

Aus dem Institut I für Anatomie, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Addicks

Eingereicht über das Institut für Anatomie und Zellbiologie des Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

**Charakterisierung humaner hippocampaler  
Astrozytenvorläuferzellen in Langzeitkultur zur  
Anwendung in der ex vivo Gentherapie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Michael Küper aus Meppen

Marburg, 2008

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>16</b>
2.1 Kultivierung humaner Astrozytenvorläuferzellen	16
2.2 Bestimmung der Ausplattierungseffizienz	17
2.3 Bestimmung der Proliferation	17
2.4 Immunzytochemie	18
2.5 Bestimmung der Sekretion von neurotrophen Faktoren	20
2.6 Chromosomenfärbung	22
2.7 Transduktion mit rekombinantem Adenovirus	22
2.8 Stereotaktische intrazerebrale Transplantation	23
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>25</b>
3.1 Zellkultivierung	25
3.2 Ausplattierungseffizienz	27
3.3 Immunfluoreszenzanalyse	27
3.4 Proliferation	40
3.5 Sekretion neurotropher Faktoren	42
3.6 Chromosomenfärbung	42
3.7 Transduktion	43
3.8 Transplantation	43
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>46</b>
4.1 Zielsetzung	46
4.2 Kritik der Methode	48
4.3 Diskussion der Ergebnisse	51
4.4 Ausblick	61
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>63</b>
<b>6 LITERATUR</b>	<b>64</b>
<b>7 ANHANG</b>	<b>85</b>

## ABKÜRZUNGEN:

6-OHDA	6-Hydroxydopamin
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
CNTF	ciliary neurotrophic factor
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme linked immuno assay
FCS	fetal calf serum
GFAP	glia fibrillary acidic protein
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
GFP	green fluorescent protein
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HLA	human leukocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase
HSV	Herpes simplex virus
ITR	inverted terminal repeat
KG	Körpergewicht
LIF	leukemia inhibitory factor
M.	Morbus
MAP2	microtuble-associated protein 2
MBP	myelin basic protein
MOI	multiplicity of infection
N.	Nervus
NADH	$\alpha$ -nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	$\alpha$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NeuN	neuronal nuclear antigen A 60
NGF	nerve growth factor
NT	neurotrophic factor
O-2A-Zelle	Oligodendrozyten-Typ-2-Astrozytenvorläuferzelle
p.	Passage
PBS	phosphate buffered saline
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline solution with tween
TMB	tetramethylbenzidine
Trk	tyrosine receptor kinase
WHO	world health organisation
ZNS	zentrales Nervensystem

# **1. Einleitung**

Die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen gehört zu den großen Herausforderungen der modernen Medizin. Diese charakterisieren sich durch einen progressiven Verlust von Neuronen, der bislang weitgehend unverstanden und nicht hinreichend therapierbar ist. Mit dem Morbus Parkinson und dem Morbus Alzheimer sollen nur die prominentesten Vertreter genannt werden, an denen allein in Deutschland über 500.000 Menschen erkrankt sind. Der Verlauf dieser Krankheiten ist langjährig und führt letztendlich zu schweren Behinderungen und zum Tod. Im Zuge intensiver Forschungen haben sich neue Behandlungsmöglichkeiten im Kampf gegen die neurodegenerativen Erkrankungen herausgebildet. Zu ihnen gehören die Gentherapie und die Zelltherapie. Ziel der Gentherapie ist hierbei die Korrektur möglicher genetischer Defekte, oder aber die Ausschüttung von pharmakologisch wirksamen Substanzen, wie neurotrophen Faktoren durch genetisch modifizierte Zellen. Die Zelltherapie versucht demgegenüber, den Verlust der Neurone durch Transplantation von Zellen direkt zu kompensieren.

Bei beiden Therapieprinzipien rückte eine Zellgruppe in den letzten Jahren besonders in den Mittelpunkt: Die Astrozyten und ihre Vorläufer (Ridet et al., 1999, 2003; Lin et al., 1997). Vor allem die Astrozytenvorläufer stellen in diesem Zusammenhang eine interessante Zellpopulation dar, weil sie sich durch eine hohe proliferative Kapazität und eine gute Anpassungsfähigkeit im ZNS auszeichnen. Allerdings müssen in diesem Zusammenhang mögliche Risiken, wie eine Tumorgenese oder unkontrollierte Proliferation *in vivo*, genau überprüft werden.

Im folgenden sollen daher die Gliogenese sowie Konzepte zur Nutzung von Astrozyten in Gen- und Zelltherapie genauer beleuchtet werden.

## **Gliogenese im ZNS:**

Neurale Stammzellen können sich zu den drei wichtigsten Zelllinientypen des ZNS, den Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten, differenzieren (Nakafuku et al., 1995; Vicario-Abejon et al., 2003). Während der Differenzierung durchlaufen sie verschiedene Stadien, bis sie schließlich zu reifen Gliazellen oder Neuronen werden. Die Gliogenese wurde in den letzten Jahren *in vivo* und *in vitro* sehr intensiv erforscht. Dabei konzentrierte man sich vor allem auf Experimente mit tierischen Zellen, wohingegen die humane Gliogenese noch weitgehend unerforscht geblieben ist (Cauley

et al., 1997). Trotz starker Parallelen unter Säugetierzelllinien gibt es auch signifikante Unterschiede zwischen kultivierten humanen und tierischen Zellen, wie zum Beispiel die weitgehende Immortalisierungsresistenz humaner Zellen *in vitro* im Gegensatz zu tierischen Zellen (Sager et al., 1983; Kuroki und Huh, 1993). Es gilt also die Eigenschaften humaner Astrozytenvorläufer genauer zu charakterisieren.

Wie Neurone werden Astrozyten während der gesamten Lebensspanne neu generiert (Altman, 1966; Sturrock, 1982). In der Embryonalentwicklung nehmen die Astrozyten, im Gegensatz zu den Oligodendrozyten, ihren Ursprung in den dorsalen Regionen des Neuralrohrs (Fok-Seang und Miller, 1994; Pringle et al., 1998). Durch klonale Analysen und Zellmarkierungen verschiedenster Art konnte belegt werden, dass sich reife Astrozyten und Oligodendrozyten von glialen Vorläuferzellen ableiten (Luskin et al., 1993; Levison und Goldman, 1997; Williams und Price, 1995). Sie unterscheiden sich durch ihre Antigenität, ihr Entwicklungspotential und ihre Responsivität auf Wachstumsfaktoren. Mindestens sechs verschiedene Typen von glialen Vorläuferzellen konnten in den letzten Jahren identifiziert werden (Trotter und Schachner, 1989; Grinspan et al., 1993; Rao und Mayer-Proschel, 1997; Seidmann et al., 1997; Zhang et al., 1998; Mi und Barres, 1999; zur Übersicht: Lee et al., 1999; Liu und Rao, 2004).

Die wohl bislang am besten charakterisierte gliale Vorläuferzelle ist die Oligodendrozyten-Typ-2-Astrozytenvorläuferzelle, kurz O-2A-Zelle. O-2A-Zellen wurden erstmals von Raff et al. (1983) beschrieben und konnten aus verschiedenen Regionen des postnatalen ZNS isoliert werden (zur Übersicht: Lee et al., 1999; Liu und Rao, 2004). *In vitro* kann eine Reifung der Zellen zu Oligodendrozyten und Typ 2 Astrozyten beobachtet werden. Typ 2 Astrozyten unterscheiden sich durch ihre stellare Morphologie und durch ihre Expression des Glykoprotein A2B5 von den Typ 1 Astrozyten (Mayer-Proschel et al., 1997).

Aus humanem Gewebe konnten Oligodendrozytenvorläufer gewonnen werden (Scolding et al., 1995, 1999), die wegen Ähnlichkeiten zu den O-2A-Zellen, die aus Nagetieren isoliert wurden, als humane O-2A-Zellen bezeichnet werden. Neben den O-2A-Zellen wurden glial restringierte Vorläuferzellen entdeckt, die sich von diesen durch Differenzierungskapazität und Responsivität auf Wachstumsfaktoren unterscheiden (Rao und Mayer-Proschel, 1997; Rao et al., 1998). Glial restringierte Vorläuferzellen können sich außer zu Oligodendrozyten auch zu Astrozyten des Typ 1 (GFAP+, A2B5-) und des Typ 2 (GFAP+, A2B5+) entwickeln (Rao et al., 1998). Sie sind somit tripotente

Vorläuferzellen und können bereits früh in der Embryonalentwicklung identifiziert werden.

Vorläuferzellen, die sich nur zu Astrozyten differenzieren können, wurden von Mi und Barres 1999 beschrieben. Diese Astrozytenvorläufer sind immunreaktiv für A2B5 und einige, aber nicht alle Astrozytenmarker wie GFAP. Eine Reifung zu GFAP positiven Astrozyten wird durch CNTF oder LIF induziert. Humane Astrozytenvorläufer konnten aus fetalem Gewebe (Cauley et al., 1997) isoliert werden. Sie exprimieren die Antigene Vimentin, Nestin und GFAP und zeigen eine verstärkte Proliferation unter Einfluss von bFGF.

Bei der Fülle an glialen Vorläuferzellen liegt die Vermutung nahe, dass zwischen den einzelnen Zelllinientypen direkte Verbindungen bestehen. Jedoch ist es aus verschiedenen Gründen problematisch diese zu belegen. Zum Einen differieren die Region und der Zeitpunkt sowie die Spezies, aus der die Vorläufer isoliert wurden. Zum Anderen wurden jeweils leicht unterschiedliche Kulturbedingungen angewandt, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse weiter herabsetzt. Auch gibt es keine Oberflächenmarker, die zur klaren Unterscheidung von glialen Vorläuferzellen geeignet sind (zur Übersicht: Lee et al., 1999).

Dennoch haben Cameron und Rakic (1991) in einem viel beachteten Übersichtsartikel mögliche Verbindungen der verschiedenen Zelllinien für den cerebralen Cortex aufgezeigt. Die Entwicklung aller neuralen Zellen nimmt demnach ihren Ursprung in multipotenten Stammzellen, die sich zu neuronalen Stammzellen weiterentwickeln, welche immunpositiv für die Intermediärfilamente Vimentin und Nestin sind. Die neuronalen Stammzellen können sich nun sowohl zu neuronalen Vorläuferzellen (Neuroblasten) entwickeln, die terminal zu Neuronen werden, als auch zu glialen Vorläuferzellen differenzieren. Gliale Vorläuferzellen werden durch die Expression von Nestin, Vimentin, A2B5 und Ran 2 charakterisiert. Im folgenden leiten sich drei Zelllinien von den glialen Vorläuferzellen ab:

#### 1) Oligodendrozyten-Typ-2-Astrozyten (O-2A) Vorläuferzellen:

Die O-2A Vorläufer weisen eine bipolare Morphologie auf und exprimieren die Markerproteine A2B5 und Vimentin, nicht aber GFAP, Ran2 oder Nestin. Die O-2A Vorläufer reifen in vitro letztendlich zu Oligodendrozyten oder Typ 2 Astrozyten aus. Während des Reifungsprozesses bilden Typ 2 Astrozyten eine stellare Morphologie aus, exprimieren GFAP und stellen die Expression des Vorläufermarkers Nestin ein. Allerdings bleiben Typ 2 Astrozyten positiv für A2B5, einem Gangliosidantigen auf

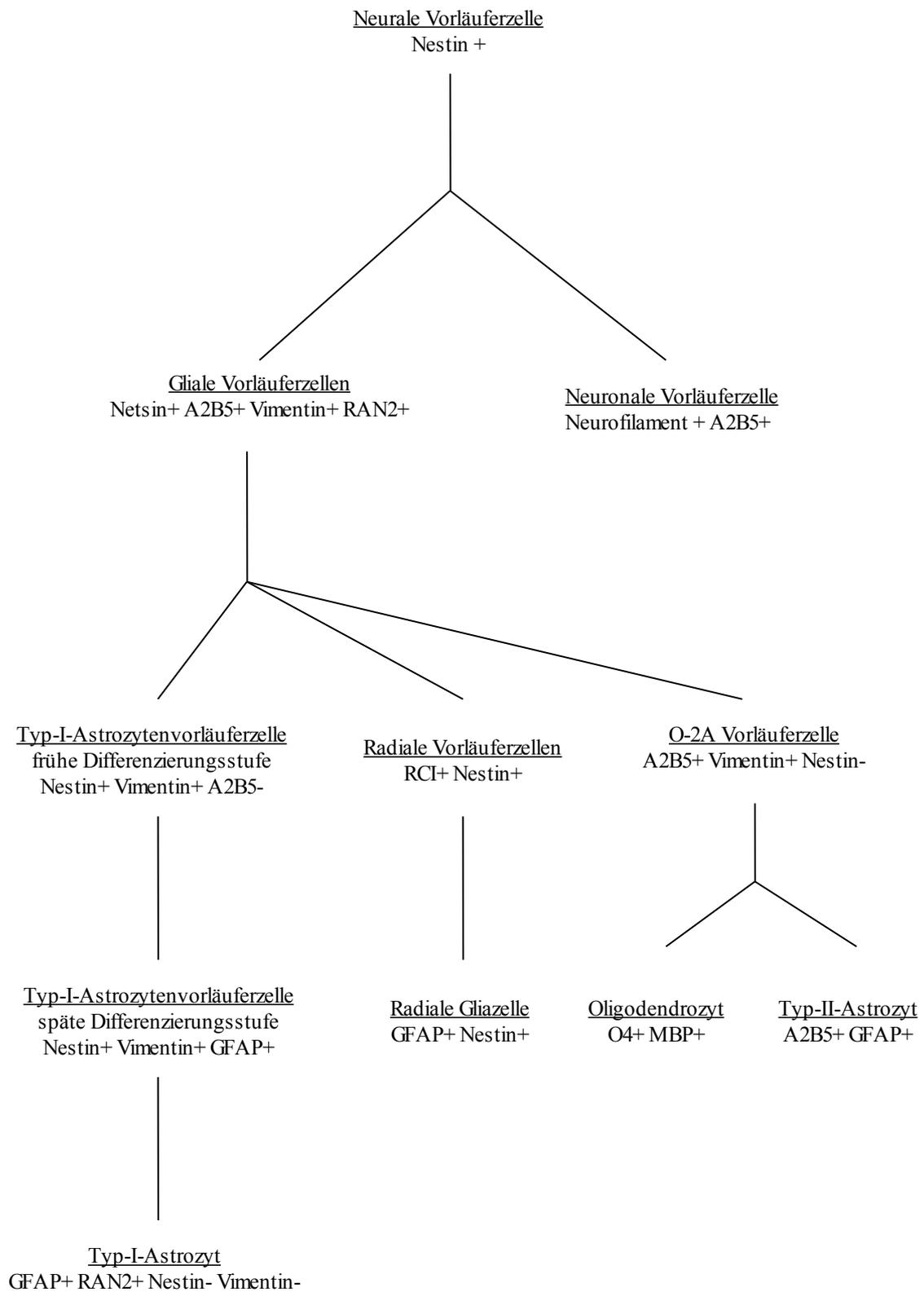


Abb. 1 Schema der glialen Differenzierung (nach Cameron und Rakic, 1991)

## 2) Typ 1 Astrozytenvorläuferzellen:

Die Vorläuferzellen der Typ 1 Astrozyten haben eine protoplasmatische, epithelähnliche Morphologie und sind immunpositiv für Vimentin, Nestin und möglicherweise Nestin. Die Antigene A2B5 und GFAP werden allerdings nicht exprimiert. Kurz bevor sie postmitotisch werden, ändern die Zellen ihr Expressionsmuster und zeigen sich immunpositiv für GFAP und verlieren ihre Antigenität für Vimentin und Nestin. GFAP ist ein für Astrozyten typisches Intermediärfilament-Protein mit einer molekularen Masse von 50 kDa. Es übernimmt wichtige Aufgaben in der Ausbildung der astrozytären Morphologie und Motilität. Außerdem ist GFAP bei der Ausbildung einer Astroglie nach ZNS-Läsionen beteiligt, wobei die GFAP Expression stark induziert wird (zur Übersicht: Eng et al., 2000). In unreifen oder reaktiven Astrozyten ist GFAP oft mit dem Intermediärfilament-Protein Vimentin colokalisiert (Inagaki et al., 1994).

## 3) Vorläufer der radialen Gliazellen:

Die Vorläufer der radialen Gliazellen werden durch die Expression von RC1, RC2, Nestin und Vimentin charakterisiert. Bei der weiteren Differenzierung kommt es zum Austausch des Intermediärfilament-Proteins Vimentin gegen GFAP. Die radiale Gliazelle bleibt mitotisch aktiv und kann sich zu verschiedenen anderen Zelltypen inklusive Neuronen differenzieren und zeigt somit selbst die Eigenschaften einer Vorläuferzelle (Malatesta et al., 2003; Gotz et al., 2002 ). Allerdings variiert der Grad der Neurogenese aus radialen Gliazellen während der Entwicklung in den verschiedenen Regionen des ZNS (Malatesta et al., 2003). In neueren Publikationen wird außerdem davon ausgegangen, dass sich radiale Gliazellen auch im adulten ZNS zu Neuronen differenzieren können (Gotz et al., 2002).

## **Einfluss von Astrozyten auf die Neurogenese:**

Schon in der Embryogenese kommen den Astrozyten wichtige Aufgaben bei der neuronalen Entwicklung zu. Dazu zählen die Förderung des Neuritenwachstum (Johansson und Stromberg, 2002; Tomaselli et al., 1988) sowie der neuronalen Differenzierung (Taberner et al., 2001) und Migration (Menet et al., 2000). Experimente von Ullian et al. (2001) haben gezeigt, dass die Bildung und Reifung von Synapsen in vitro maßgeblich von der Anwesenheit von Astrozyten abhängt. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe belegen, dass die Mehrzahl der Synapsen in vivo gleichzeitig mit der Entwicklung der Gliazellen generiert werden, was einen glialen Einfluss auf die Synaptogenese impliziert.

Es ist inzwischen allgemein anerkannt, dass auch im adulten ZNS kontinuierlich neue Neurone generiert werden. Besonders eingehend wurde die Neurogenese aus Vorläuferzellen im adulten ZNS in der subventrikulären Zone (Luskin, 1993) und im Gyrus dentatus (Kuhn et al., 1996) charakterisiert. Weiterhin zeigte sich eine erhöhte Neurogenese in pathologisch verändertem Gewebe wie epileptogenen Foci (Parent et al., 1998) oder ischämischen Arealen (Liu et al., 1998), aber auch durch eine geistig anregende Umwelt („enriched environment“) im Tierversuch (Kempermann et al., 1997). In der Regulation der Neurogenese scheinen Astrozyten wichtige Funktionen innezuhaben. So konnte gezeigt werden, dass adulte Astrozyten die Neurogenese aus neuralen Stammzellen induzieren (Song et al., 2002; Wagner et al., 1999). Durch Sekretion von neurotrophen Faktoren unterstützen Astrozyten die neuronale Differenzierung von neuralen Stammzellen (Lachyankar et al., 1997; Spranger et al., 1990; Riley et al., 2004). Der Neuritenauswuchs wird sowohl durch neurotrophe Faktoren (Geschwind et al., 1996), als auch durch die Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronectin gefördert (Biran et al., 2003; Ard et al., 1993; Tom et al., 2004).

Allerdings sind die Astrozyten auch direkt an der Neurogenese beteiligt. Doetsch et al. (1999) konnten in vitro aus Astrozyten der subventrikulären Zone Neurosphären gewinnen und nachweisen, dass die subventrikulären Astrozyten in vivo neurale Vorläuferzellen bilden, die sich schließlich zu Neuronen differenzieren. Auch die Studien von Seri et al. (2001) zeigen, dass sich hippocampale Astrozyten in vivo zu Neuronen differenzieren können. Laywell et al. (2000) stellten ebenfalls fest, dass Astrozyten aus verschiedenen Hirnregionen in vitro Neurosphären formen. Folglich können Astrozyten sogar als neurale Stammzellen fungieren und stellen eine Quelle der Neurogenese im adulten ZNS dar.

### **Mögliche klinische Anwendungen für Gliazellen und ihre Vorläufer:**

Die Gentherapie stellt einen neuartigen und noch sehr experimentellen Ansatz in der Behandlung von Krankheiten dar. Während die traditionelle Pharmakotherapie therapeutische Substanzen von außen zuführt, können bei der Gentherapie pharmakologisch wirksame Agenzien direkt innerhalb des Körpers durch genetisch modifizierte Zellen freigesetzt werden.

