hesslinger C, Gasser T, Widmer HR, Ueffing M. Glial cell line-derived neurotrophic factor up-regulates GTP-cyclohydrolase I activity and tetrahydrobiopterin levels in primary dopaminergic neurones. *J Neurochem* 2002;82:1300-10.

Bauer M, Szulc J, Meyer M, Jensen CH, Terki TA, Meixner A, Kinkl N, Gasser T, Aebischer P, Ueffing M. Delta-like 1 participates in the specification of ventral midbrain progenitor derived dopaminergic neurons. *J Neurochem* 2008;104:1101-15.

Bauer M, Kinkl N, Meixner A, Kremmer E, Riemenschneider M, Förstl H, Gasser T, Ueffing M. Prevention of interferon-stimulated gene expression using microRNA-designed hairpins. *Gene Ther* 2009;16:142-7.

Bauer M, Ueffing M, Gasser T. Somatic gene therapy in animal models of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 1999;55:131-47.

Bauer M, Meyer M, Grimm L, Meitinger T, Zimmer J, Gasser T, Ueffing M, Widmer HR. Non-viral GDNF gene transfer enhances survival of cultured dopaminergic neurons and improves their functions and survival after transplantation in a rat model of Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 2000;11:1529-41.

Bauer M, Meyer M, Sauter J, Gasser T, Ueffing M, Widmer HR. Liposome-mediated gene transfer to fetal human ventral mesencephalic explant cultures. *Neuroscience letters* 2001;308:169-72.

Bayer SA, Wills KV, Triarhou LC, Ghetti B. Time of neuron origin and gradients of neurogenesis in midbrain dopaminergic neurons in the mouse. *Exp Brain Res* 1995;105:191-9.

Bayer Shirley A., Katherine V. Wills, Lazaros C. Triarhout, Tatyana Verinat, James D. Thomas and Bernardino G. Selective vulnerability of late-generated dopaminergic neurons of the substantia nigra in weaver mutant mice. *Neurobiology* 1995;92:9137-40.

Berg D. Biomarkers for the early detection of Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis* 2008;5:133-6.

Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 1973;20:415-55.

Bespalov MM, Saarma M. GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:68-74.

Beyer C, Pilgrim C, Reisert J, Misgeld U. Cell from embryonic rat striatum cocultured with mesencephalic glia express dopaminergic phenotypes. *Neurosci* 1991;128:1-3.

Björklund A, Stenevi U, Reconstruction of the nigrostriatal pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res* 1997;177:555-60.

Bossers K, Meerhoff G, Balesar R, van Dongen JW, Kruse CG, Swaab DF, Verhaagen J. *Brain Pathol* 2009;19:91-107.

Bouvier MM, Mytilineou C. Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J Neurosci* 1995;15:7141-49.

Brent A. Reynolds, Wolfram Tetzlaff and Samuel Weiss . A Multipotent EGF-Responsive Striatal Embryonic Progenitor Cell Produces Neurons and Astrocytes. *The Journal of Neuroscience* 1992;12:4565-74.

Brundin P, Karlsson J, Emgard M, Kaminski Schierle GS, Hansson O, Petersén A, Castilho RF. Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transpl* 2000;9:179-93.

Clarkson ED, Zawada WM, Freed CR. GDNF reduces apoptosis in dopaminergic neurons in vitro. *Neuroreport* 1995;7:145-9.

Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Isacson O. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med* 1997;3:350-3.

Dowty ME, Williams P, Zhang G, Hagstrom J, Wolff JA. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proc Natl Acad Sci* 1995;92:4572-6.

Dunnett SB, Björklund A. Staging and dissection of rat embryos. In: Dunnett SB, Björklund A. eds. *Neural Transplantation: A practical Approach*. Oxford IRL, 1992: 1-19.

Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 1996;48:1-19.

Fahn S, How do you treat motor complications in Parkinson's disease: Medicine, surgery, or both? *Ann Neurol* 2008;64:56-64.

Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 1991;114:2283-301.

Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 1989;337:387-8.

Felgner PL, Rhodes G. Gene therapeutics. *Nature* 1991;349:351-2.

Ferrari G, Minizzi MC, Toffano G, Leon A, Skaper SD. Basic fibroblast growth factor promotes the survival and development of mesencephalic neurons in culture. *Dev Biol* 1989;133:140-147.

Fiandaca M, Forsayeth J, Bankiewicz K. Current status of gene therapy trials for Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2008;209:51-7.

Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J of Neuropath and Exp Neurol* 1996;55:259-72.

Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai W-Y, DuMouchel W, Kao R, Dillon S, Winfield H, Culver S, Trojanowski JQ, Eidelberg D, Fahn S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001;344:710-19.

Gai WP, Blessing WW, Blumbergs PC. Ubiquitin-positive degenerating neurites in the brainstem in Parkinson's disease. *Brain* 1995;118:1447-59.

Gasser T, Müller-Myhsok B, Wszolek Z, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V, Bereznoi B, Fabrizio E, Vieregge P, Horstmann R. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nature Genet* 1998;18:262-65.

Gasser T, Wszolek ZK, Trofatter J, Ozelius L, Uitti RJ, Lee CS, Gusella J, Pfeiffer RF, Calne DB, Breakefield XO. Genetic linkage studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation of seven candidate genes. *Ann Neurol* 1994;36:387-96.

Gaul G, Lubbert H, Cortical astrocytes activated by bFGF secrete molecules that stimulate differentiation of mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc R Soc Lon Biol* 1992;249:57-63.

Goddard DR, Berry M, Kirvell SL, Butt AM, Fibroblast growth factor-2 induces astroglial and microglial reactivity in vivo. *J Anat* 2002;200:57-67.

Hardy J, Cookson MR, Singleton A. Genes and parkinsonism. *Lancet Neurol* 2003;2:221-28.

Hardy J, Cai H, Cookson MR, Gwinn-Hardy K, Singleton A. Genetics of Parkinson's disease and parkinsonism. *Ann Neurol* 2006;60:389-98.

Jenner P, Marsden CD. MPTP-induced parkinsonism: a model of Parkinson's disease and its relevance to the disease process. Butterworth Scientific 1981:55-75.

Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 1996;47:161-70.

Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13:24-34.

Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, Bland RJ, Young D, Strybing K, Eidelberg D, Doring MJ. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet* 2007;369:2097-105.

Katagiri N, Chida S, Abe K, Nojima H, Kitabatake M, Hoshi K, Horiguchi Y, Taguchi K. Preventative effects of 1,3-dimethyl- and 1,3-dimethyl-N-propargyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline on MPTP-induced Parkinson's disease-like symptoms in mice. *Brain Res* 2010;133-42.

Kelly CM, Tyers P, Borg MT, Svendsen CN, Dunnett SB, Rosser AE. EGF and FGF-2 responsiveness of rat and mouse neural precursors derived from the embryonic CNS. *Brain Res Bull* 2005;68:83-94.

Kirik D, Georgievska B, Björklund A. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. *Nat Neurosci* 2004;7:105-10.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392:605-8.

Klejbor I, Kucinski A, Wersinger SR, Corso T, Spodnik JH, Dziewiatkowski J, Morys J, Hesse RA, Rice KC, Miletich R, Stachowiak EK, Stachowiak MK. Serotonergic hyperinnervation and effective serotonin blockade in an FGF receptor developmental model of psychosis. *Schizophr Res* 2009;113:308-21.

Lang AE, Lozano A. Parkinson's disease; First of two parts. *N Engl J Med* 1998;339:1044-53.

Lang AE, Lozano A. Parkinson's disease; Second of two parts. *N Engl J Med* 1998;339: 1130-43.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science* 1983;219: 979-80.

Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG. CNS Stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60:585-95.

Lin G, Goldman JE, An FGF-responsive astrocyte precursor isolated from the neonatal forebrain. *Glia* 2009;57:592-603.

- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993;260:1130-2.
- Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD. Grafts of fetal dopamine neuron survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 1990;247:574-577.
- Madrazo I, Leon V, Torres C, Aguilera MC, Varela G, Alvarez F, Fraga A, Drucker-Colin R, Ostrosky F and Skurovich M. Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1988;318:51.
- Manyam BV. Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise. *Mov Disord* 1990;5:47-8.
- Marsden CD. Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1994;57:672-81.
- Masuhr KF, Neumann M. *Neurologie, 4 Auflage. Duale Reihe* 1998.
- Mayer E, Dunnett SB, Fawcett JW. Mitogenic effect of bFGF on embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neuron precursors. *Dev Brain Res* 1993;72:253-58.
- Meyer M, Matarredona ER, Seiler RW, Zimmer J, Widmer HR. Additive effect of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 on rat fetal nigral explant cultures. *Neuroscience* 2001;108:273-84.
- Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 2005;20: 665–71.
- Mínguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F, Hotton GR, Toledo-Aral JJ, Ortega-Moreno A, Méndez-Ferrer S, Martín-Linares JM, Katati MJ, Mir P, Villadiego J, Meersmans M, Pérez-García M, Brooks DJ, Arjona V, López-Barneo J. Carotid body autotransplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007;78:825-31.
- Murphy M, Drago J, Bartlett PF. BFGF stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *Neurosci Res* 1990;25:463-75.
- Olanow CW, Freeman T, Kordower J. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001;345:146-7.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54:403-14.
- O'Malley EK, Sieber BA, Morrison RS, Black IB, Dreyfus CF. Nigral Type I astrocytes release a soluble factor that increases dopaminergic neuron survival through mechanisms distinct from bFGF. *Brain Res* 1994;647:83-90.

Parkinson James. An Essay on the Shaking Palsy. London 1817. Reprint in: Critchley 1955, 145-218; deutsche Übersetzung Eine Abhandlung über die Schüttellähmung von Ute Schlie, als Anhang zu Pies 1988.

Perlow MJ, Freed WJ, Hoffer BJ., Seiger A, Olson L, Wyatt RJ. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 1979;204: 643-7.

Polymeropoulos M, Higgins J, Golbe L. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-23. *Science* 1996;274:1197-9.

Prakash N, Wurst W. Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons. *J Physiol* 2006;575:403-10.

Preeti J Khandelwal, Sonya B Dumanis, Li Rebekah Feng, Kathleen Maguire-Zeiss, GW Rebeck, Hilal A Lashuel and Charbel EH Moussa. Parkinson-related parkin reduces α -Synuclein phosphorylation in a gene transfer model. *Mol Neurodegener* 2010;5:47.

de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, Breteler MMB, Dartigues J-F, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. *Neurology* 2000;54:21-27.

Rodríguez-Gómez JA, Lu JQ, Velasco I, Rivera S, Zoghbi SS, Liow JS, Musachio JL, Chin FT, Toyama H, Seidel J, Green MV, Thanos PK, Ichise M, Pike VW, Innis RB, McKay RD. Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells* 2007;25:918-28.

Santa-Olalla J, Covarrubias L. Basic fibroblast growth factor promotes epidermal growth factor responsiveness and survival of mesencephalic neural precursor cells. *J Neurobiol* 1999 ;40:14-27.

Schapira AHV, Battistin L, Scarlato G, Caraceni T, Ruggieri S. Neurotoxicity and the mechanisms of cell death in Parkinson's disease. *Advances in Neurology* 1996:161-5.

Schapira AH, Progress in neuroprotection in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2008;15:5-13.

Schumacher JM, Ellias SA, Palmer EP, Kott HS, Dinsmore J, Dempsey PK, Fischman AJ, Thomas C, Feldman RG, Kassissieh S, Raineri R, Manhart C, Penney D, Fink JS, Isacson O. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology* 2000;54:1042-50.

Spenger C, Studer L, Evtouchenko L, Egli M, Burgunder JM, Markwalder R, Seiler RW. Long-term survival of dopaminergic neurons in free-floating roller tube cultures of human fetal ventral mesencephalon. *J Neurosci Meth* 1994;54:63-73.

Spillantini MG. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-90.

Stover NP, Bakay RA, Subramanian T, Raiser CD, Cornfeldt ML, Schweikert AW, Allen RC, Watts RL. Intrastriatal implantation of human retinal pigment epithelial cells attached to microcarriers in advanced Parkinson disease. *Arch Neurol* 2005;62:1833-7.

Studer L, Tabar V, McKay RDG. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nature Neurosci* 1998;1:290-5.

Takano S, Aramaki Y, Seishi T. Lipoxygenase may be involved in cationic liposome-induced macrophage apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications* 2001;288:116-20.

Trojanowski JQ, Goedert M, Iwatsubo T, Lee VM., Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia. *Cell Death Differ* 1998;5:832-7.

Walicke PA, Baird A. Neurotrophic effects of basic and acidic fibroblast growth factors are not mediated through glial cells. *Dev Brain Res* 1988;40:70-79.

Walker RH, Davies G, Koch RJ, Haack AK, Moore C, Meshul CK., Effects of zona incerta lesions on striatal neurochemistry and behavioral asymmetry in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *J Neurosci Res* 2010;88:2964-75.