Für den Gentransfer können nicht-virale oder virale Vektorsysteme benutzt werden. Dabei weisen die viralen Vektoren eine höhere Transduktionseffizienz auf (zur

Übersicht: Hermens und Verhagen, 1998). Allerdings sind nicht-virale Vektoren weniger immunogen und eine zytotoxische Viruswirkung muss nicht befürchtet werden. Es wurden inzwischen mehrere virale Vektorsysteme etabliert (zur Übersicht: Hermens und Verhaagen, 1998). Für den Gentransfer in das ZNS eignen sich Adenoviren besonders, da sie die drei wichtigsten Zelltypen des ZNS (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten) sowie Ependymzellen infizieren können (Bajocchi et al., 1993; Lowenstein et al., 1996). Des Weiteren konnten die adenoviralen Vektoren bis zur kompletten Entfernung aller Adenovirusgene weiterentwickelt werden (Kochanek et al., 1996), so dass das gesundheitsgefährdende Risiko des Vektors minimal ist.

Man unterscheidet zwei prinzipielle Strategien für den therapeutischen Gentransfer. Die erste Methode bringt das Transgen in vivo ein. Sie wird folglich als in vivo Gentherapie bezeichnet. Allerdings besteht dabei die Gefahr einer immunogenen und zytotoxischen Viruswirkung in vivo.

Bei der zweiten Methode findet der Gentransfer außerhalb des Körpers in kultivierte Zellen statt, die nach der Transduktion transplantiert werden. Sie wird demnach als ex-vivo Gentherapie bezeichnet. Vorteile dieses Vorgehens sind, dass der Erfolg der genetischen Modifikation in vitro vor der Transplantation gemessen werden kann und dass pathogene Effekte durch den viralen Vektor minimiert werden können. Nachteil bei diesem Verfahren ist die anschließend nötige Transplantation mit den konsekutiven Narkose- und Operationsrisiken. Zellen für eine ex-vivo Gentherapie müssen verschiedene Anforderungen erfüllen. Sie sollten eine hohe Expandierbarkeit in vitro aufweisen, wobei eine Transformation der Zellen sicher ausgeschlossen werden muss. Die Zellen sollten außerdem zu einem hohen Anteil transduzierbar sein und eine lang anhaltende Transgenexpression aufweisen. Weiterhin sollte eine regelrechte Integration ins Empfängergewebe nach Transplantation sichergestellt werden.

Für eine ex-vivo Gentherapie des ZNS sind daher Astrozyten hervorragend geeignet. Sie sind physiologische Bestandteile des ZNS, besitzen zentrale Aufgaben bei der metabolischen Versorgung von Neuronen und unterstützen ihre Differenzierung und Regeneration. Darüber hinaus sind sie leicht zu isolieren, in Langzeitkultur expandierbar und lassen sich effizient durch virale Vektoren transduzieren. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits genetisch modifizierte Astrozyten erzeugt (Cunningham et al., 1991; La Gamma et al., 1993; Lundberg et al., 1996). Nach Transplantation zeigen genetisch modifizierte Astrozyten eine regelrechte Integration

ins Empfängergewebe und weisen eine stabile Transgenexpression für mindestens 6 Wochen auf (Arnhold et al., 2002).

Astrozytenvorläuferzellen haben im Vergleich zu reifen Astrozyten höhere proliferative Kapazitäten (Yong et al., 1991) und sind folglich schneller in vitro expandierbar, was sie zu noch geeigneteren Kandidaten für eine ex-vivo Gentherapie macht. Fetale humane Astrozyten, die aus legalen Schwangerschaftsabbrüchen gewonnen wurden, konnten erfolgreich durch ein Retrovirus mit einem NGF-Transgen transduziert werden und sezernierten daraufhin große Mengen von NGF (Lin et al., 1997). Ein größeres Potential bieten jedoch Zellen, die aus postnatalem Gewebe gewonnen werden, da dies die Möglichkeit eröffnet, die Zellen nach Transduktion autolog an den erkrankten Patienten zurückzugeben. Dadurch käme man einer Transplantatabstoßung zuvor und der Patient würde keine immunsuppressive Therapie benötigen. Ridet et al. (1999) konnten Astrozyten aus dem adulten Cortex isolieren, expandieren und das Transgen für die humane Tyrosinhydroxylase einbringen.

Von besonderer Bedeutung für eine ex-vivo Gentherapie bei Erkrankungen des ZNS ist die gezielte Auswahl des therapeutischen Transgen. Unter diesen zeigt die Gruppe der Neurotrophine sehr vielversprechende Eigenschaften, die im folgenden vorgestellt werden sollen.

### **Neurotrophine:**

Neurotrophine sind Polypeptide, die das neuronale Überleben und die neuronale Differenzierung fördern (Ahmed et al., 1995; Lachyankar et al., 1997; Sauer et al., 1995). Diese Eigenschaften sind für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen sehr interessant. Allerdings ist eine systemische Applikation von neurotrophen Faktoren problematisch, da sie die Blut-Hirn-Schranke nur unzureichend überwinden können (zur Übersicht: Semkova und Krieglstein, 1999). Aktuell werden verschiedene Techniken erprobt, mit dem Ziel neurotrophe Faktoren ins ZNS einzubringen. Zum einen können neurotrophe Faktoren direkt in das ZNS infundiert werden. Dabei wurden sowohl intraventrikuläre Infusionen (Tuszynski et al., 1990) als auch intraparenchymatöse Infusionen (Tuszynski, 2000) von NGF durchgeführt. Zum anderen konnten Semkova et al. (1996) pharmakologisch eine Induktion von NGF durch Clenbuterol nachweisen. Dabei scheint aktivierten Astrozyten eine wesentliche Rolle zuzukommen (Culmsee et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit für den Übertritt von neurotrophen Faktoren durch die Blut-Hirn-Schranke besteht in der Konjugation des neurotrophen Faktors mit

Antikörpern, die über ein Transzytosesystem ins ZNS eingeschleust werden (Zhang und Pardridge, 2001). Zuletzt stellt die ex vivo Gentherapie eine Möglichkeit zur Applikation von neurotrophen Faktoren ins ZNS dar (Cunningham et al., 1991; Lin et al., 1997). Charakteristika der ex vivo Gentherapie sind die Freisetzung der neurotrophen Faktoren über lange Zeiträume, sowie die Möglichkeit zur lokalisierten Transplantation der transduzierten Zellen, wodurch unerwünschte Wirkungen minimiert werden. Diese Eigenschaften machen die ex vivo Gentherapie zu einer idealen Methode für die Behandlung chronischer neurodegenerativer Erkrankungen.

Neurotrophine sind Polypeptide, die mit hoher Affinität an Trk-Rezeptoren und mit niedriger Affinität an p75-Rezeptoren binden (zur Übersicht: Binder et al., 2001). Die Trk-Rezeptoren untergliedern sich in drei Untergruppen (Trk A-, B- und C-Rezeptor). Sie sind transmembranäre Proteine und entfalten eine Tyrosinkinaseaktivität bei Bindung eines Neurotrophin (Cheng und Mattson, 1994). Die Trk-Rezeptoren werden von unterschiedlichen Neuronenpopulationen exprimiert und sie determinieren die Sensitivität eines Neurons auf einen neurotrophen Faktor (zur Übersicht: Semkova und Krieglstein, 1999).

Der wohl am umfassendsten erforschte neurotrophe Faktor ist NGF mit seinem Rezeptor TrkA (zur Übersicht: Semkova und Krieglstein, 1999). Weitere Mitglieder der Neurotrophin Familie sind BDNF sowie NT 3, NT 4/5 und NT 6. GDNF ist ein weiterer wichtiger neurotropher Faktor, der jedoch nicht zu der Familie der Neurotrophine gezählt wird. In Zellkultur- und Tierexperimenten konnten neurotrophe Faktoren bereits vielversprechende Wirkungen erzielen.

NGF: NGF zeigt neurotrophe Effekte auf cholinerge Neurone (Hartikka et al., 1988) und schützt diese vor einer Axotomie induzierten Degeneration und vor einer Altersatrophie (Hefti et al., 1984). Chen und Gage transplantierten 1995 genetisch modifizierte Fibroblasten, die NGF sezernieren, in den Nucleus basalis magnocellularis von gealterten Ratten. Die Gedächtnisleistung der Ratten verbesserte sich nach der Transplantation. Diese Beobachtungen bieten interessante Ansätze für die Therapie des M. Alzheimer. Aber die neurotrophen Wirkungen von NGF beschränken sich nicht nur auf diese Neuronenpopulation. NGF entfaltet außerdem eine protektive Wirkung gegen Exzitotoxizität bei corticalen und hippocampalen Neuronen (Shimohama et al., 1993). Der genaue intrazelluläre Wirkmechanismus dafür ist bislang nicht bekannt, es wird jedoch unter anderem eine Induktion von antioxidativen Enzymen vermutet, die zu den protektiven Effekten beiträgt (Matsson et al., 1995; Carter et al., 1996). In vivo

vermindert NGF die neuronale Degeneration von corticalen und hippocampalen Neuronen nach einer Ischämie (Buchan et al., 1990; Shigeno et al., 1991).

Diese vielfältigen neuroprotektiven Wirkungen machen NGF zu einem interessanten Transgen für eine ex-vivo Gentherapie. Dabei konnten experimentell schon erste Erfolge verzeichnet werden. So konnten NGF produzierende Fibroblasten die Auswirkungen einer Ischämie auf hippocampale Neurone abmildern (Pechan et al., 1995).

**BDNF:** Der neurotrophe Faktor BDNF weist vor allem in der Neuroprotektion von Neuronen der Retina und des Ganglion spirale beachtliches Potenzial auf. Geschwind et al. (1996) zeigten eine Stimulation des Neuritenauswuchses in kultivierten Spiralganglia unter Einfluss von BDNF. Weiterhin konnte eine durch Neomycin ausgelöste Degeneration des Ganglion spirale durch Zufuhr von BDNF über einen HSV-Vektor verhindert werden (Staecker et al., 1998). Außerdem wurde in einem Tiermodell für das Glaukom eine protektive Wirkung von BDNF auf retinale Neurone nachgewiesen (Wang et al., 2002). BDNF wurde in diesen Experimenten mittels transduzierter neuraler Progenitor-Zellen appliziert. Darüber hinaus zeigt BDNF auch in neurodegenerativen Erkrankungen eine günstige Wirkung. So zeigte die Transplantation von transduzierten BDNF-produzierenden Fibroblasten und Astrozyten im 6-OHDA Modell der Ratte eine verminderte Degeneration von dopaminergen Zellen, sowie ein verbessertes Rotationsverhalten der läsionierten Ratten (Wang et al., 2002).

### **Astrozyten und Epilepsie:**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Zellkultur astrozytärer Vorläuferzellen aus dem humanen Hippocampus etabliert. Die Zellen wurden im Rahmen einer apikalen Temporallappenresektion bei refraktärer Temporallappenepilepsie mit Hippocampussklerose gewonnen. Das epileptogene Milieu führt zu signifikanten Gewebeveränderungen, die im folgenden erläutert werden sollen. Blümcke et al. (2001) beschrieben ein vermehrtes Auftreten von Nestin positiven neuralen Vorläuferzellen mit konsekutiv erhöhter Neurogenese bei pädiatrischen Patienten mit Temporallappenepilepsie. Ähnliche Ergebnisse zeigten Experimente von Parent et al. (1997) am Pilocarpin Modell für Epilepsie an adulten Ratten. Scorza et al. (2005) fanden im Pilocarpin Modell eine Colokalisation von Nestin und GFAP in einer Subpopulation von Zellen, was auf deren astrozytären Vorläufercharakter hinweist. Auch die Expression von neurotrophen Faktoren wird in der epileptischen Umgebung verändert.

So zeigt sich im Pilocarpin Modell eine verstärkte Transkription von NGF und BDNF, die innerhalb von 24 Stunden ein Maximum erreicht (Poulsen et al., 2004). Im Kainatsäure Modell für Temporallappenepilepsie konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von BDNF bis 45 Tage, von NGF sogar über 120 Tage nachweisbar waren (Shetty et al., 2003). Daten bei humaner Temporallappenepilepsie zeigten hingegen nur erhöhte Konzentrationen von BDNF, nicht aber von NGF (Takahashi et al., 1999). In der Zusammenschau ergibt sich für das epileptische Hippocampusgewebe eine bemerkenswerte Kombination aus verstärkter Neurogenese, Anwesenheit von Astrozytenvorläufern und erhöhter Neurotrophinfreisetzung. Da Temporallappenresektionen routinemäßig bei refraktärer Temporallappenepilepsie durchgeführt werden (zur Übersicht: Polkey, 2004; Wiebe, 2004), stellt das rezidierte Gewebe eine interessante Quelle für neurale und gliale Vorläuferzellen dar.

### **Ziel der Arbeit:**

In dieser Arbeit soll die Eignung von Astrozytenvorläuferzellen für eine ex-vivo Gentherapie oder als reines Zelltherapeutikum ohne genetische Modifikation untersucht werden. Dabei sollen zunächst Möglichkeiten zur Isolierung und Expansion in vitro untersucht werden. Weiterhin soll die Markerexpression humaner postnataler Astrozytenvorläufer mittels immunzytochemischer Methoden bestimmt werden. Von besonderem Interesse ist die Sekretion von neurotrophen Faktoren durch die Astrozytenvorläufer. Art und Quantität der Sekretion gibt Aufschluss darüber, ob die Astrozytenvorläufer per se therapeutisch nutzbar sind. Im weiteren Verlauf soll die Transduzierbarkeit durch virale Vektoren mit dem Reportergen EGFP bestimmt werden, um zu erfahren, ob und wie effizient Transgene in die Zellen eingeschleust werden können.

Zuletzt müssen Sicherheitsaspekte berücksichtigt werden. Dabei muss vor allem eine Transformation der Zellen ausgeschlossen werden, um das Risiko nach einer Transplantation von Astrozytenvorläufern zu minimieren.

## **2. Material und Methodik:**

### **2.1 Kultivierung humaner Astrozytenvorläuferzellen:**

#### Material:

DMEM, DMEM/F12, fetales Kälberserum, N2-Zusätze, Penicillin/Streptomycin sowie L-Glutamin stammte von der Fa. Invitrogen.

Humanes rekombinantes EGF stammte von der Fa. Sigma.

Humanes rekombinantes bFGF stammte von der Fa. Preprotech.

Accutase stammte von der Fa. PAA Laboratories.

10 cm Zellkulturschalen (Falcon<sup>R</sup>) stammten von der Fa. Becton Dickinson Labware.

#### Methodik:

Das humane Gewebe wurde aus dem Hippocampus einer 14jährigen Patientin entnommen. Dies geschah im Rahmen einer apikalen Temporallappenresektion zur operativen Therapie eines gutartigen glioneuronalen Tumors (WHO-Grad I). Die Patientin wies eine sechsmonatige Vorgeschichte einer Temporallappenepilepsie auf. Die Operation wurde von Dr. Heinz Wolfgang Pannek am Krankenhaus Bethel-Mara in Bielefeld durchgeführt. Das dem Tumor angrenzende Gewebe enthielt Anteile folgender Regionen: Alveus, Fimbria, Gyrus dentatus, Subiculum sowie CA1-CA4. Das Gewebe wurde in DMEM/F12 Medium überführt und für den Transport zum anatomischen Institut I in Köln für 2 Stunden auf Eis gelagert.

Nach Entfernung der Meningen wurde das Gewebe in kleine Stücke geschnitten und mit einer Pasteur Pipette in kalzium- und magnesiumfreier Phosphatpufferlösung dissoziiert. Das gleiche Volumen an Accutase wurde hinzugegeben und die Suspension wurde 8 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das selbe Volumen an DMEM/F12 Medium hinzugefügt, und die Suspension wurde zentrifugiert. Das Sediment wurde in DMEM/F12 Medium resuspendiert unter Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1% N2-Zusatz (Bottenstein und Sato, 1979), 20 ng/ml EGF und 20 ng/ml bFGF. Danach wurden die Zellen auf Zellkulturschalen (10 cm Durchmesser) ausplattiert. Die Zellkulturen wuchsen in Brutschränken bei 37 °C, 5% Kohlendioxid in befeuchteter Luft mit 19,8% Luft-Sauerstoff. Unter diesen Bedingungen konnte keine Entwicklung von Neurosphären beobachtet werden.

Allerdings setzten sich viele Zellen auf dem Boden der Zellkulturschalen ab. Nach Zugabe von DMEM/F12 Medium unter Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml

Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 1% N<sub>2</sub>-Zusatz und 10% fetalem Kälberserum entwickelten sich mehrere Kolonien von Zellen mit astrozytärer Morphologie in drei verschiedenen Kulturschalen. Die Zellen wurden mit Accutase abgelöst und passagiert. Als Medium wurde nun DMEM/F12 unter Zusatz von 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin und 10% fetalem Kälberserum verwendet. Die proliferierenden oligoklonalen humanen Astrozytenvorläuferzellen wurden nach Erreichen der Konfluenz passagiert (Verdünnung 1:5 bis 1:3). Dies geschah anfänglich etwa alle 10 Tage, in hohen Passagen verlängerte sich die Zeit durch herabgesetzte Proliferation auf bis zu 4 Wochen. Insgesamt konnte eine Langzeitkultur von über 6 Monaten etabliert werden.

## **2.2 Bestimmung der Ausplattierungseffizienz:**

Um die Ausplattierungseffizienz zu ermitteln, wurde geprüft, wie hoch der Anteil der Zellen ist, der nach Passagierung adhärent wird. Dazu wurde die Zellzahl nach Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt. Anschließend wurden je 50.000 Zellen auf Zellkulturschalen (5 cm Durchmesser) mit Zählraster ausplattiert. Danach wurden die Zellen für 6 Stunden bei 37°C inkubiert, um sie adhären zu lassen. Die Anzahl von adhären Zellen wurde lichtmikroskopisch nach Anfärbung der Zellkerne mit Hoechst Dye 333342 (Fa. Sigma) ermittelt. Aus den erhobenen Daten wurde die Ausplattierungseffizienz errechnet.

## **2.3 Bestimmung der Proliferation:**

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des „CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ der Firma Promega untersucht. Grundlage dieses Tests ist die Umsetzung von Tetrazolium (Owen`s Reagenz) in den Farbstoff Formazan durch NADPH oder NADH, welche von metabolisch aktiven Zellen produziert werden. Die Farbstoffkonzentration ist somit proportional zur Anzahl der vorliegenden Zellen. Durch Absorptionsmessung bei 490 nm kann nachfolgend die Zellzahl bestimmt werden. Gemessen wurde die Proliferation der Zellen in Passage 6 in Anwesenheit von 10% FCS, 20 ng/ml EGF, 20 ng/ml bFGF und 20 ng/ml EGF + 20 ng/ml bFGF jeweils in DMEM-F12 Medium sowie von Zellen in Passage 10 in Anwesenheit von 10% FCS in DMEM-F12 Medium. Für alle Ansätze wurde eine vierfache Bestimmung durchgeführt. Zur Bestimmung der Hintergrundabsorption wurde Medium ohne Zusatz

von Zellen verwendet. Zu Beginn wurde das jeweilige Medium in ein Well einer 96-Wellplatte beschickt. Anschließend wurden je 3.000 Zellen in die Wells gegeben. Das Gesamtvolumen pro Well betrug dann 100 µl. Die Zellen wurden nun für 120 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Danach wurden 20 µl „CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent“ pro Well hinzugefügt, und die Zellen wurden für eine Stunde im Zellkulturschrank inkubiert. Abschließend wurde die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader ermittelt. Für die Absorption wurde der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

#### **2.4 Immunzytochemie:**

Zur Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen im Wachstumsmedium in einer Dichte von 50 Zellen pro mm<sup>2</sup> auf Poly-L-Lysin (Fa. Sigma) beschichteten Glasplättchen in 4-Loch Zellkulturplatten (Fa. Invitrogen) ausplattiert. Es wurden sowohl Einzel-, als auch Doppelimmunfluoreszenzanalysen durchgeführt.

Die Zellen wurden für 20 Minuten mit einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd (Fa. Merck) in 0,1 M PBS-Lösung (pH 7,4) fixiert. Es folgten vier Waschschrte über jeweils 10 Minuten, wobei die ersten beiden Schritte mit einer 0,1 M PBS-, die letzten beiden mit einer 0,05 M TBS-Lösung durchgeführt wurden. Anschließend wurden die Zellen in Anwesenheit von 0,25% Triton X-100 (Fa. Serva) und 0,5 M Ammoniumchlorid (Fa. Sigma) in 0,05 M TBS für 10 Minuten permeabilisiert.

##### Zusammensetzung 0,1 M Phosphatpuffer / PBS (pH 7,4)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	14,4 g/l	(Fa. Merck)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	2,6 g/l	(Fa. Merck)
NaCl	8,766 g/l	(Fa. Merck)

##### Zusammensetzung 0,05 M Trispuffer / TBS (pH 7,6)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan	6,057 g/l	(Fa. Merck)
NaCl	8,766 g/l	(Fa. Merck)

in Aqua dest.

Nach zwei weiteren Waschschrten mit 0,05 M TBS erfolgte eine Hemmung unspezifischer Reaktionen durch Inkubation mit 5% bovinem Serumalbumin (Fa.

Sigma) in 0,05 M TBS über 60 Minuten. Anschließend wurde der Primärantikörper hinzugegeben.

Folgende Primärantikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen verwendet:

Anti-GFAP	(1:1000, Fa. Progen, polyklonal, Meerschweinchen)
Anti-Ki 67	(1:100, Fa. DAKO, polyklonal, Kaninchen)
Anti-MAP2	(1:1000, Fa. Sigma, monoklonal, Maus)
Anti-MBP	(1:500, Fa. Chemicon, monoklonal, Maus)
Anti-Nestin	(1:50, Fa. BD Transduction Laboratories, monoklonal, Maus)
Anti-NeuN	(1:150, Fa. Chemicon, monoklonal, Maus)
Anti-O4	(1:20, Fa. Chemicon, monoklonal, Maus)
Anti-S-100β	(1:1000, Fa. Swant, polyklonal, Kaninchen)
Anti-β-III-Tubulin	(1:8000, Fa. Covance, polyklonal, Kaninchen)
Anti-Vimentin	(1:50, Fa. Sigma, monoklonal, Maus)
Anti-A2B5	(1:100, Fa. Sigma, monoklonal, Maus)

Die Inkubation erfolgte in der entsprechenden Verdünnung in 0,8% Rinderserumalbumin in 0,05 M TBS über Nacht im Kühlschrank. Negativkontrollen wurden durch Inkubation der Zellen ohne Zusatz des Primärantikörpers durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen vier mal mit 0,05 M TBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen für 45 Minuten mit dem sekundären Antikörper in 0,8% Rinderserumalbumin inkubiert.

Folgende Sekundärantikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen verwendet:

Cy3 fluoreszenzgekoppelt goat anti-mouse oder anti-rabbit IgG	(1:1000, Fa. Rockland)
Cy2 fluoreszenzgekoppelt goat anti-mouse oder anti-rabbit IgG	(1:200, Fa. Jackson Immuno Research Laboratories)

Der Cy3-gekoppelte Sekundärantikörper absorbiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 552 nm und emittiert rotes Licht der Wellenlänge 565 nm, während der Cy2-gekoppelte Antikörper ein Absorptionsmaximum bei 492 nm aufweist und bei 510 nm emittiert. Beim Nachweis zweier unterschiedlicher Antigene am selben Präparat, das heißt bei Verwendung zweier verschiedener Primärantikörper, wurden die

zwei Antikörper nacheinander in zwei separaten Immunfärbungen nachgewiesen. Dabei wurden die Primärantikörper entweder durch den sekundären Cy2- oder den Cy3-Antikörper detektiert. Alle Waschschrte und Inkubationen wurden zum Erhalt der Fluoreszenz unter Lichtschutz durchgeführt. Zur quantitativen Analyse wurden bei einigen Experimenten die Zellkerne mit Hoechst Dye 333342 (Fa. Sigma) markiert. Die Präparate wurden anschließend in einer Alkoholverdünnungsreihe entwässert und mit Entelan (Fa. Merck) eingedeckt. Die Auswertung der Experimente erfolgte an einem Axiophot Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss).

## **2.5 Bestimmung der Sekretion von neurotrophen Faktoren:**

Die Analyse der Sekretionsleistung neurotropher Faktoren durch die Zellen erfolgte mittels enzyme-linked-immuno-assay (ELISA) in 96-Well Platten. Dabei wurde die Sekretion von NGF, BDNF, GDNF und NT3 mit Hilfe von ELISA-Systemen der Firma Promega bestimmt. Die Konzentration der neurotrophen Faktoren wurde in den Mediumüberständen bestimmt, die aus 10 cm Zellkulturschalen mit einer Zellzahl von 200.000-400.000 abgenommen wurden. Die Überstände wurden für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert und bis zum Experiment bei -80° C gelagert. Für alle Proben erfolgte eine Doppelbestimmung.

Als Negativkontrolle wurde stets eine Probe des Wachstumsmedium mitgetestet. Zuerst wurde jedes Well mit 100 µl Antikörperlösung in Carbonatpuffer gegen das jeweilige Neurotrophin beschickt.

### Zusammensetzung der Antikörperlösungen für den Primärantikörper

10 µl Anti-NGF (polyklonaler Antikörper)	+ 10 ml Carbonatpuffer (pH 9,7)
10 µl Anti-BDNF (monoklonaler Antikörper)	+ 9,99 ml Carbonatpuffer (pH 9,7)
10 µl Anti-GDNF (monoklonaler Antikörper)	+ 10 ml Carbonatpuffer (pH 8,2)
20 µl Anti-NT 3 (polyklonaler Antikörper)	+ 10 ml Carbonatpuffer (pH 9,7)

Anschließend wurde die Platte bei 4° C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte geleert und mit TBST-Waschpuffer gewaschen. Danach wurden je 200 ml „Block & Sample“ Puffer für eine Stunde in jedes Well gegeben, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Es folgte ein weiterer Waschschrte.

In den vertikalen Reihen 1 und 2 der 96-Well-Platte wurde nun mit Hilfe der entsprechenden Neurotrophin-Standardlösung eine Verdünnungsreihe mit jeweils 100

µl pro Well angesetzt. Die Konzentrationen in den Verdünnungsreihen erstreckten sich von 0 bis 1000 pg/ml für GDNF, von 0 bis 500 pg/ml für BDNF und NGF sowie von 0 bis 300 pg/ml für NT 3. In die restlichen freien Wells wurden nun die eigentlichen Proben und die Negativkontrollen eingefüllt. Die Platten wurden im Anschluss für sechs Stunden (bei BDNF zwei Stunden) bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert und danach fünf mal gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers, gelöst in „Block & Sample“ Puffer.

#### Zusammensetzung der Antikörperlösung für den sekundären Antikörper

2,5 µl Anti-NGF (monoklonaler Antikörper) + 10 ml „Block & Sample“ Puffer  
20 µl Anti-BDNF (polyklonaler Antikörper) + 9,98 ml „Block & Sample“ Puffer  
20 µl Anti-GDNF (polyklonaler Antikörper) + 10 ml „Block & Sample“ Puffer  
2,5 µl Anti-NT 3 (monoklonaler Antikörper) + 10 ml „Block & Sample“ Puffer

Je 100 µl werden in ein Well gegeben.

An die Zugabe des Sekundärantikörpers schloss sich eine Inkubationsphase von 16 Stunden bei 4° C an (für BDNF 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler). Danach wurden fünf Waschschriffe durchgeführt. Anschließend wurde die Platte für 2 Stunden und 30 Minuten (für BDNF eine Stunde) mit einem Antikörper-HRP Konjugat inkubiert und fünf mal gewaschen.

#### Zusammensetzung der Konjugatlösung

NGF: 5 µl Anti-Ratte IgG HRP Konjugat + 10 ml „Block & Sample“ Puffer  
BDNF: 50 µl Anti-Huhn IgY HRP Konjugat + 9,95 ml „Block & Sample“ Puffer  
GDNF: 2 µl Anti-Huhn IgY HRP Konjugat + 10 ml „Block & Sample“ Puffer  
NT 3: 100 µl Anti-Maus IgG HRP Konjugat + 9,9 ml „Block & Sample“ Puffer

Nun erfolgte die Zugabe von „TMB-Lösung“, was proportional zur Konzentration des gebundenen HRP-Konjugats eine Farbreaktion auslöst. Dabei wird umso mehr Farbstoff gebildet je höher die Konzentration des neurotrophen Faktors ist. Die Reaktion wurde nach 10 Minuten durch Zugabe von 1M Salzsäure (1M Phosphorsäure bei GDNF und NGF) abgestoppt. Abschließend erfolgte die Auswertung der Experimente an einem ELISA-Reader durch eine Absorptionsbestimmung bei einer Wellenlänge von 450 nm.

## **2.6 Chromosomenfärbung:**

Die zytogenetische Analyse wurde mit Hilfe von Standard Metaphase Techniken durchgeführt (Verma und Babu, 1989). Nach vierstündiger Exposition von 0,5 µg/ml Colcemid (Fa. Sigma) wurden die Zellen passagiert, mit 0,56 % Kaliumchloridlösung behandelt, in Methanol / Essigsäure (1:3) fixiert und mit 0,2 % Giemsa Lösung (Fa. Sigma) in PBS gefärbt. Anschließend wurde die Chromosomenanzahl lichtmikroskopisch ausgezählt.

## **2.7 Transduktion mit rekombinantem Adenovirus:**

Der high capacity adenovirale Vektor HC-AdFK7 wurde von Dinser et al. (2001) entwickelt und exprimiert EGFP unter Kontrolle des hCMV Promotors. Bei diesem Vektortyp wurden alle für virale Proteine codierenden DNA Sequenzen entfernt. Dadurch ergibt sich eine Aufnahmekapazität von 36 kb DNA. Gegenüber früheren Generationen adenoviraler Vektoren zeichnen sich high-capacity Adenovirusvektoren durch eine geringere Immunogenität und eine verlängerte Transgenexpression in vivo aus (Schiedner et al., 1998; zur Übersicht Kochanek et al., 2001). Das für den Vektor verwendete Plasmid enthält neben dem EGFP Gen unter Kontrolle des hCMV Promotors und des Polyadenylierungssignals des bovinen Wachstumshormons weitere DNA Sequenzen. Eingefasst werden die eingefügten DNA Sequenzen zur Rechten und zur Linken (vgl. Abb. 2) von inverted terminal repeat (ITR) Sequenzen, die bei der viralen DNA als Replikationsursprung dienen. Der linken ITR-Sequenz schließt sich das Verpackungssignal sowie eine 20 kb lange DNA Sequenz aus dem humanen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HRPT) Genlocus an, welche als einfacher Platzhalter dient. Nun folgt die CMV-EGFP Sequenz als eigentliches Transgen. Abgeschlossen wird das Plasmid durch einen 6,5 kb langen Platzhalter aus der humanen C346 Sequenz. Je 10.000 humane Astrozytenvorläufer wurden in Zellkulturschalen (Durchmesser 3 cm) für 48 Stunden mit einer Infektionsmultiplizität (MOI) von 100 transduziert.

Dabei wurde als Medium DMEM F12 mit 1% FCS verwendet. Um die Effizienz der Transduktion zu bestimmen, wurde 24 Stunden nach der Transduktion eine Zellkernfärbung mit Hoechst Dye vorgenommen. Danach wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop der Anteil transduzierter Zellen an der Gesamtzahl der Zellen bestimmt.



Abb. 2: schematische Darstellung des Vektors.

## **2.8 Stereotaktische intrazerebrale Transplantation:**

Als Empfänger des intrazerebralen Transplantats dienten neben adulten Nacktmäusen und Nacktratten auch Wistar Ratten. Die Transplantationen der Nackttiere wurde am Max Planck Institut für neurologische Forschung, die der Wistar Ratten im anatomischen Institut I der Universität zu Köln jeweils von Herrn PD Dr. med vet Arnhold durchgeführt. Die Astrozyten wurden 48 Stunden nach Transduktion mit dem EGFP-exprimierenden Adenovirusvektor aus der Zellkulturschale abgelöst und in Einzelzellen dissoziiert. Je 30.000 Kontrollzellen und 30.000 transduzierte Zellen wurden in das rechte Striatum der Tiere injiziert. Die Tiere wurden zuvor mit Xylazin (13 mg/kg KG i.p., Rompun, Fa. Bayer) und Ketamin (87 mg/kg KG i.p., Ketanest, Fa. Parke Davis) anaesthetisiert. Der Schädel der Ratten wurde an drei Punkten fixiert (am Oberkiefer und den beiden äußeren Gehörgängen), so dass das Schädeldach plan ausgerichtet war. Mit Hilfe eines stereotaktischen Anatomieatlasses (Abb. 3) wurde die Stelle für die Bohrlochtrepanation ermittelt (Paxinos und Watson, 1986). Das Bohrloch wurde nun mit Hilfe eines Präzisionswellenbohrers (Fa. Proxon, Minimot 40/E) unter Vermeidung einer Duraläsion eröffnet. Anschließend wurden die Astrozyten syntaktisch implantiert. Dazu wurde eine Hamilton-Spritze mit aufgesetzter 22S-gauge Nadel verwendet. Die Astrozyten wurden in 5 µl Zellsuspension in DMEM/F12 ohne weitere Zusätze mit einer Geschwindigkeit von 1 µl pro Minute injiziert. Nach Beenden der Injektion wurde zwei zusätzliche Minuten gewartet, um ein Angleichen des finalen Injektionsdrucks zu ermöglichen. Danach wurde die Injektionsnadel langsam entfernt.

Die Tiere wurden nach Transplantation für 2 oder 3 Monate gehalten und auf physische und psychische Auffälligkeiten, vor allem im Hinblick auf Anzeichen einer intrakraniellen Neoplasie beobachtet. Nach Beendigung dieses Zeitraums wurden die Tiere für die Perfusionsfixation vorbereitet. Nach Betäubung der Tiere mit reinem CO<sub>2</sub> wurde die Narkose durch intraperitoneale Injektion von Rompun / Ketanest eingeleitet. Zur Gerinnungshemmung erhielten die Tiere 250 IE Heparin (0,1 ml Thrombophob 25.000, Fa. Nordmark) ebenfalls durch intraperitoneale Injektion. Nach Eintritt der

vollen Narkosewirkung wurden die Tiere in Rückenlage auf der Präparationsfläche fixiert, und der Thorax eröffnet. Der Herzbeutel wurde aufgeschnitten, die Perfusionskanüle (Abbocoth-T, Fa. Abbott) über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt und das rechte Herzohr eingeschnitten. Nach Vorspülung mit physiologischer Kochsalzlösung erfolgte unter einem Druck von 90 mm Hg die Perfusionsfixation mit Fixationslösung (4% Paraformaldehyd in 0,1 M PBS, 18°C, pH 7,3). Nach 20-minütiger Perfusion wurde das Gehirn freipräpariert, entnommen, und zur Nachfixation für 24 Stunden bei 4° C in der zur Fixation verwendeten Lösung gelagert. Das Gewebe wurde nach Beendigung der Fixation dreimal für jeweils 10 Minuten in 0,1 M PBS gewaschen und anschließend über 24 Stunden in 18% Suchrose (Fa. Merck) in 0,1 M PBS kryoprotectiert. Unmittelbar nach Beendigung der Kryoprotektion wurde das Gehirn bei -80° C eingefroren.

Zur Beurteilung der Integration und Transgenexpression der transplantierten Zellen wurden 8 µm dicke Transversalschnitte durch beide Hemisphären des Großhirn auf der Höhe des Striatum bei -20° C auf dem Kryostaten (Jung Frigocut 2800E, Fa. Leica) angefertigt und auf Poly-L-Lysin (0,05 %, Fa. Sigma) beschichtete Objektträger aufgezogen.

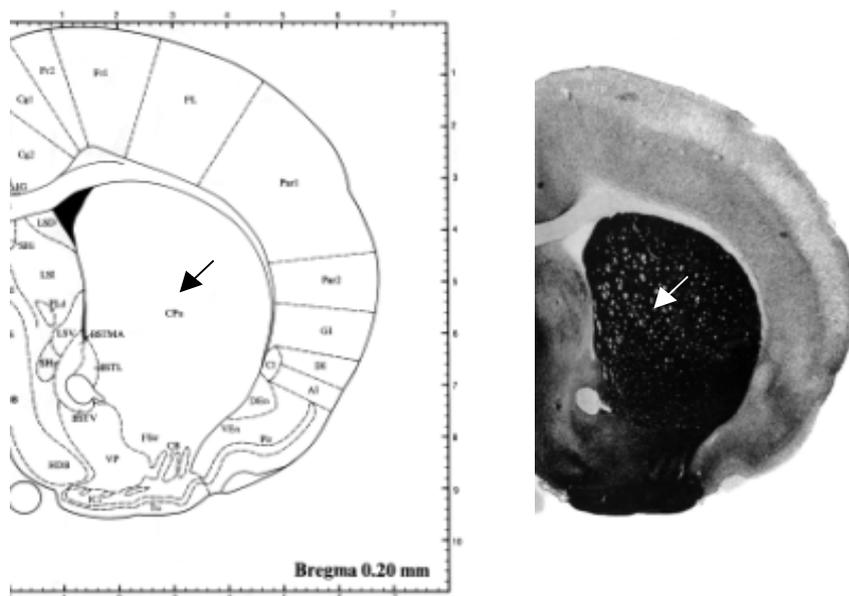


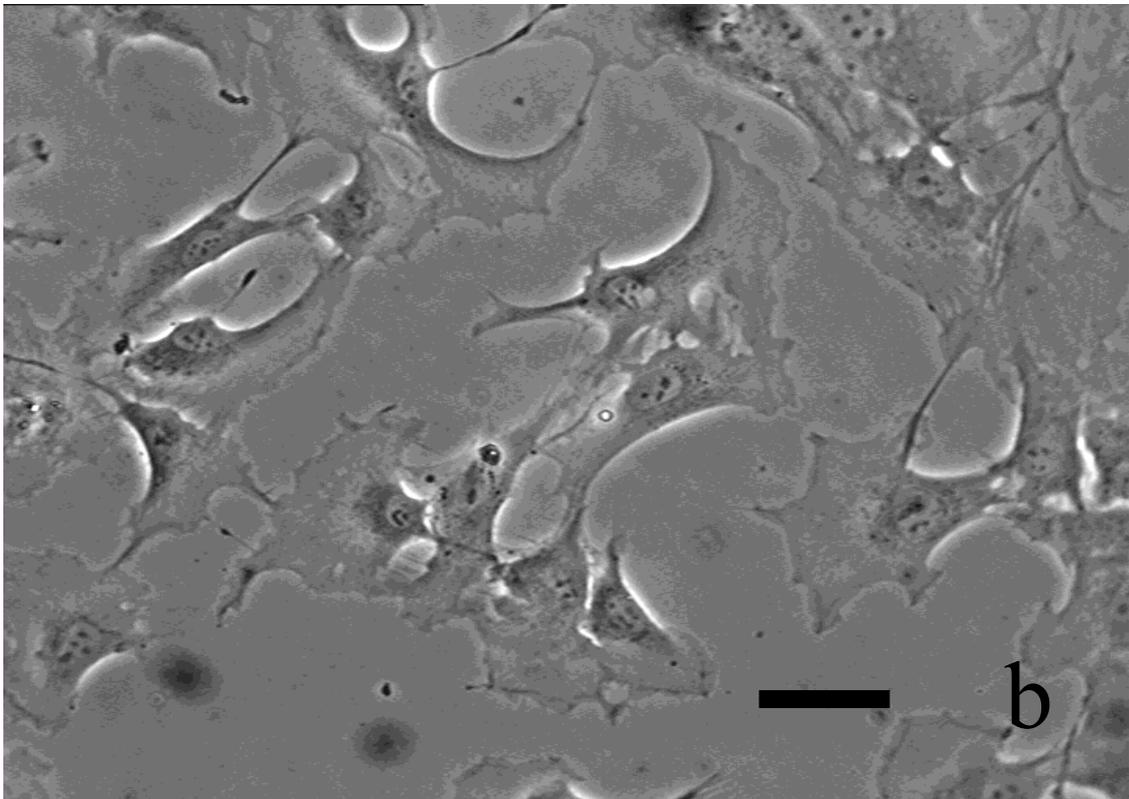
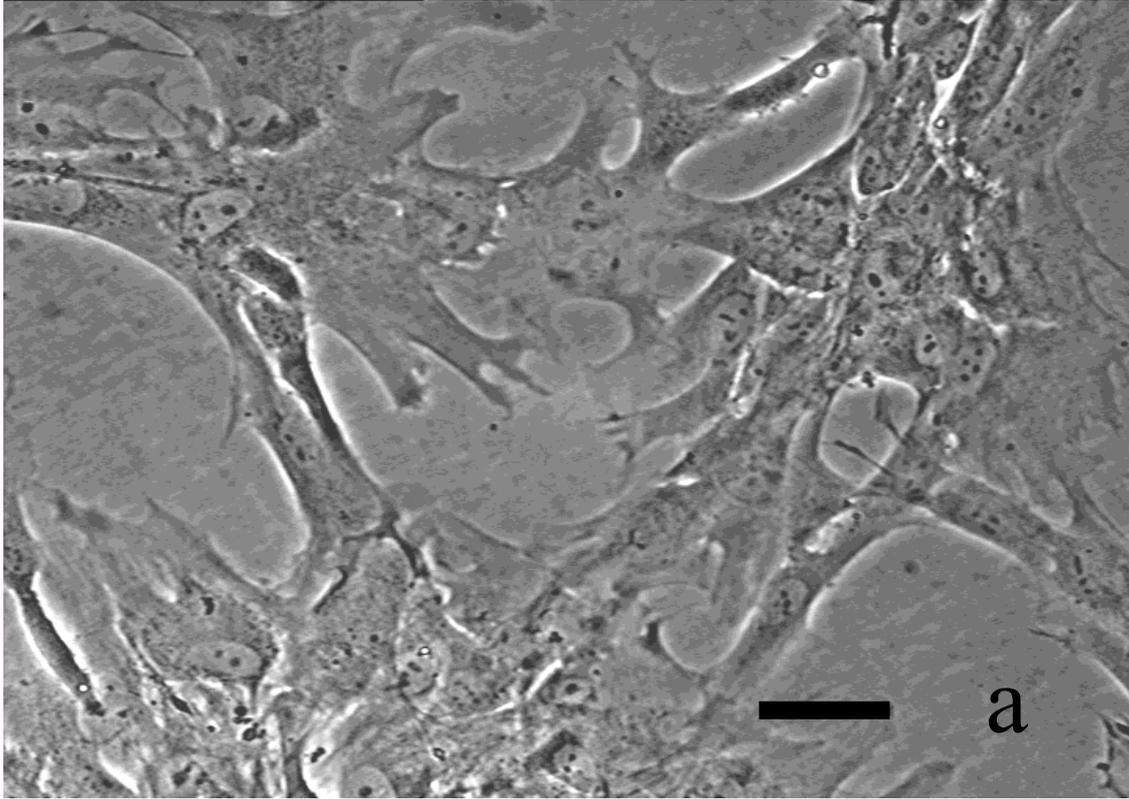
Abb. 3: Injektionsgebiet bei der stereotaktischen intrazerebralen Transplantation (aus Paxinos and Watson, 1986)