Widnell K. Pathophysiology of motor fluctuations in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005;20:17-22.

Wiese C, Rolletschek A, Kania G. Nestin expression: a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2510-22.

Williams-Gray CH, Foltynie T, Brayne CE, Robbins TW, Barker RA. Evolution of cognitive dysfunction in an incident Parkinson's disease cohort. *Brain* 2007;130:1787-98.

Xian Lin, Loukia Parisiadou, Xing-Long Gu, Lizhen Wang, Hoon Shim, Lixin Sun, Chengsong Xie, Cai-Xia Long, Wan-Jou Yang, Jinhui Ding, Zsu Zsu Chen, Paul E. Gallant, Jung-Hwa Tao-Cheng, Gay Rudow, Juan C. Troncoso, Zhihua Liu, Zheng Li, and Huaibin Cai. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's disease-related mutant α -synuclein. *Neuron* 2009;64:807-27.

Zimprich A, Müller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, Lockhar P, Strongosky A, Kachergus J, Calne DB, Stoessl J, Uitti RJ, Pfeiffer RF, Trenkwalder C, Homann N, Ott E, Wenzel K, Asmus F, Hardy J, Wszolek Z, Gasser T. The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am J Hum Genet* 2004;74:11-19.

7. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Meitinger möchte ich mich zunächst herzlich dafür bedanken, dass ich meine Experimente in seinem Institut durchführen konnte. Er unterstützte mich besonders durch seine präzisen und erklärenden Korrekturen beim Vervollständigen der Arbeit.

Herrn Prof. M. Ueffing gilt besonderer Dank für die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu können, für seine stetige Bereitschaft meine Fragen und Ergebnisse zu diskutieren und zu strukturieren sowie für Optimismus für das Gelingen meiner Arbeit.

Ich möchte mich bei Herrn PD Dr. med. Matthias Bauer bedanken, der als Betreuer meine Arbeit in jeder Hinsicht unterstützt hat. Sowohl beim Erlernen der zahlreichen Methoden in der Zellbiologie, als auch beim Verfassen der Dissertation war er stets ansprechbar, offen für meine Fragen.

Danken möchte ich auch Frau Dr. C. Jakupoglu und Frau Dr. S. Suppmann, die stets mit fachlichen Informationen, praktischen Hinweisen und aufmunternden Worten hilfreich zur Seite standen.

Außerdem bedanke ich mich bei den vielen hilfsbereiten Mitarbeitern am Institut, insbesondere den Tierpflegern, Herrn R. Chapman, Herrn J.-M. Béchet, Herrn M. Hölzl, Frau U. Schultheiß, Frau A. Janz.

8. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, die dem Fachbereich Humanmedizin der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Optimierung eines *in vitro*-Kultursystems für die neuronale Vorläuferzellen aus dem embryonalen Mittelhirngewebe der Maus“

am Institut für Humangenetik Helmholtzzentrum München und TU München unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Meitinger sowie unter Betreuung von PD. Dr. M. Bauer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei dem Verfassen der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt zu haben.

Bisher habe ich an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Braunschweig, 22. Januar. 2012

Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname: Pahari
Vorname: Dipak Raj
Geburtsdatum: 26.09.1976
Geburtsort: Kaski, Nepal
Familienstand: Verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit: Nepalesisch

Schulbildung

1982 - 1993 Primary and high school (Pokhara, Nepal)
1993 - 1995 College (Tribhuvan Universität, Kathmandu, Nepal)
1996 - 1997 Besuch des Deutschkurses an der LMU München
1997 - 1998 Besuch des Studienkollegs an der LMU München

Hochschulausbildung

1998 – 2000 Medizinisches Grundstudium an der LMU München
2000 - 2003 - Klinischer Studienabschnitt an der LMU München
- Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Doktorarbeit am Institut für Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München
- Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003 - 2004 Praktisches Jahr
Pädiatrie: Haunersches Kinderspital München
Chirurgie: Krankenhaus München-Harlaching
Kinderchirurgie: Inselspital, Bern, Schweiz
Innere Medizin: Krankenhaus München-Neuperlach und Tribhuvan Universität Kathmandu, Nepal
2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit Mai 2005 Assistenzarzt in der Herzchirurgie bei PD. Dr. W. Harringer im Städtischen Klinikum Braunschweig