## **3. Ergebnisse:**

### **3.1 Zellkultivierung:**

Das humane hippocampale Gewebe wurde zunächst dissoziiert und in serumfreiem Medium kultiviert. Ein kleiner Anteil der sichtbaren Zellen adhärierte am Boden der unbeschichteten Zellkulturschalen. Nach Zugabe von 10% FCS-haltigem Medium begannen die Zellen zu proliferieren und es entstanden mehrere Kolonien von Zellen mit astrozytärer Morphologie auf drei verschiedenen Zellkulturschalen. Zellen der Passage 1 zeigten eine flache, spindelförmige Morphologie mit Ausbildung einzelner kurzer Fortsätze (vgl. Abb. 4a). Mit Zunahme der Passagenanzahl ergaben sich auch morphologische Veränderungen. So wiesen Zellen der Passage 4 größere, polygonale Zellkörper mit langen, dünnen Fortsätzen auf (vgl. Abb. 4b) und zeigten somit eine für protoplasmatische Typ 1 Astrozyten typische Morphologie (zur Übersicht Lee et al., 2000). Diese Charakteristika behielten die Zellen bis zum Ende ihrer Proliferation in Passage 12. Allerdings war das zuvor klare Zytoplasma in hohen Passagen oft von multiplen Vakuolen durchsetzt (vgl. Abb 4c). Es konnte in einer Proliferationsmessung gezeigt werden, dass die Zellen in Anwesenheit von 10% FCS im Medium die höchste Proliferation gegenüber verschiedenen anderen Medienbedingungen aufweisen (Abb. 12).

In frühen Passagen (1-3) konnten bei einer Passagierung etwa 600.000 Zellen aus der Zellkulturschale abgelöst werden. Die Zellen wurden dabei alle 7 bis 10 Tage passagiert. In mittleren Passagen (4-8) erhielt man etwa 450.000 Zellen, während in höheren Passagen lediglich ca. 250.000 Zellen abgelöst werden konnten. Durch verminderte Proliferation wurden die Zellen ab Passage 10 nur nach jeweils 4 Wochen passagiert. In Passage 12 stellten die Zellen ihre Proliferation komplett ein. Auf eine neue Zellkulturschale wurden jeweils 150.000 bis 200.000 Zellen ausgesät.



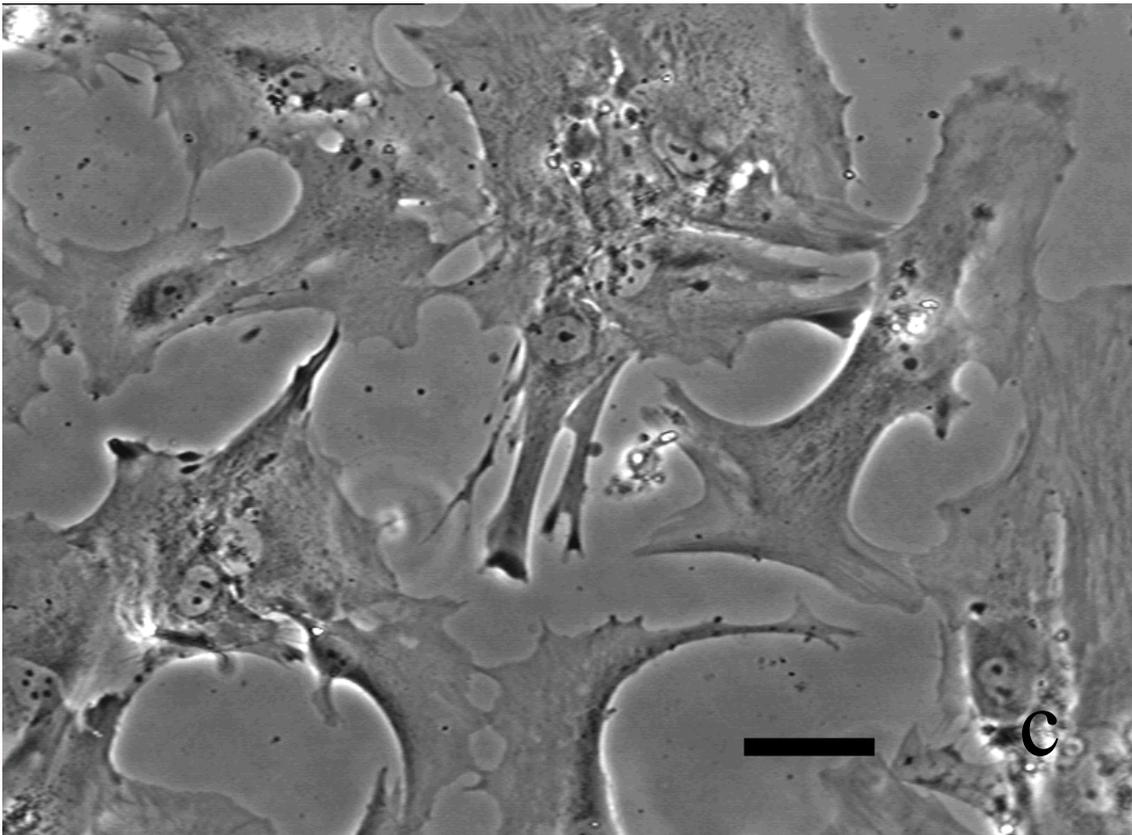


Abb. 4 Vitalmikroskopie in Phasenkontrast, Vergrößerung x 320, Skalierung 50  $\mu\text{m}$ .  
 a) Zellen der Passage 1 mit flacher, spindelförmiger Morphologie.  
 b) Zellen der Passage 4 mit polygonaler Morphologie und einzelnen langen, dünnen Fortsätzen.  
 c) Zellen der Passage 10 mit Auftreten zytoplasmatischer Vakuolen.

### **3.2 Ausplattierungseffizienz:**

Die Ausplattierungseffizienz wurde für Zellen der Passage 5 und Zellen der Passage 10 in 10% FCS haltigem Medium bestimmt. Dabei ergaben sich Werte von 34% (n=4) für Zellen der Passage 5 sowie 22 % (n=4) in Passage 10.

### **3.3 Immunfluoreszenzanalyse:**

Zur Charakterisierung der Zellen mittels Immunfluoreszenzanalyse wurden verschiedene astrozytäre (GFAP, S 100- $\beta$ ), oligodendrozytäre (O4, MBP) und neuronale Marker (MAP 2,  $\beta$ -III-Tubulin, NeuN) verwendet. Darüber hinaus wurden auch die Marker Vimentin, A2B5 und Nestin, die von Zellen mit glialem

Vorläufercharakter exprimiert werden (zur Übersicht: Cameron und Rakic, 1991), getestet.

GFAP: Während der gesamten Langzeitkultur ergab sich eine Immunpositivität von 100 % der Zellen für GFAP, was einen astrozytären Ursprung der Zellen nahe legt. Beim Vergleich zwischen Zellen der Passage 2 und 10 fällt auf, dass die filamentäre Anordnung des GFAP in Passage 10 deutlicher hervortritt (vgl. Abb. 5a und b). Die Abbildung 5 c und d zeigen Zellen der Passage 7 in Übersichts- (Abb. 5c) und Einzelansicht (Abb. 5d). Auch hier wird eine filamentöse Lokalisation ersichtlich, welche in Abbildung 5d besonders gut zur Geltung kommt. In einer Doppelfluoreszenzanalyse konnte die gemeinsame Positivität für GFAP und Vimentin bei Zellen der Passage 4 demonstriert werden (Abb. 5e und f).

S 100-β: Neben GFAP konnte auch für das astrozytäre neurotrophe Protein S 100-β eine Immunpositivität für 100 % der Zellen festgestellt werden. Auch hier zeigt sich eine filamentäre Assoziation des zytoplasmatischen Proteins (vgl. Abb. 6).

Vimentin: Ebenfalls zeigte sich eine Expression des Intermediärfilaments Vimentin (vgl. Abb. 7), welches sich typischerweise in immaturren Astrozyten findet (zur Übersicht: Cameron und Rakic, 1991). Die Immunpositivität wurde sowohl in frühen, als auch in späten Passagen mit filamentärer Zeichnung beobachtet.

Nestin: Der Vorläufercharakter der Zellen wird durch den Nachweis des Intermediärfilament Nestin unterstrichen. Die Abbildung 8 zeigt Zellen der Passage 2 in Übersichts- und Zellen der Passage 7 in Einzelansicht. In der Doppelfluoreszenzfärbung stellte sich heraus, dass Nestin positive Zellen ebenfalls positiv für den neuronalen Marker β-III-Tubulin waren (vgl. Abb. 8c und d).

β-III-Tubulin: Überraschenderweise stellte sich eine Immunpositivität für das neuronale Zytoskelettprotein β-III-Tubulin heraus. Die Expression war in frühen und späten Passagen zu beobachten. Morphologisch zeigt sich eine filamentäre Lokalisation (vgl. Abb. 9).

NeuN: Mit dem Kernprotein NeuN konnte die Expression eines weiteren neuronalen Markers nachgewiesen werden. Allerdings trat eine Expression nur in einer Subpopulation von Zellen auf, die zwischen 34 % (Passage 4, n = 500) und 50 % (Passage 11, n = 500) schwankte. Positive Zellen traten dabei stets geclustert auf und zeigten eine deutliche Kernlokalisierung des Markers. In Abbildung 10 a, b wird die Immunfluoreszenz von NeuN im Vergleich zu der Hoechst Dye Kernfärbung demonstriert. Die Abbildungen 10 c, d, e zeigen eine Doppelimmunfluoreszenz der

Marker  $\beta$ -III-Tubulin (Abb. 10e), NeuN (Abb. 10d) sowie eine Kernfärbung mit Hoechst Dye (Abb. 10c). Die Aufnahme wurde in einem Cluster von NeuN-positiven Zellen angefertigt. Durch Pfeile sind exemplarisch einige Zellen mit Expression von NeuN und  $\beta$ -III-Tubulin gekennzeichnet.

Weitere Marker: Die Zellen waren immunnegativ für das neuronale Protein MAP 2, die oligodendroglialen Marker O4 und MBP sowie für A2B5, welches als Glykokonjugat auf der Oberfläche von O-2A Vorläuferzellen und Typ 2 Astrozyten exprimiert wird (Raff et al., 1983).

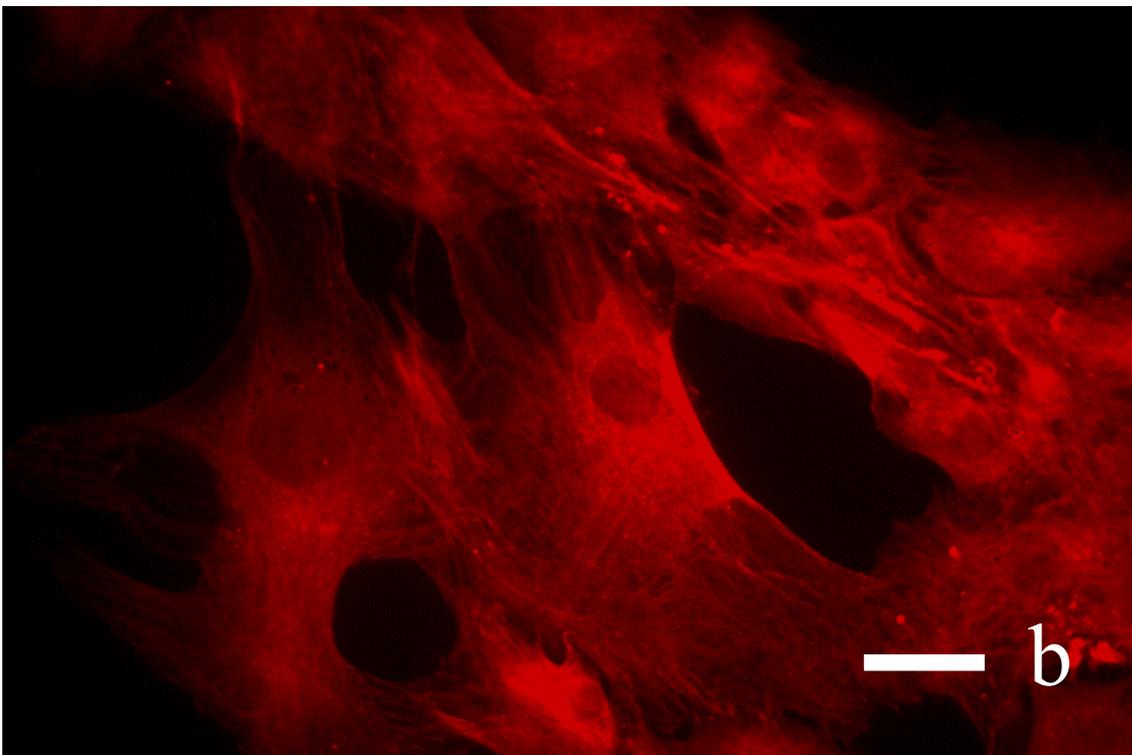
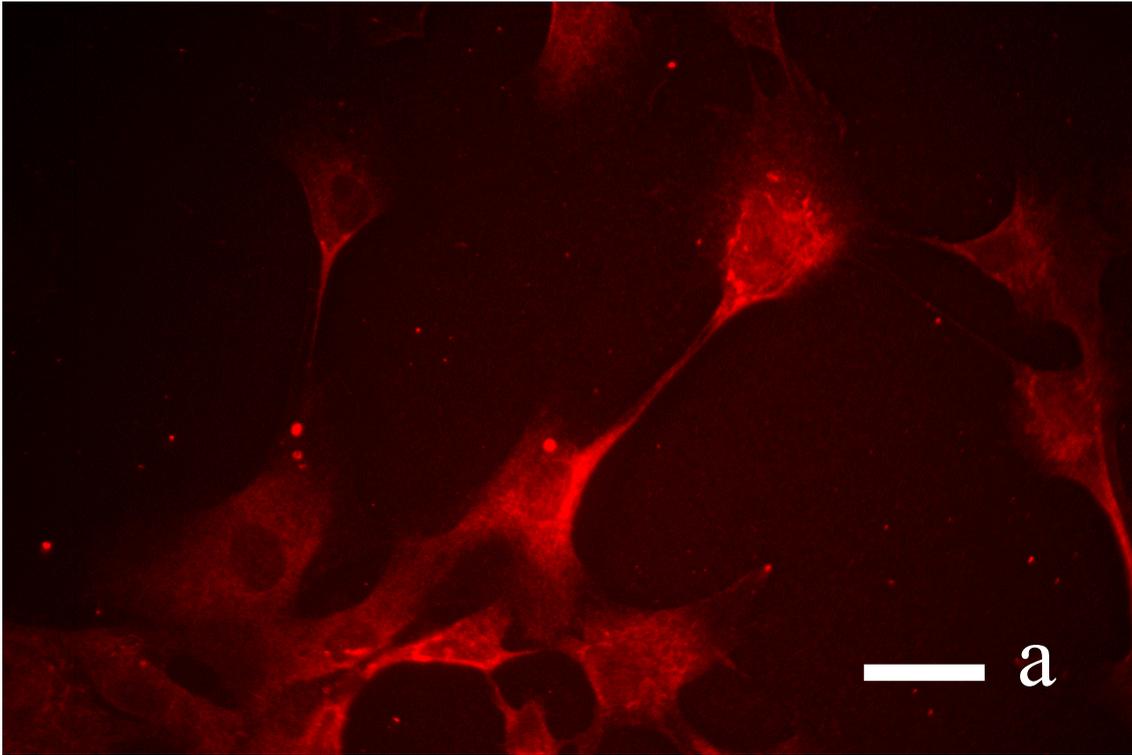


Abb. 5 GFAP Immunfluoreszenz, Vergrößerung x 630, Skalierung 20 $\mu$ m.

a) Passage 2.

b) Passage 10 mit deutlicher filamentärer Lokalisation.

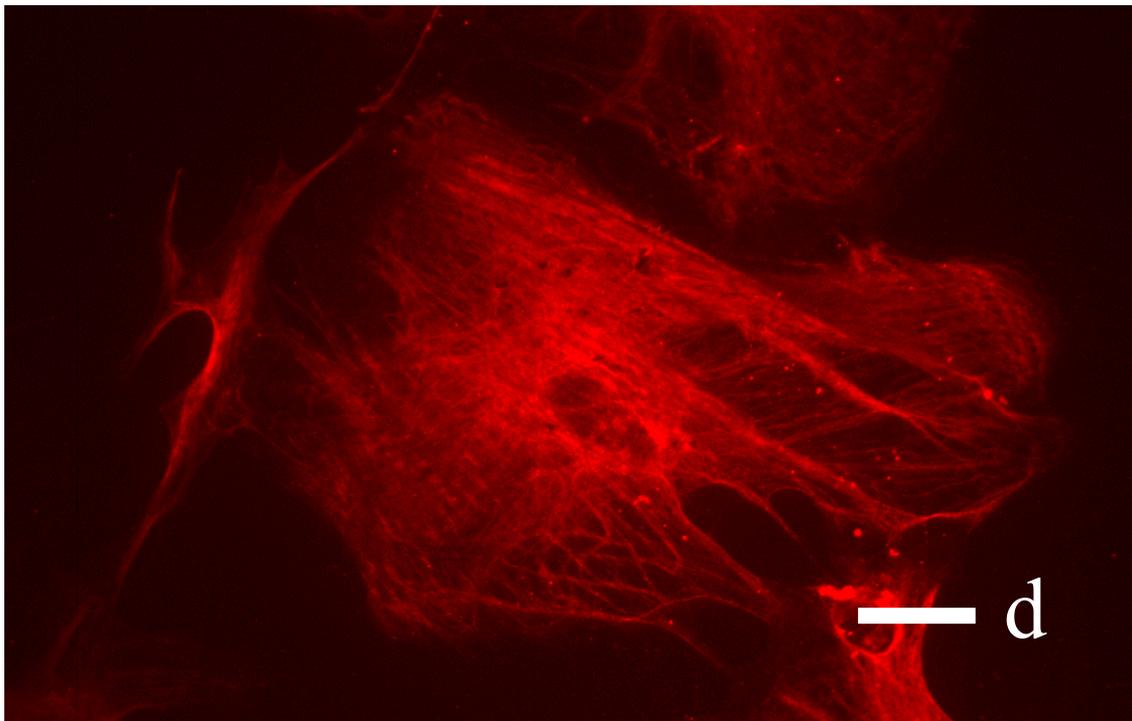
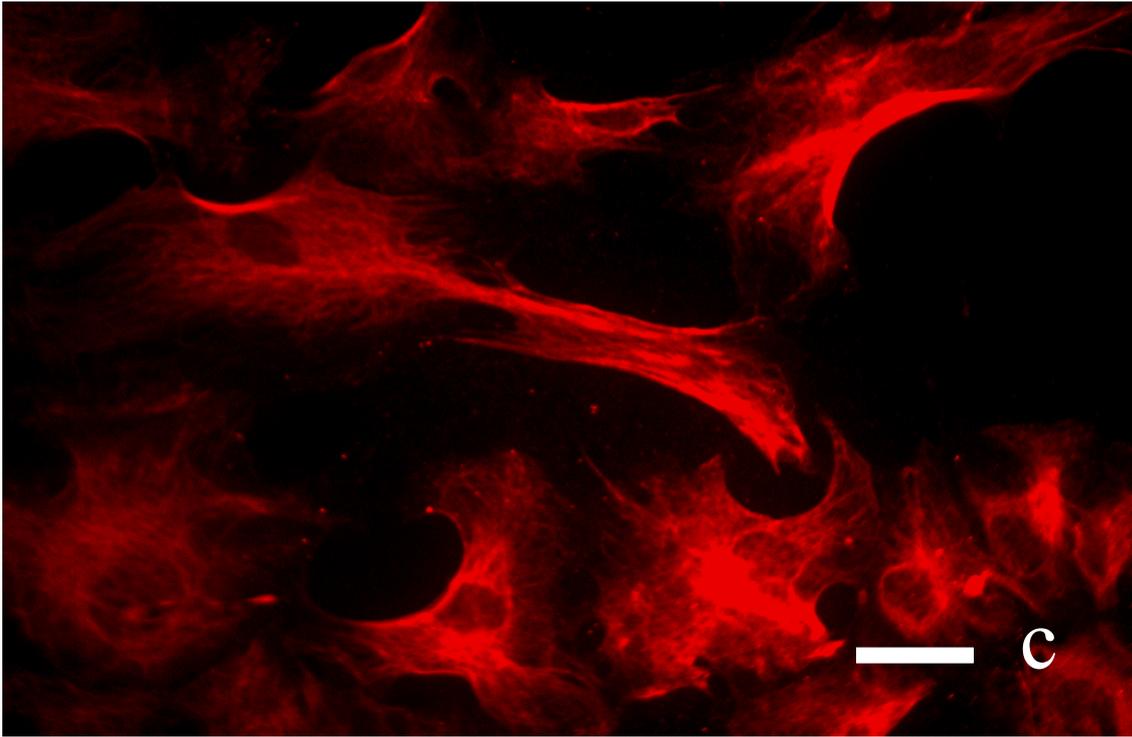


Abb. 5 GFAP Immunfluoreszenz, Vergrößerung x 630, Skalierung 20µm.  
c) Passage 7, Übersicht auf mehrere Zellen.  
d) Passage 7, Zelle mit deutlicher filamentärer Lokalisation.

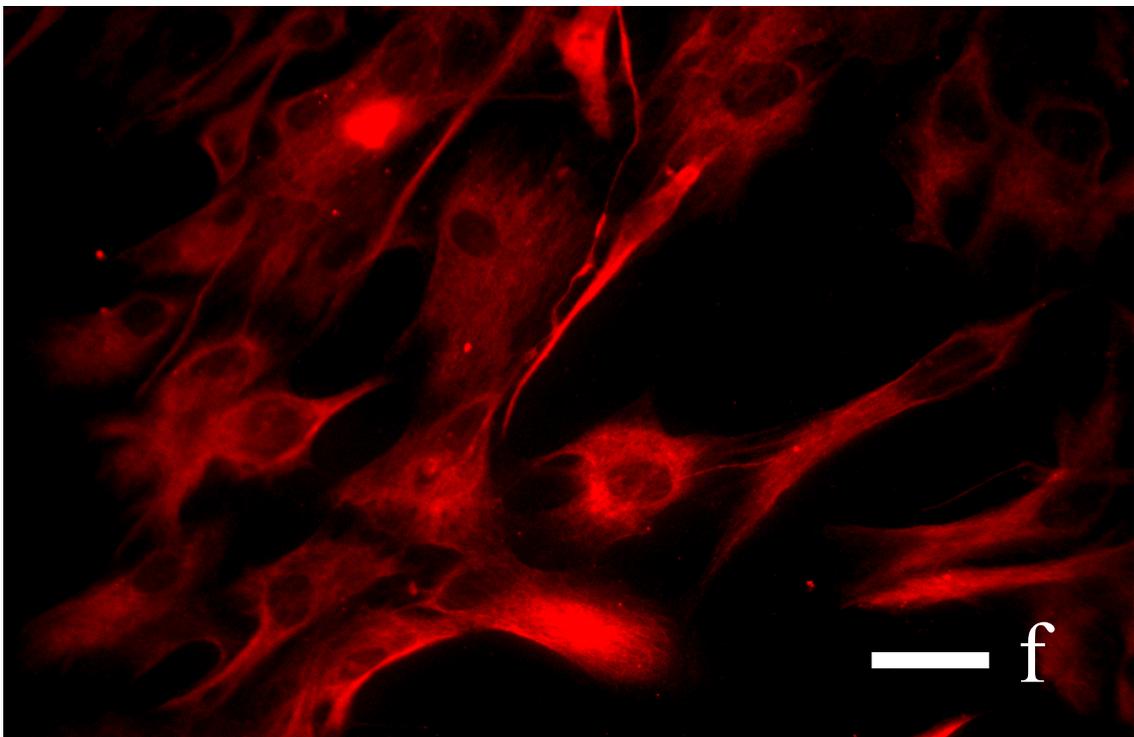
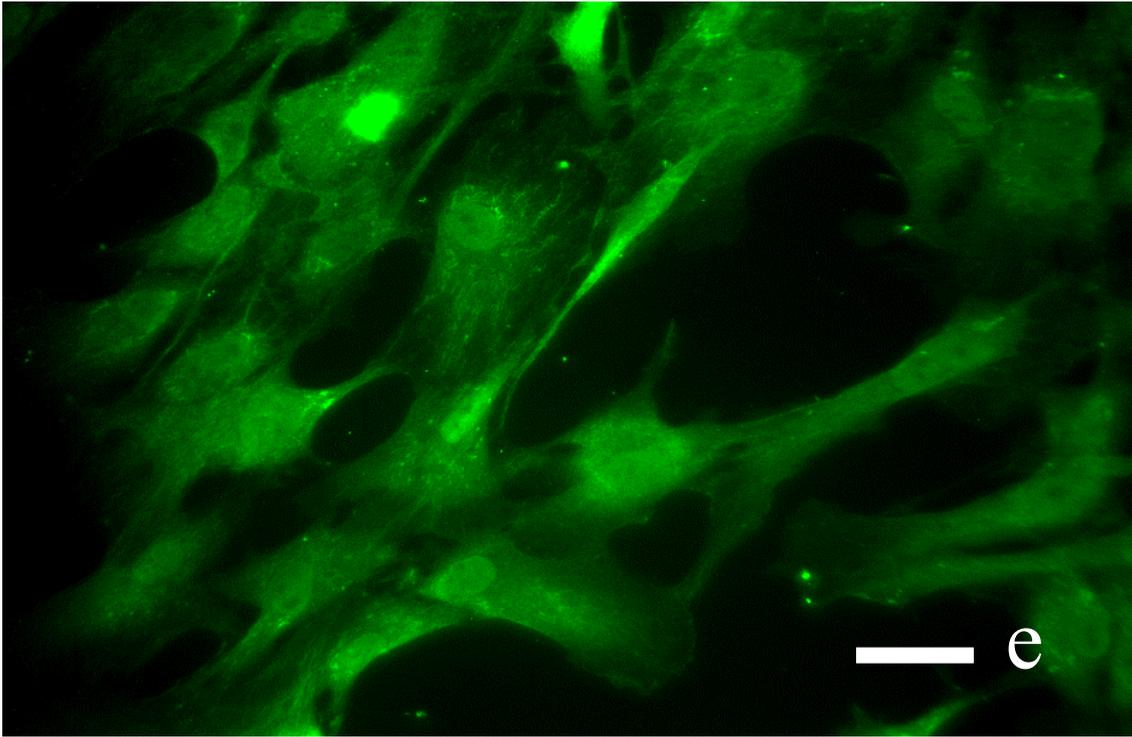


Abb. 5 Doppelimmunfluoreszenz GFAP (grün) und Vimentin (rot), Vergrößerung x 630, Skalierung 20µm.  
e) Passage 4, GFAP (grün).  
f) Passage 4, Vimentin (rot).

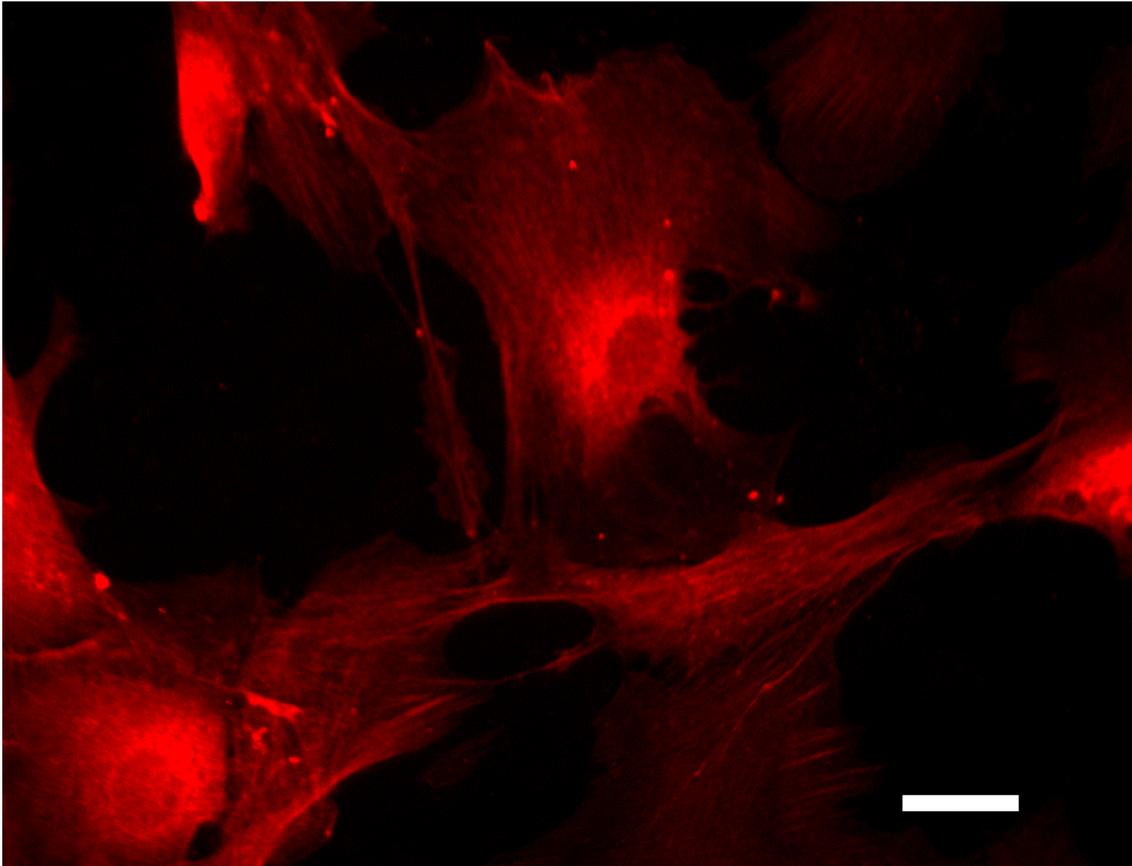


Abb. 6 S 100- $\beta$  Immunfluoreszenz in Passage 7 mit filamentärer Anordnung, Vergrößerung x 630, Skalierung 20  $\mu$ m.

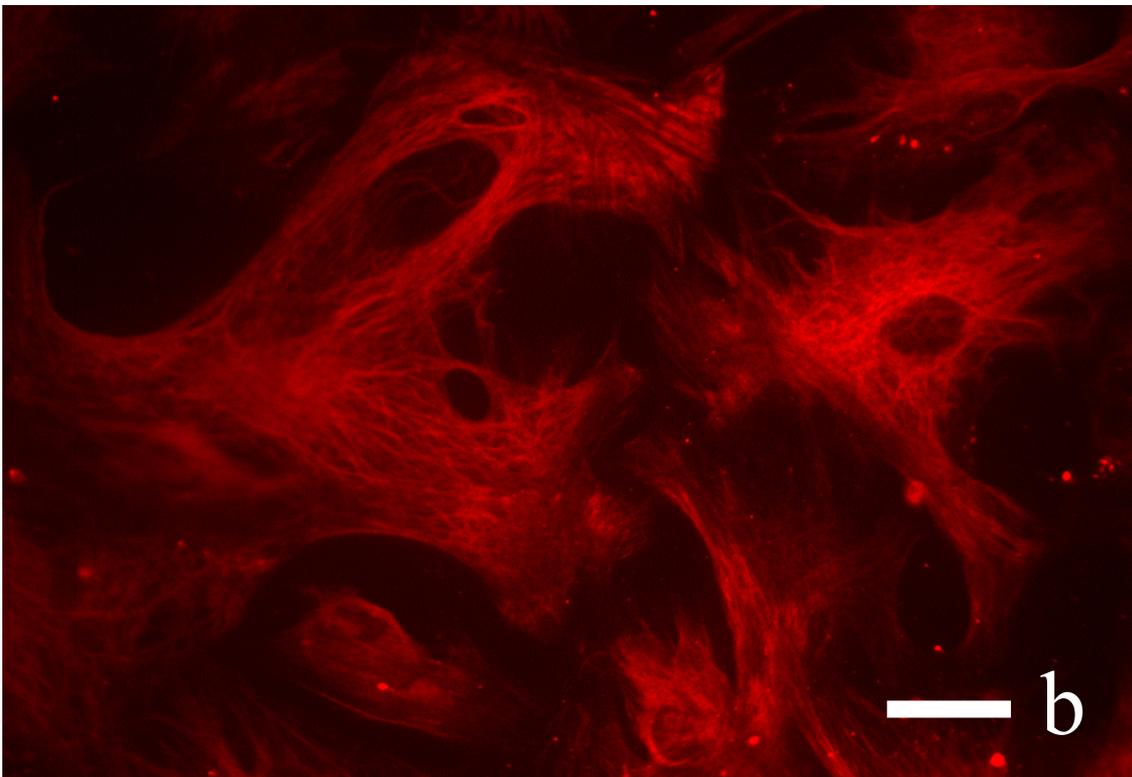
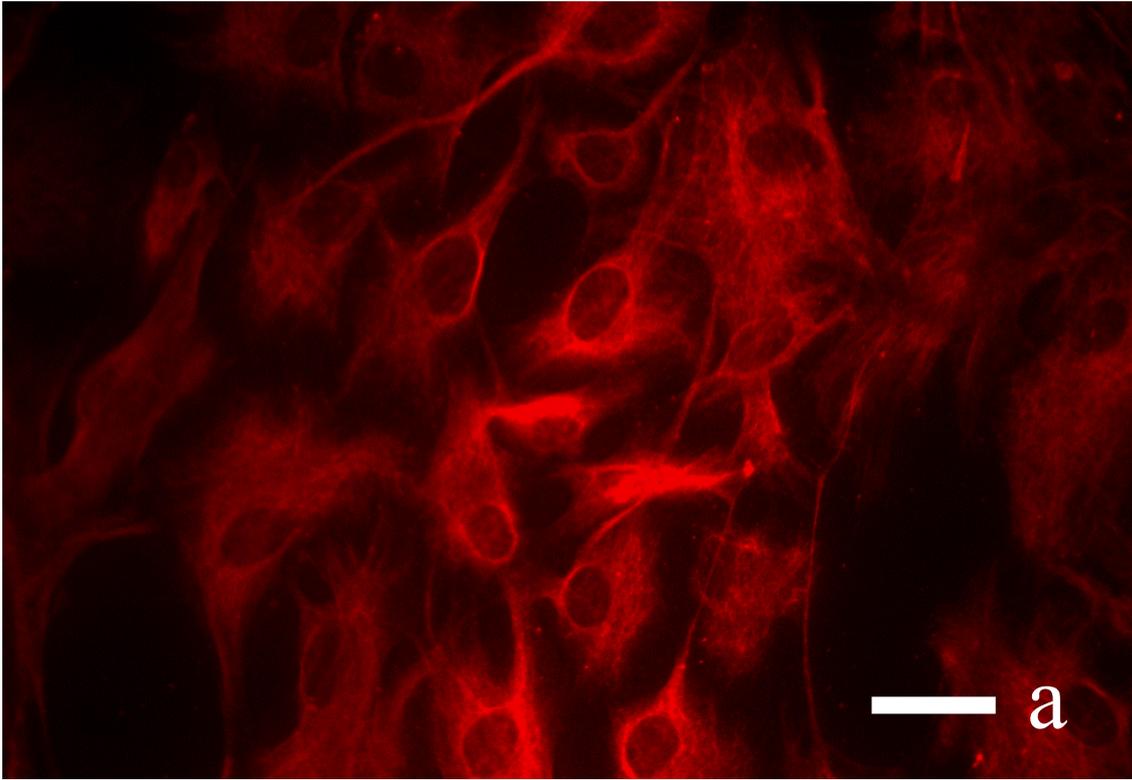


Abb. 7 Vimentin Immunfluoreszenz, Vergrößerung x 630, Skalierung 20  $\mu\text{m}$ .  
a) Passage 4.  
b) Passage 8.

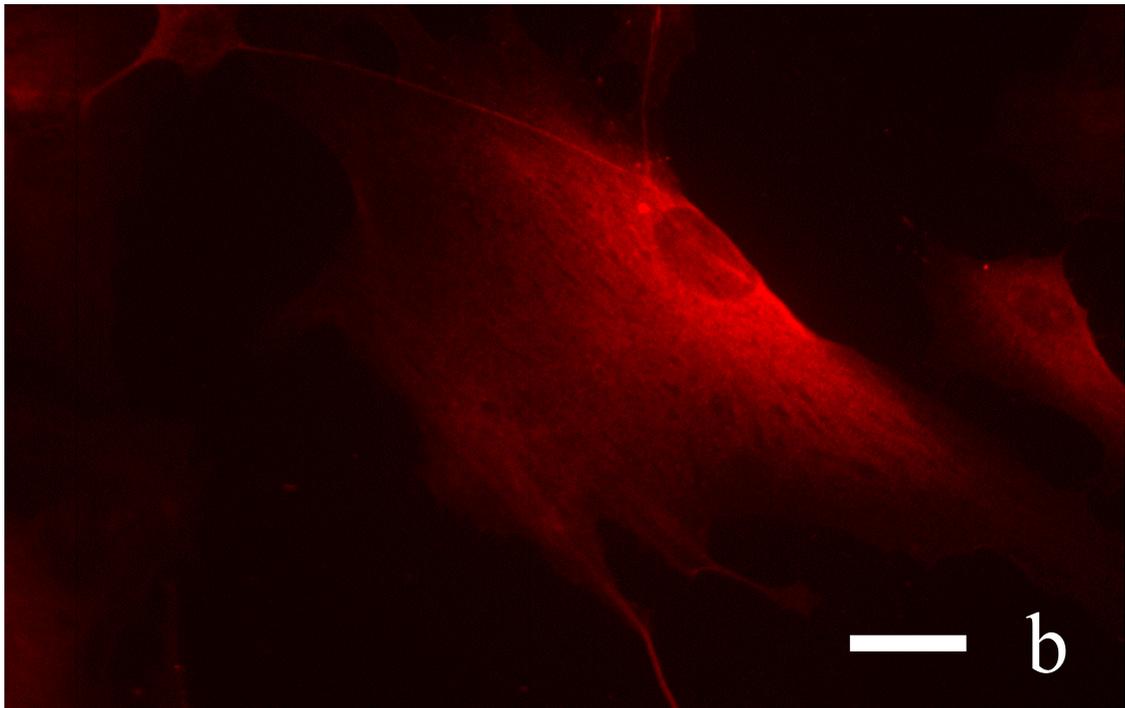
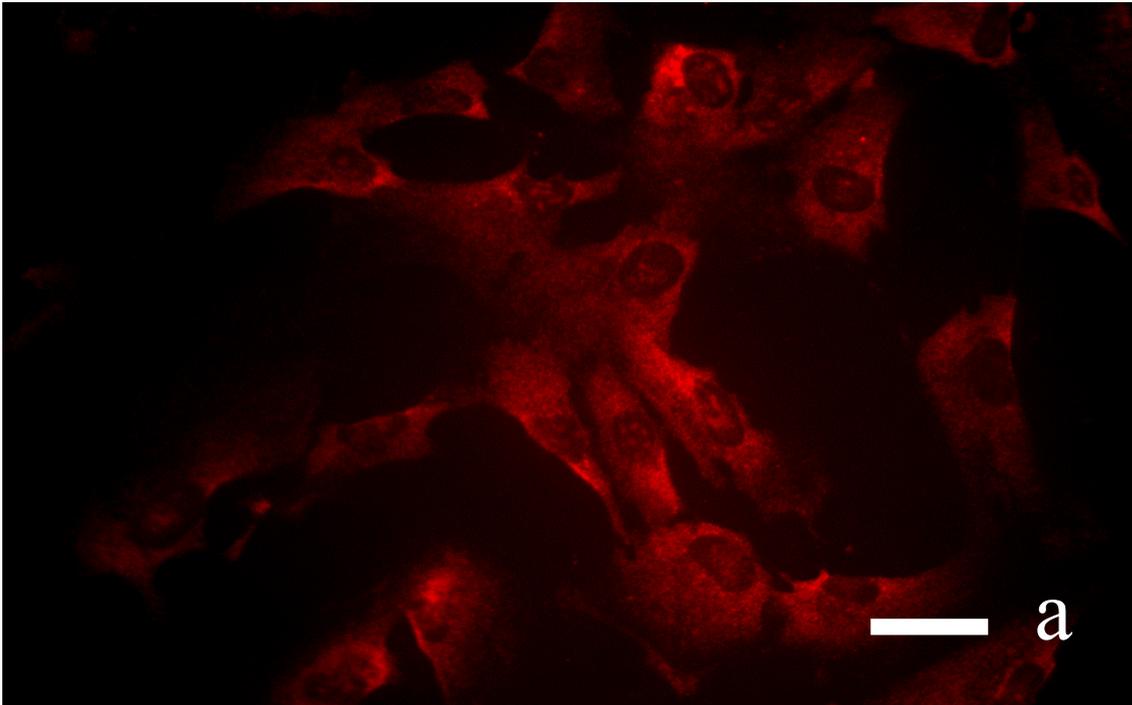


Abb. 8 Nestin Immunfluoreszenz, Vergrößerung x 630, Skalierung 20  $\mu\text{m}$ .  
a) Passage 2.  
b) Passage 7.

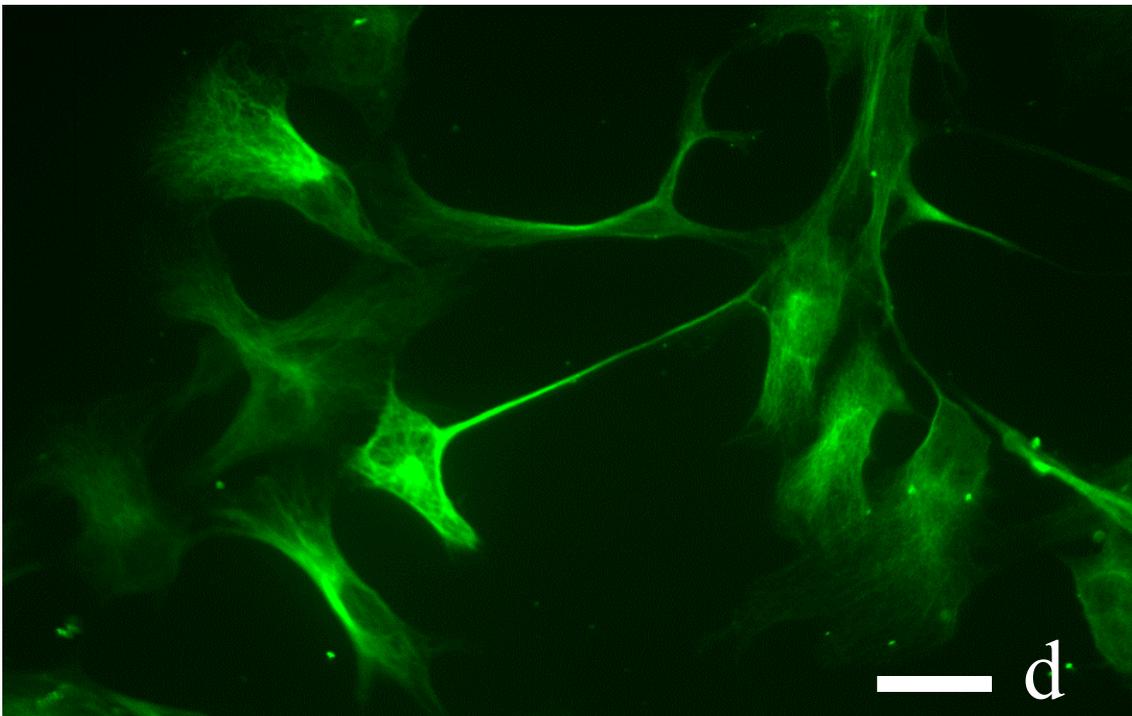
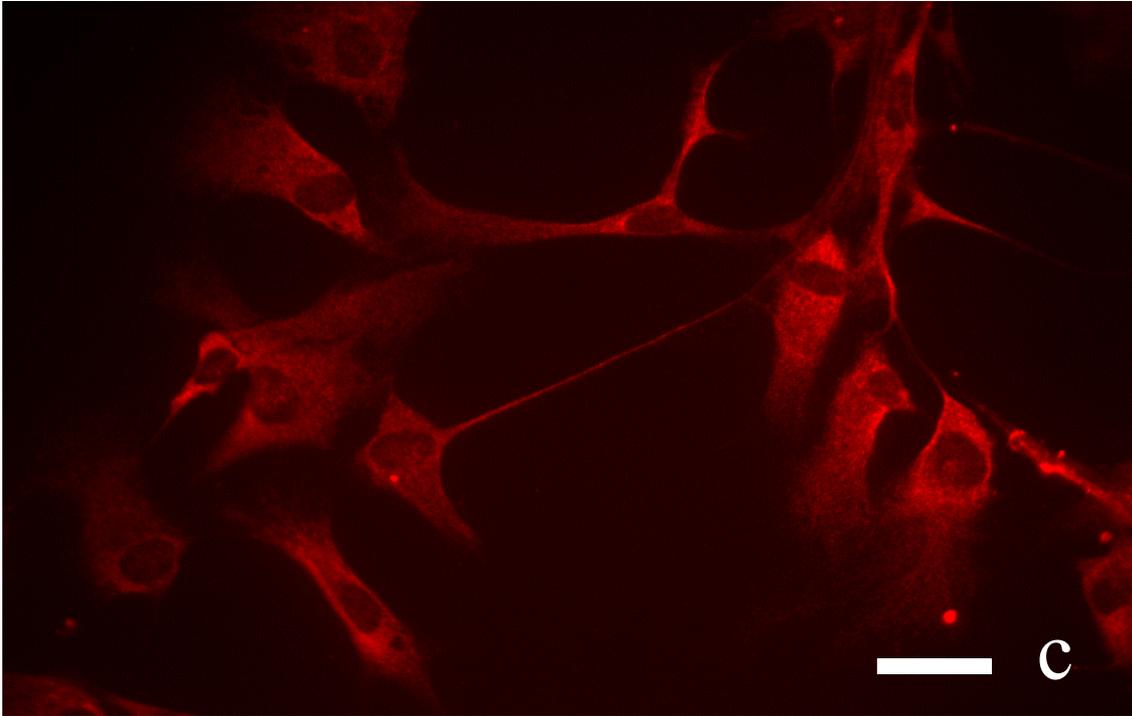


Abb. 8 Doppelimmunfluoreszenz Nestin (rot) gegen  $\beta$ -III-Tubulin (grün),  
Vergrößerung x 630, Skalierung 20  $\mu$ m.  
c) Passage 4, Nestin.  
d) Passage 4,  $\beta$ -III-Tubulin.

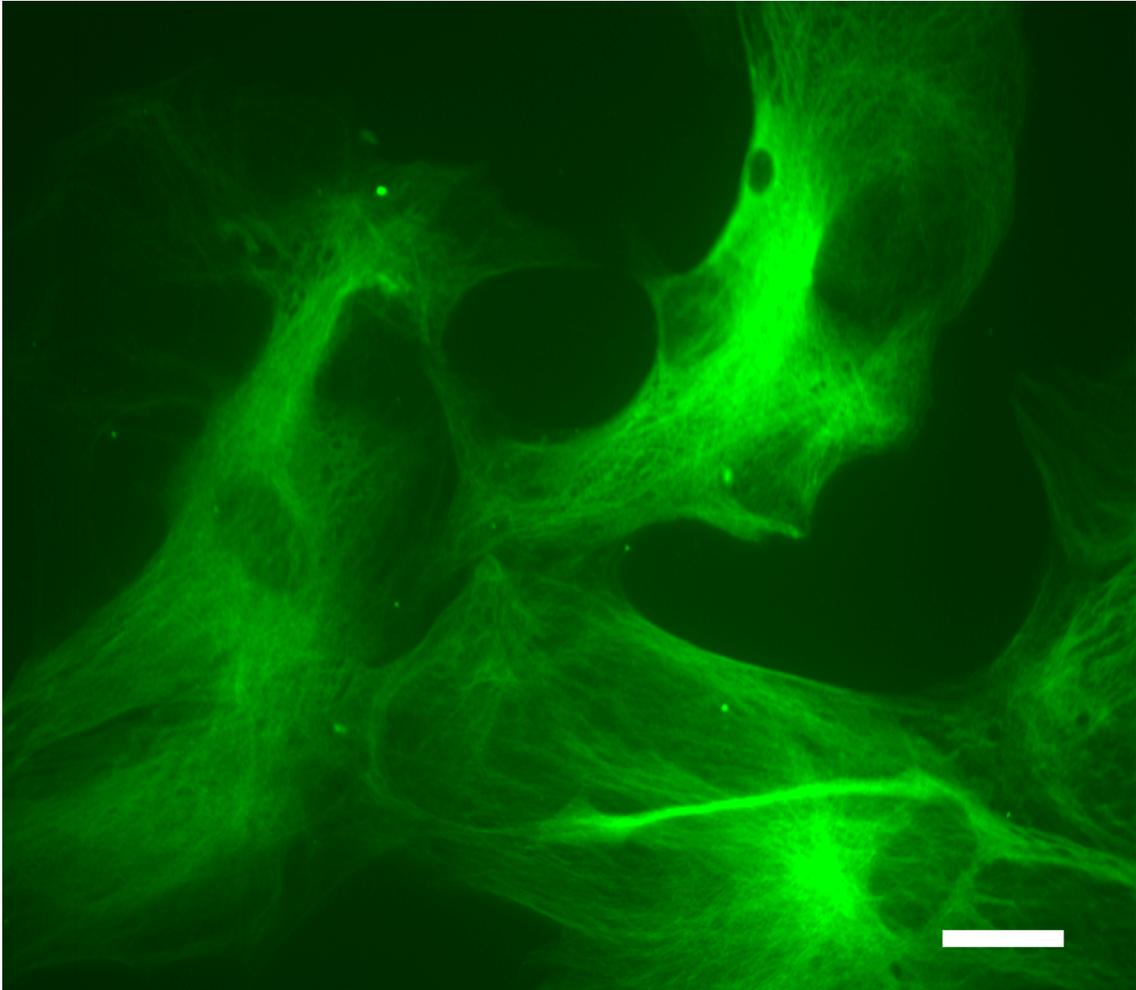


Abb. 9  $\beta$ -III-Tubulin Immunfluoreszenz in Passage 11, Vergrößerung x 630, Skalierung 20  $\mu$ m.

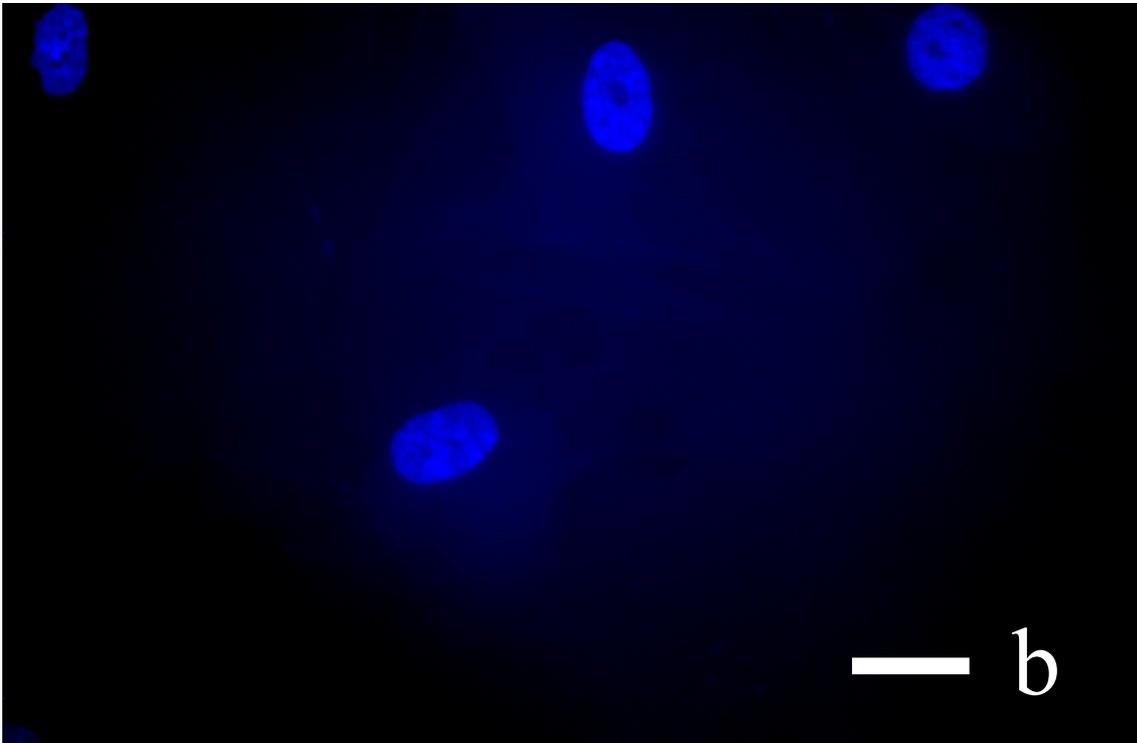
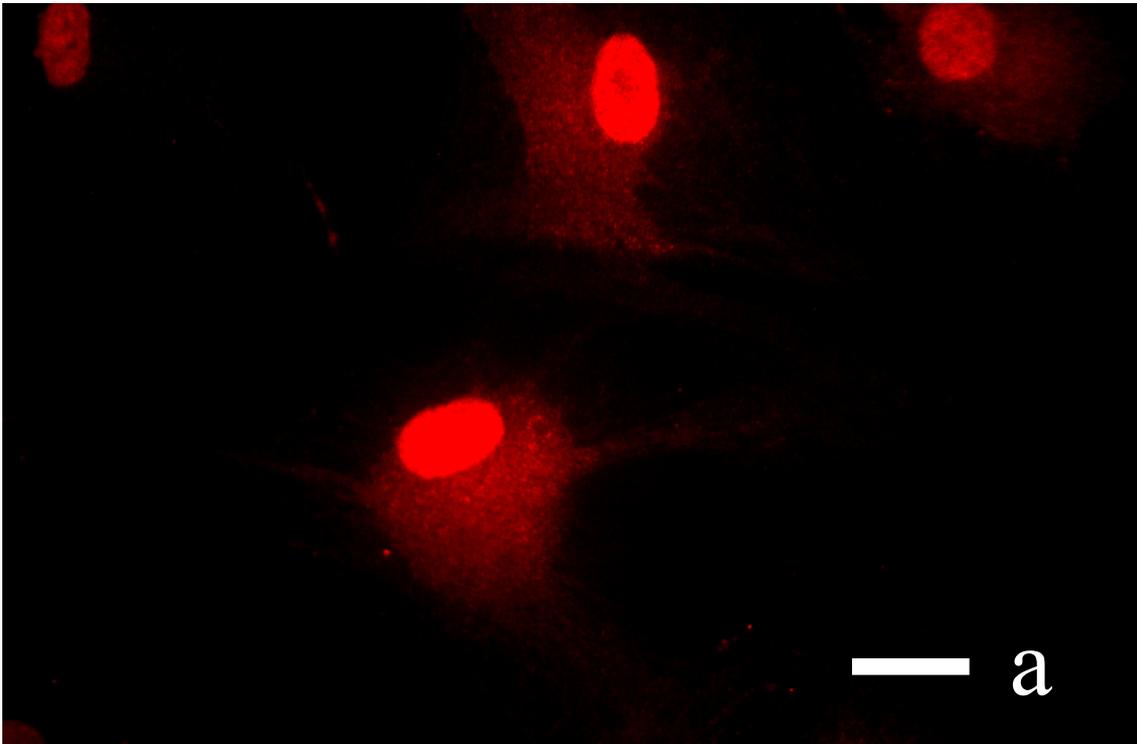


Abb. 10 NeuN Immunfluoreszenz, Vergrößerung x 630, Skalierung 20  $\mu\text{m}$ .  
a) Passage 11 mit NeuN Immunfluoreszenz bei maximaler Vergrößerung.  
b) Passage 11 mit Färbung des selben Zellen mit dem Kernfärbstoff Hoechst Dye.

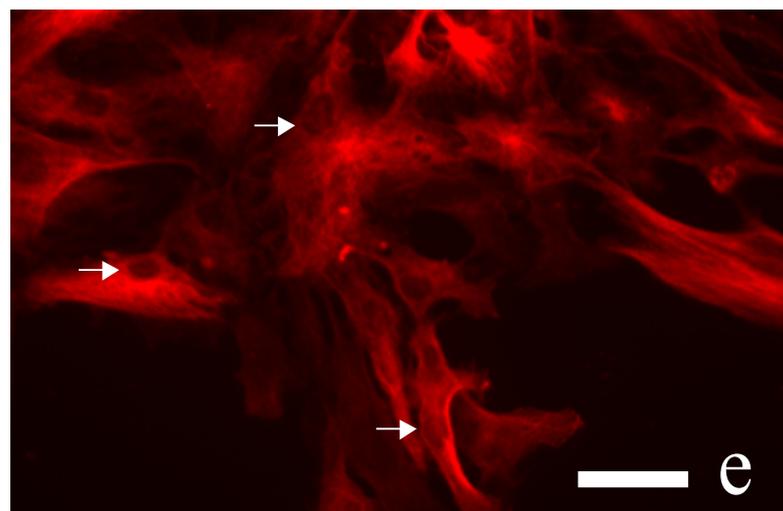
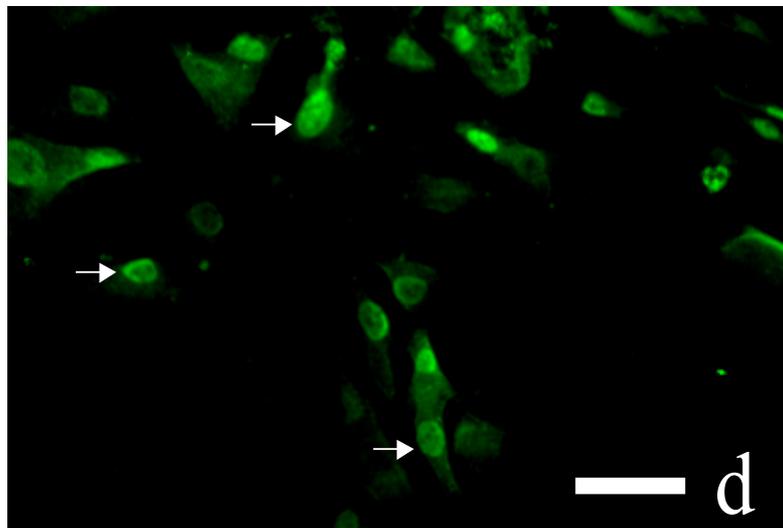
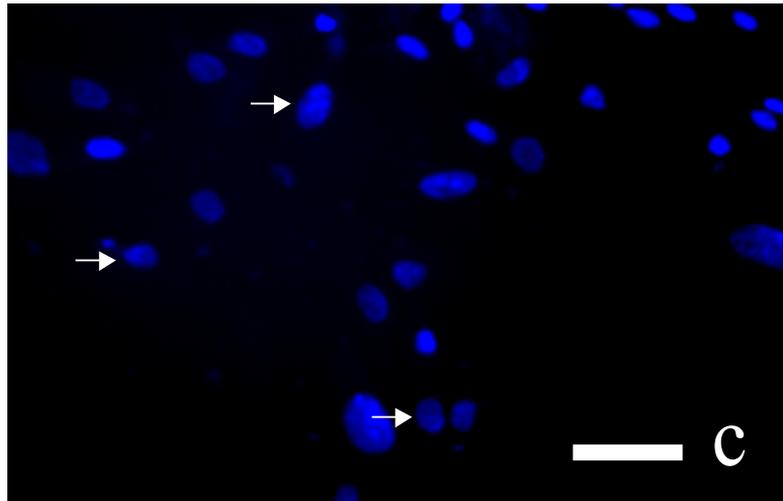
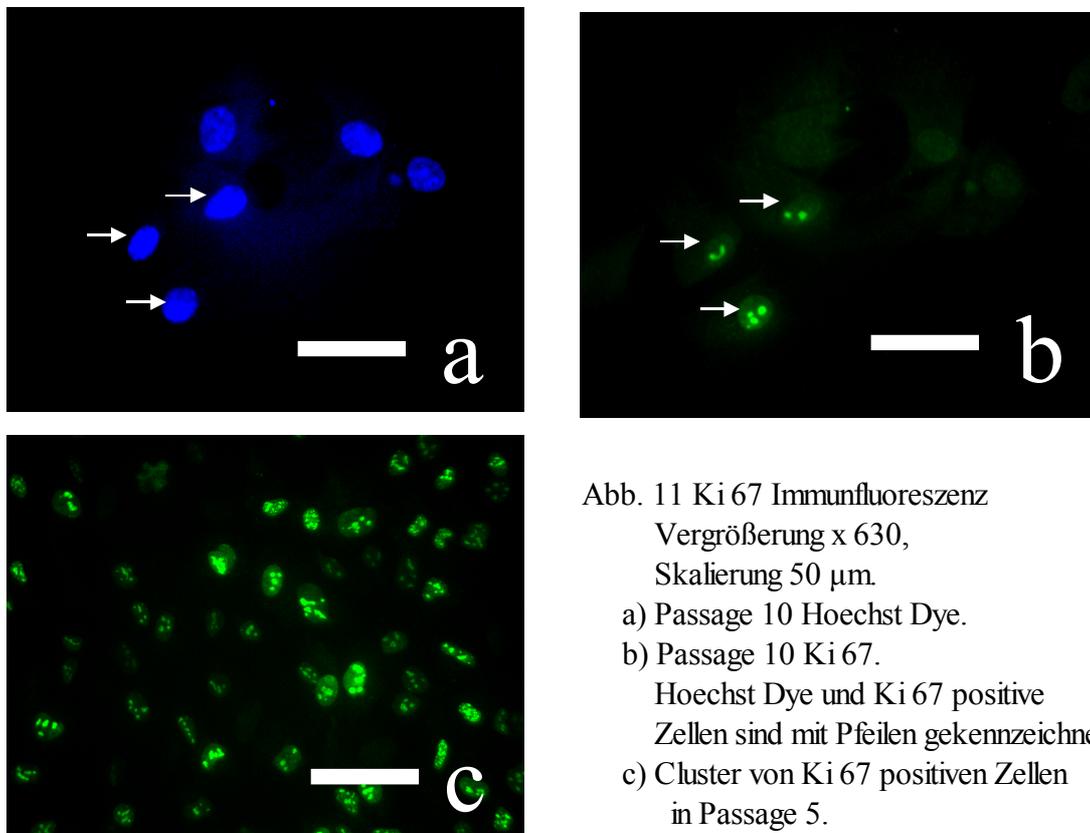


Abb. 10 Doppelimmunfluoreszenz NeuN und  $\beta$ -III-Tubulin sowie Kernfärbung Hoechst Dye  
 Vergrößerung x 400, Skalierung 50  $\mu$ m.  
 c) Hoechst Dye Kernfärbung. d) NeuN Immunfluoreszenz.  
 e)  $\beta$ -III-Tubulin Immunfluoreszenz.  
 Beispiele für doppelpositive Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet..

### 3.4 Proliferation:

Der Anteil der proliferierenden Zellen wurde durch die Immunfluoreszenzanalyse des Ki-67 Proteins bestimmt, das in der G1, S und der G2 Phase des Zellzyklus exprimiert wird (Gerdes, 1990). Dabei stellte sich heraus, dass die Ki 67 positiven Zellen oft geclustert auftreten (vgl. Abb. 11). In Passage 5 zeigten sich 13 % der Zellen immunpositiv für Ki 67 (n = 150), wobei sich der Anteil bis zur Passage 10 auf 6 % (n = 150) verringerte, was mit der verlängerten Generationszeit der Zellen in hohen Passagen vereinbar ist.



Die Generationszeit der Zellen lag in mittleren Passagen (4-7) bei 36 bis 40 Stunden und verlangsamte sich in höheren Passagen auf mehrere Tage bis die Zellen in Passage 12 ihre Proliferation endgültig einstellten. Die humanen Astrozytenvorläufer konnten in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert werden. Nach dem Auftauen konnten die Zellen über mehrere Passagen weitergeführt werden. Allerdings war die Proliferationskapazität nach dem Auftauen herabgesetzt, wodurch sich die Generationszeit in mittleren Passagen auf 45 bis 50 Stunden verlängerte.

Um eine möglichst hohe Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen sicherzustellen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Proliferation in Anwesenheit von FCS, EGF und bFGF in Passage 6 untersucht (vgl. Abb. 12). Dazu wurde der „CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ angewendet. Grundlage dieses Tests ist die Umsetzung von Tetrazolium (Owen`s Reagenz) in den Farbstoff Formazan durch NADPH oder NADH, welche von metabolisch aktiven Zellen produziert werden. Die Farbstoffkonzentration ist somit proportional zur Anzahl der vorliegenden Zellen. Durch Absorptionsmessung bei 490 nm kann nachfolgend die Zellzahl bestimmt werden. Es stellte sich heraus, dass alle Faktoren auf die humanen Astrozytenvorläufer mitogenen Einfluss haben. Die höchste Proliferationsgeschwindigkeit wurde in Gegenwart von 10% FCS (Abb. 12 A) gemessen. Nach einer Wachstumszeit von 120 Stunden war die absolute Zellzahl unter 10% FCS um 38% höher als unter bFGF (Abb. 12 C) oder EGF (Abb. 12 D) ( $p < 0,05$ ). Beim kombinierten Einsatz von EGF und bFGF (Abb. 12 E) waren es dagegen nur noch 27 % (nicht signifikant). Beim Vergleich von Zellen der Passage 6 und Passage 10 (Abb. 12 B) in jeweils 10 % FCS haltigem Medium zeigte sich eine erwartungsgemäß verminderte Proliferation der Zellen der Passage 10. So war die Absorption bei 490 nm als Maß für die absolute Zellzahl nach einer Kultivierung von 120 Stunden in Passage 6 um 280 % gegenüber Passage 10 erhöht ( $p = 0,001$ ).

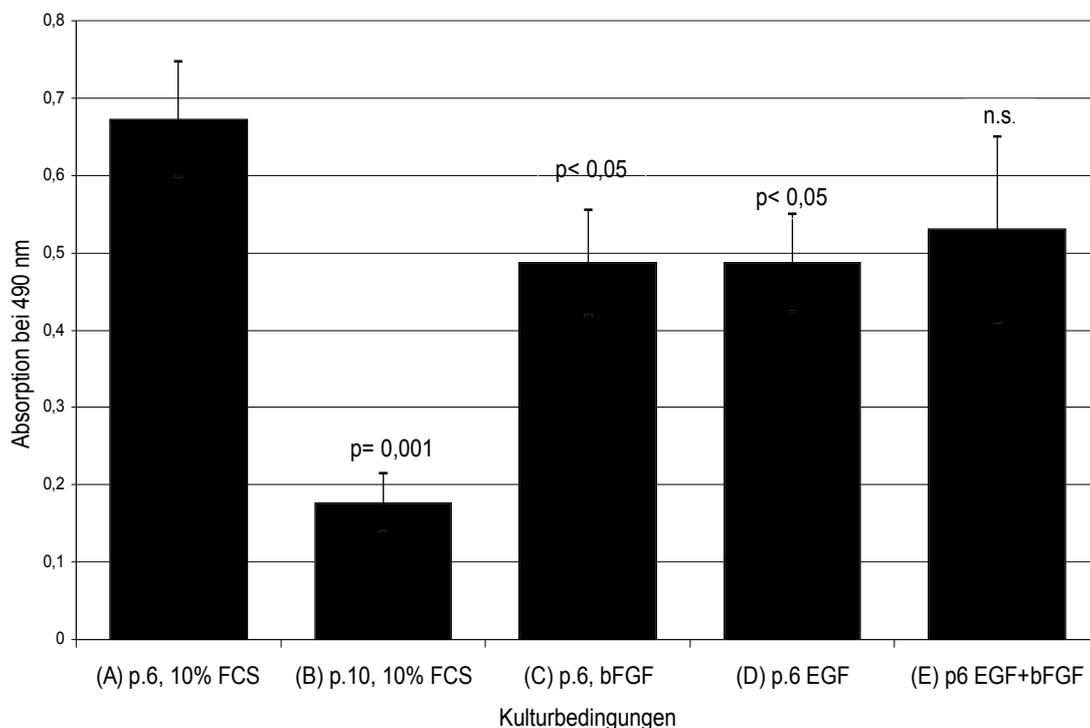


Abb. 12 Proliferation unter verschiedenen Kulturbedingungen.

### **3.5 Sekretion neurotropher Faktoren:**

Mittels der ELISA Technik konnte eine Sekretion der Neurotrophen Faktoren NGF und BDNF gemessen werden. Die Faktoren GDNF und NT3 ließen sich nicht im Überstand nachweisen. Die Sekretionsleistung betrug für NGF  $36,2 \pm 12,7 \text{ pg} / 10^5$  Zellen in 24 h (Mittelwert +/- Standardabweichung, n=5) und für BDNF  $16,7 \text{ pg} \pm 4,1 / 10^5$  Zellen in 24 h (Mittelwert +/- Standardabweichung, n=6). Beim Vergleich verschiedener Passagen und Kulturbedingungen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

### **3.6 Chromosomenfärbung:**

Um Hinweise auf eine mögliche Transformation der Zellen durch die Zellkulturbedingungen zu erhalten, wurde eine Giemsa Chromosomenfärbung durchgeführt. Diese ergab den normalen diploiden Satz aus 23 Chromosomen (vgl. Abb. 13). Die Untersuchung wurde an Zellen der Passagen 6 und 10 vorgenommen.

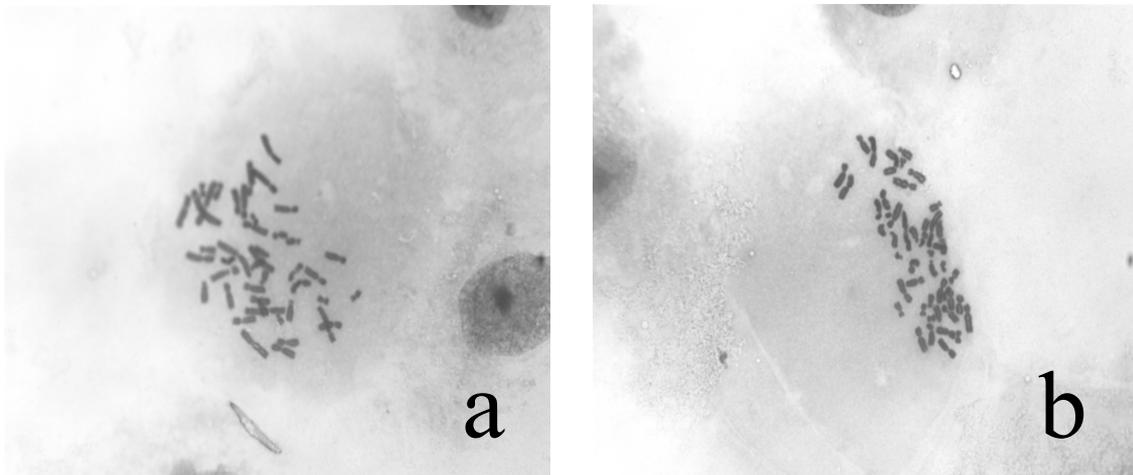


Abb. 13 Chromosomenfärbung, Vergrößerung x 630.

a) Passage 6.

b) Passage 10.

### **3.7 Transduktion:**

Um zu bestimmen, ob humane Astrozytenvorläufer ein geeignetes Vehikel für Transgene sind, wurden die Zellen mit einem high capacity Adenovirusvektor, der EGFP unter Kontrolle des humanen Cytomegalieviruspromotors (Dinser et al., 2001) exprimiert (Abb. 2). Der Anteil der transduzierten Zellen wurde durch Auszählung der Zellen mit Hilfe der Hoechst-Dye Kernfärbung bestimmt (vgl. Abb. 14). Dies ergab eine Transduktionsrate von 71% (n=500). Die Expressionsstärke des EGFP variierte unter den Zellen, wobei 36% der Zellen eine sehr starke EGFP-Fluoreszenz zeigten.

### **3.8 Transplantation:**

Um eine Transformation der Zellen auszuschließen, wurden EGFP-transduzierte und nicht transduzierte Astrozytenvorläufer stereotaktisch in das Striatum von Nacktmäusen und Nacktratten transplantiert. Nach zwei bzw. drei Monaten wurden die Gehirne der Empfängertiere perfusionsfixiert. Während im Striatum der Wistar Ratten keine grünfluoreszierenden Zellen nachweisbar waren, konnten in den Nackttieren transplantierte Zellen anhand ihrer Fluoreszenz im Striatum erkannt werden und zeigten eine typische astrozytäre Morphologie (vgl. Abb. 15). Im gesamten übrigen Gehirn waren keine weiteren grün fluoreszierenden Zellen zu finden. Dies belegt, dass keine Migration der transduzierten Zellen in andere Gehirnareale stattgefunden hat. Bei makroskopischer und mikroskopischer Betrachtung der Gehirne waren keine Anzeichen für eine Tumorformation zu finden. Die Tiere zeigten im Zeitraum zwischen Transplantation und Perfusionsfixation keinerlei Verhaltensabnormitäten oder krankhafte Veränderungen.

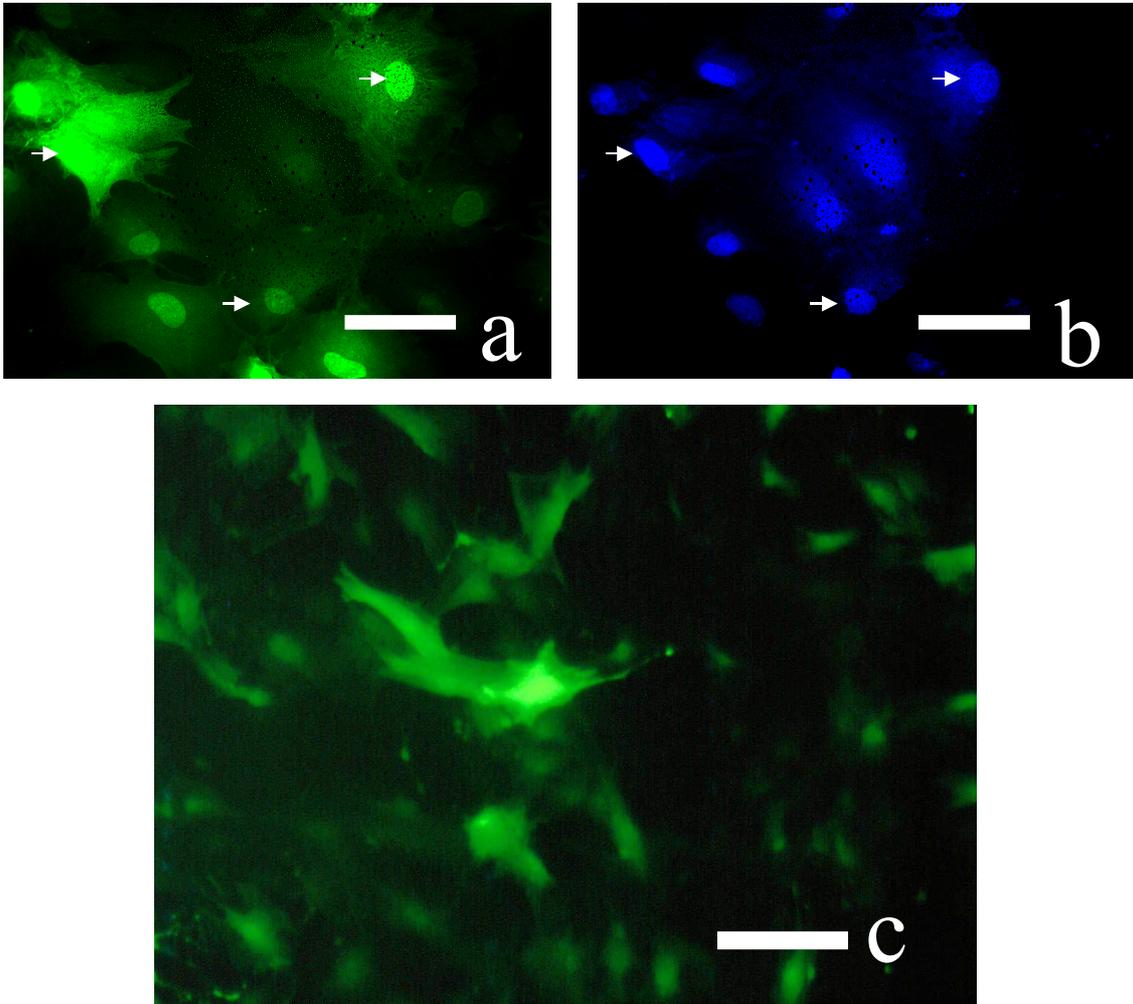


Abb. 14 EGFP Fluoreszenz Vergrößerung 630, Skalierung 50µm.

- a) Passage 4, EGFP-Fluoreszenz.
- b) Passage 4, Hoechst Dye Beispiele für EGFP positive Zellen sind durch Pfeile markiert.
- c) Passage 4, Vitalaufnahme mit EGFP Fluoreszenz, Vergrößerung x 320, Skalierung 75 µm.

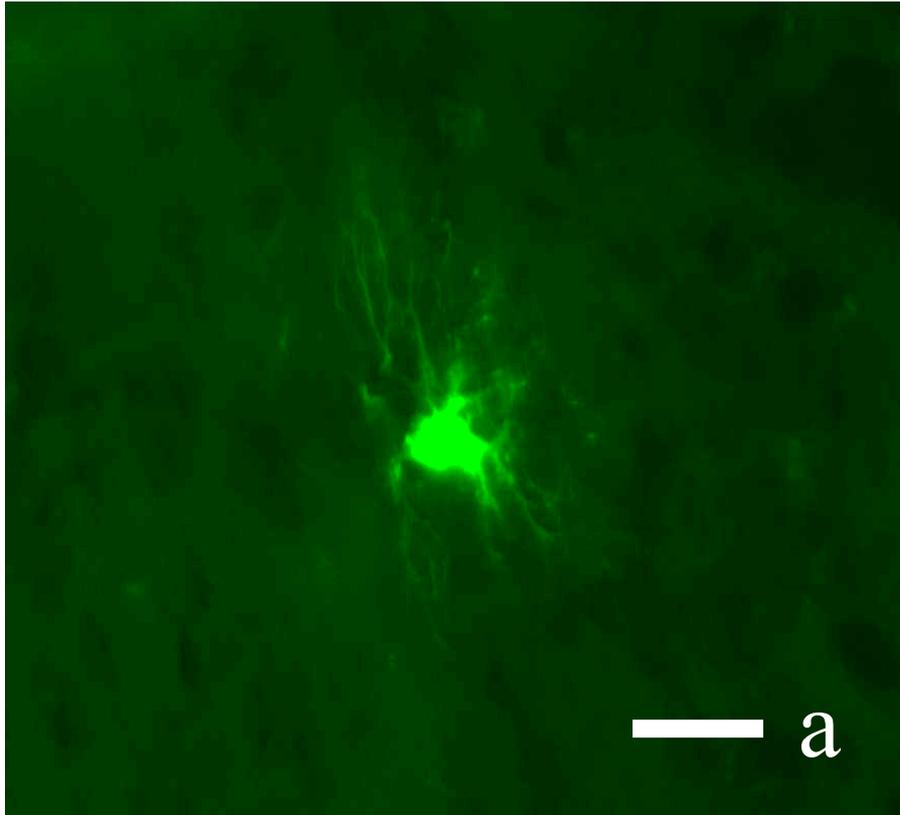


Abb. 15 a) EGFP positive Zelle nach Transplantation ins Striatum einer Nacktratte mit typischer astrozytärer Morphologie. Vergrößerung x 630, Skalierung 20  $\mu\text{m}$ .

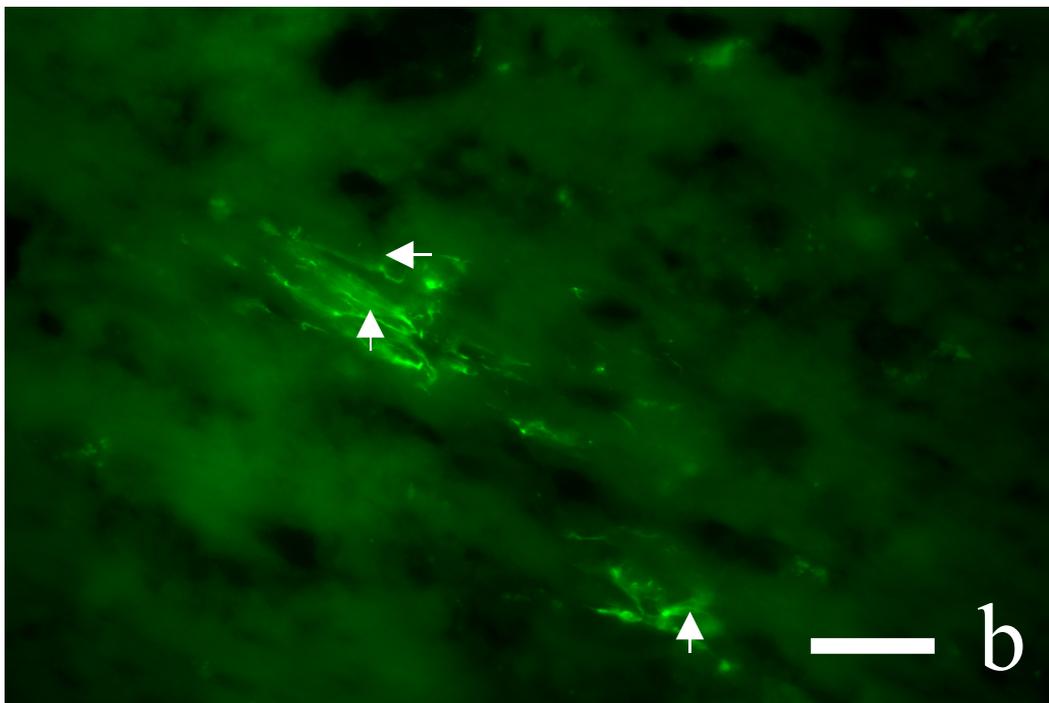


Abb. 15 b) Beispiele für EGFP positive Astrozyten sind durch Pfeile markiert. Vergrößerung x 630, Skalierung 20  $\mu\text{m}$ .

## **4. Diskussion**

### **4.1 Zielsetzung:**

Die Zelltherapie und die ex vivo Gentherapie stellen neuartige und im aktuellen Stadium noch experimentelle Methoden zur Therapie von Erkrankungen des ZNS dar. Astrozyten sind ideale Kandidaten für diese Anwendungen. Sie sind natürlicherweise im ZNS ansässig und übernehmen dort vielfältigste Funktionen und vermögen sich in den bestehenden Gewebeverband zu integrieren.

Durch eine ex vivo Gentherapie können therapeutische Transgene in vitro in Zellen eingebracht werden, die nachfolgend von den transduzierten Zellen exprimiert werden. So ließen sich zum Beispiel Proteine nach einer intrazerebralen Transplantation ins ZNS einschleusen, die die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können. Aus Ratten konnten bereits reife Astrozyten isoliert, in Langzeitkultur expandiert und mit einem viralen Vektor transduziert werden (Selkirk et al., 2002). Auch acht Monate nach Transplantation in die Spendertiere konnte die Expression der Transgene GFP und Neomycin-Phosphotransferase nachgewiesen werden. Auch Transgene mit einem möglichen therapeutischen Nutzen wie GDNF und BDNF konnten bereits erfolgreich in Rattenastrozyten eingebracht werden (Krobert et al., 1997; Ericson et al., 2002). Einen anwendungsbezogenen experimentellen Ansatz zeigten Cunningham und Su (2002) auf. Sie transplantierten GDNF transduzierte Astrozyten in das ZNS von Mäusen, die nachfolgend 6-OHDA-läsioniert wurden (ein Modell für den M. Parkinson). Es konnte eine Neuroprotektion von dopaminergen Neuronen der Substantia nigra im Vergleich zu Kontrolltieren beobachtet werden. Weiterhin trat kein Amphetamin-induziertes Rotationsverhalten auf. Aussichtsreiche Experimente im Hinblick auf eine Therapie von Hirntumoren führten Arnhold et al. (2003) durch. Sie zeigten, dass gliale Vorläuferzellen in vitro und in vivo einen Tropismus für Gliomazellen aufweisen und sich adenoviral transduzieren lassen. Es ergäbe sich somit die Möglichkeit Pharmaka in unmittelbarer Nachbarschaft von Gliomazellen zu sezernieren.

Humane Astrozyten konnten von Ridet et al. (1999) mit der humanen Tyrosinhydroxylase transduziert werden, womit ein wichtiger Schritt in Richtung einer autologen ex vivo Gentherapie getan wurde. In einer Folgearbeit konnte nach Transplantation in das ZNS von Nacktratten nachgewiesen werden, dass die transplantierten Astrozyten kein tumorigenes Potential besitzen (Ridet et al., 2003).

Astrozyten aus epileptischen Hippocampi sind möglicherweise besonders für eine Zelltherapie geeignet. Da die Temporallappenresektion mittlerweile zu routinemäßig

durchgeführten Eingriffen bei refraktärer Temporallappenepilepsie zählt, ist hippocampales Gewebe für diese Applikation hinreichend zugänglich. Weitere Vorteile sind die im epileptischen Hippocampus beobachteten erhöhten Neurotrophinkonzentrationen (Shetty et al., 2003; Takahashi et al., 1999), die Anwesenheit von proliferativen immaturren Astrozyten (Wennstrom et al., 2003; Huttmann et al., 2003; Hinterkeuser et al., 2000; Crespel et al., 2002) sowie die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen (Blümcke et al., 2001). Diese Eigenschaften bieten Aussicht auf eine Zellpopulation mit ausreichender proliferativer Kapazität, um eine für eine Transplantation hinreichende Anzahl von Zellen zu kultivieren. Die Sekretionsleistung neurotropher Faktoren ist im epileptischen Milieu möglicherweise so hoch, dass von dort isolierte Astrozyten auch ohne genetische Modifikation als Zelltherapeutikum fungieren könnten. Deshalb sollen in dieser Promotionsarbeit folgende Fragen beleuchtet werden:

- 1) Lassen sich proliferative Astrozytenvorläuferzellen aus humanem epileptischem Hippocampusgewebe isolieren?
- 2) Wie lassen sich Astrozytenvorläuferzellen immunzytochemisch charakterisieren und treten neuronale oder oligodendrogliale Differenzierungen auf?
- 3) Sind die proliferativen Eigenschaften der Zellen ausreichend, um eine Zellzahl zu gewinnen, die für eine Anwendung in der Gen- und/oder der Zelltherapie ausreichen?
- 4) Sezernieren Astrozyten aus epileptischem Milieu neurotrophe Faktoren, und wenn ja, in einer Konzentration, die für eine Anwendung als Zelltherapeutikum ausreicht?
- 5) Lassen sich die isolierten Zellen adenoviral transduzieren, falls die Sekretion neurotropher Faktoren für therapeutische Anwendungen zu gering ist?
- 6) Kann eine maligne Entartung der Zellen in vitro und in vivo sicher ausgeschlossen werden?
- 7) Wie verhalten sich die Zellen nach stereotaktischer Transplantation ins ZNS von Ratten?

## **4.2 Kritik der Methode**

### **Isolation von Astrozyten aus dem epileptischen Hippocampus**

Der epileptische Hippocampus zeichnet sich durch erhöhte Freisetzung von Neurotrophinen (Shetty et al., 2003; Takahashi et al., 1999) sowie einer erhöhten Neurogenese und Gliogenese aus. Für Applikationen in der Zelltherapie oder der ex vivo Gentherapie stellen neurotrophinsezernierende Zellen eine hochinteressante Quelle dar (Krobert et al., 1997; Ericson et al., 2002). Aus diesem Grunde bietet der epileptische Hippocampus vielversprechende Aussichten, ebensolche Zellen zu isolieren. Allerdings wurde dies bislang nicht wissenschaftlich untersucht. Da die Temporallappenresektion inzwischen ein häufig durchgeführter Eingriff bei refraktärer Temporallappenepilepsie ist (zur Übersicht: Polkey, 2004; Wiebe, 2004), ist die Verfügbarkeit des Gewebes vergleichsweise hoch. Gerade die Kultivierung von Astrozyten, als eigenständige Zellen des ZNS mit vielfältigen trophischen und supportiven Eigenschaften aus humanem hippocampalem Gewebe, wäre ideal für Anwendungen im Bereich der ex vivo Gentherapie.

### **Kultivierung und Charakterisierung humaner Astrozytenvorläuferzellen**

Als initiales Kulturmedium wurde serumfreies DMEM F 12 mit N2-Zusatz (Bottenstein und Sato, 1979) verwendet, um unter diesen Bedingungen die Genese von Neurosphären aus hippocampalen Vorläuferzellen zu untersuchen, wie von Roy et al. (2000) beschrieben. Da keine Neurosphären entstanden, wurde dem Kulturmedium 10 % FCS zugeführt, um optimale Proliferationsbedingungen für Astrozyten zu erzielen (De Groot et al., 1997; Ridet et al., 1999). Weiterhin wurden Proliferationsmessungen in verschiedenen Kulturbedingungen durchgeführt, die erwartungsgemäß die höchste mitogene Aktivität für Medium mit 10 % FCS ergaben. Grundlage der Proliferationsmessungen war der „Cell Titer One Solution Proliferation Assay“ der Firma Promega. Dieses System beruht auf der NADH / NADPH abhängigen Umsetzung von Tetrazolium zu Formazan durch metabolisch aktive Zellen (Riss und Moravec, 1992). Die Formazankonzentration kann durch die photometrische Absorption bei 490 nm bestimmt werden. Je höher also die Formazan Absorption ist desto mehr metabolisch aktive Zellen müssen zu Grunde liegen. Der „Proliferation Assay“ erlaubt einen genauen Vergleich der Proliferation unter verschiedenen Kulturbedingungen mit Mehrfachbestimmung durch Verwendung von 96 Well Platten. Darüber hinaus wurde ein Proliferationsindex der Zellen durch Verwendung der Ki 67

Immunfluoreszenz ermittelt. Das Ki 67 Antigen hat eine nukleäre Lokalisation und wird spezifisch von proliferativen Zellen exprimiert (Gerdes et al., 1984).

Die weitere immunzytochemische Charakterisierung erfolgte durch die typischen Astrozytenmarker Vimentin, GFAP und S 100- $\beta$ . Um Hinweise auf einen Vorläufercharakter zu erlangen, wurde auch die Immunpositivität von Nestin untersucht. Da auch eine Expression von neuronalen Markern in Nestin positiven Astrozyten beschrieben wurde (Schinstine und Iacovitti, 1996), folgte eine immunzytochemische Analyse von MAP 2,  $\beta$ -III Tubulin und NeuN. Dabei ergab sich eine Positivität für  $\beta$ -III-Tubulin und in einer Subpopulation für NeuN bei Negativität für MAP 2. Weiterhin bestand Negativität für die oligodendrogialen Marker O4 und MBP sowie für den Vorläufermarker von Typ 2 Astrozyten A2B5.

Zur Messung der Sekretion neurotropher Faktoren wurden ELISA Systeme der Firma Promega verwendet. Diese bieten eine standardisierte Handhabung bei hoher Sensitivität und Spezifität und wurden bereits vielfach mit Erfolg angewandt (Yamamoto et al., 1990; Lin et al., 1993).

### **Transduktion astrozytärer Vorläuferzellen**

Zur Transduktion der Astrozytenvorläuferzellen mit EGFP wurde ein adenoviraler high capacity Vektor verwendet. Das EGFP stellt eine Weiterentwicklung des GFP mit einer intensiveren Grünfluoreszenz dar (Bierhuizen et al., 1997). Adenovirale Vektoren können sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen infizieren (Günzburg und Salmons, 1997) und wurden bereits zur Transduktion humaner Astrozyten in vitro verwendet (Ridet et al., 1999). Adenovirale high capacity Vektoren zeichnen sich durch die komplette Eliminierung viraler Gene und entsprechend hoher Kapazität für fremde DNA (36 kB) aus (zur Übersicht Kochanek et al., 2001). Gegenüber adenoviralen Vektoren der ersten und zweiten Generation weisen sie in vivo eine verlängerte Transgenexpression bei verminderter Immunogenität auf (Kochanek et al., 2001). Adenovirale Vektoren führen im Gegensatz zu z.B. retroviralen Vektoren nicht zu einem chromosomalem Gentransfer, der mit der Gefahr einer malignen Transformation der Zellen verbunden ist (Ridet et al., 1999). Der Gentransfer erfolgt bei adenoviralen Vektoren extrachromosomal in Form von Episomem, wodurch die chromosomale DNA Sequenz unbeeinflusst bleibt. Nachteilig kann sich bei dieser Methode eine „Ausdünnung“ des Transgens durch Zellproliferation mit konsekutiv verkürzter

Transgenexpression auswirken, da die episomale DNA bei der Zellteilung nicht mitrepliziert wird (Günzburg und Salmons, 1997).

### **Transplantation und Sicherheit:**

Die Astrozytenvorläuferzellen wurden aus dem epileptischen Hippocampus in Nachbarschaft eines gutartigen glioneuralen Tumors (WHO Grad I) isoliert und bis zu 12 Passagen in Langzeitkultur expandiert. Diese Tatsachen werfen die Frage auf, ob sich möglicherweise transformierte Zellen aus dem benachbarten Tumor in der Kultur befinden, oder ob die Zellen im Laufe der Langzeitkultivierung transformiert wurden. Als erstes Anzeichen, dass die untersuchten Zellen nicht transformiert sind, kann man die Tatsache deuten, dass die Zellen nach 10 bis 12 Passagen ihre Proliferation einstellen und nicht länger expandierbar waren. Dies spricht gegen eine Immortalisierung der Zellen. Um weiterhin eine Transformation auszuschließen, wurde eine Chromosomenfärbung durchgeführt, die einen normalen diploiden Chromosomensatz ergab. Eine veränderte Chromosomenzahl ist ein deutlicher Hinweis auf eine Transformation, jedoch schließt ein normaler Chromosomensatz diese nicht aus. Gerade niedrig maligne glioneurale Tumoren besitzen oft einen normalen Karyotyp (Roberts et al., 2001). Als wichtigstes Kriterium für den Ausschluss einer Transformation gilt deshalb die Transplantation in Nacktmäuse oder Nacktratten. Diese Tiere weisen eine autosomal rezessive Mutation auf, die eine Thymusaplasie und eine ausgeschaltete T-Zell-Immunität zur Folge hat (Shin et al., 1975). Aus diesem Grunde können transplantierte tumorigene Zellen nicht abgestoßen werden, und es folgt eine konsekutive Tumorformation (zur Übersicht: Povlsen, 1980). Eine Tumorformation konnte nach Transplantation von astrozytären Vorläuferzellen weder makroskopisch noch mikroskopisch beobachtet werden, was eine Transformation der Zellen sehr unwahrscheinlich macht.

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse**

Die vorgelegte Arbeit hat folgende neue Erkenntnisse hervorgebracht:

- 1) Aus humanem epileptischem Hippocampusgewebe lassen sich proliferative Astrozyten isolieren.
- 2) Die immunzytochemische Charakterisierung der Zellen ergab die Expression der typischen Astrozytenmarker GFAP und S-100 $\beta$ . Weiterhin konnte auch eine Immunpositivität für die Marker Nestin und Vimentin beobachtet werden, was die Zellen als astrozytäre Vorläuferzellen ausweist. Überraschenderweise exprimierten die Zellen auch das neuronale Protein  $\beta$ -III-Tubulin und in einer Subpopulation das neuronale Kernprotein NeuN. Allerdings ist die Morphologie der Zellen deutlich unterschiedlich im Vergleich zu Neuronen. Oligodendrozyten konnten weder morphologisch noch immunzytochemisch nachgewiesen werden.
- 3) Die proliferativen Eigenschaften von astrozytären Vorläuferzellen sind ausreichend, um eine adäquate Menge von Zellen für eine ex vivo Gentherapie zu gewinnen.
- 4) Astrozytäre Vorläuferzellen aus dem epileptischem Hippocampus sezernieren die neurotrophen Faktoren NGF (36,2 pg / 10<sup>5</sup> Zellen in 24 h) und BDNF (16,7 pg / 10<sup>5</sup> Zellen in 24 h) . Diese Mengen lassen jedoch keine wesentlichen biologischen Effekte erwarten. Eine Sekretion von GDNF und NT3 konnte nicht nachgewiesen werden.
- 5) Astrozytäre Vorläuferzellen lassen sich durch adenovirale Vektoren mit einer Effizienz von 71% mit EGFP transduzieren.
- 6) Eine maligne Transformation der Zellen konnte in vitro und in vivo ausgeschlossen werden.
- 7) Nach Transplantation behalten die Zellen ihren astrozytären Phänotyp und verbleiben im Bereich des Injektionsortes.

### **Isolation proliferativer Astrozyten und immunzytochemische Charakterisierung:**

In der vorliegenden Arbeit konnten proliferative humane Astrozyten aus dem epileptischen Hippocampus isoliert und über einen Zeitraum von 6 Monaten kultiviert werden. Die Kultivierung humaner Astrozyten aus epileptischem Gewebe konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (Barna et al., 1989; Lee et al., 1995; Marroni et al., 2003). In diesen Studien wurde allerdings keine erweiterte Charakterisierung der isolierten Zellen im Hinblick auf immunzytochemische Eigenschaften,

Proliferationseigenschaften und die Sekretion neurotropher Faktoren durchgeführt, so dass diese Aspekte erstmals in der vorgelegten Arbeit genau untersucht werden.

Durch immunzytochemische Untersuchungen konnte die Expression von GFAP und S-100  $\beta$  nachgewiesen werden, was den astrozytären Charakter der isolierten Zellen belegt. Weiterhin zeigte sich eine Positivität für Nestin und Vimentin. Dies kann als Ausdruck eines Vorläufercharakters gewertet werden. Nach dem 1991 von Cameron und Rakic erstellten Schema der glialen Differenzierung im cerebralen Cortex der Ratte (vgl. Abb. 1), das auf Grundlage der An- oder Abwesenheit von Antigenen während des Reifungsprozesses entwickelt wurde, korrespondieren die hier untersuchten Zellen am stärksten mit astrozytären Typ 1A Vorläuferzellen, die kurz vor der Ausreifung stehen und noch mitotisch sind. Sie entwickeln sich aus multipotenten Vorläufern der Gliazelllinie, die die Antigene Nestin (=RAT 401), Vimentin, A2B5 und RAN2 exprimieren. Bei der Reifung zum Typ IA Vorläufer verlieren sie die Antigenität für A2B5. Während der weiteren Entwicklung zu Typ 1 Astrozyten werden die Zellen positiv für GFAP, kurz bevor sie in die postmitotische Phase eintreten, in der die Expression der Vorläufermarker Nestin und Vimentin eingestellt wird.

Die hier untersuchten Zellen zeigen ein ähnliches Expressionsmuster mit Positivität für Nestin, Vimentin und GFAP bei Negativität für A2B5. Jedoch soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass Vimentin auch in den Ausläufern von reifen stellaren Astrozyten im Hippocampus von Ratten nachgewiesen wurde (Schmidt-Kastner und Szymas, 1990). Auch andere Autoren berichteten über das Vorkommen von Vimentin in murenen Astrozyten (Raff et al., 1984; Schwartz und Wilson, 1992). Die Expression von Nestin ist hingegen charakteristisch für proliferierende Astrozyten bzw.

Astrozytenvorläuferzellen. Sie wurde in reaktiven Astrozyten im Hippocampus im Pilocarpin-Epilepsie Modell der Ratte beschrieben (Scorza et al., 2005). Außerdem wird Nestin von humanen fetalen Astrozytenvorläufern exprimiert (Cauley et al., 1997). Dabei wurden auch die Marker Vimentin und GFAP nachgewiesen, so dass humane fetale Astrozytenvorläufer ein ähnliches Expressionsmuster wie die hier untersuchten Zellen aufweisen. Laywell et al. (2000) bestimmten für Astrozyten aus dem unreifen ZNS der Maus ebenfalls ein ähnliches Expressionsmuster mit Positivität für Nestin, Vimentin, S 100 $\beta$  und GFAP. Weitere Hinweise für den Vorläufercharakter der Zellen ergeben sich aus ihrer proliferativen Kapazität. Während der Proliferationsindex von reifen human Astrozyten in Zellkultur 2% beträgt (Yong et al., 1991) wiesen die

untersuchten Zellen einen Proliferationsindex von 13% auf, der über die Expression von Ki67 ermittelt wurde.

Humane astrozytäre Vorläuferzellen konnte nach meiner Kenntnis bislang nicht aus dem postnatalen ZNS isoliert werden. Cauley et al. (1997) sowie Lin et al. (1997) gelang es humane astrozytäre Vorläuferzellen aus fetalem Gewebe zu kultivieren. Weiterhin wäre es denkbar, aus humanen embryonalen Stammzellen Astrozytenvorläufer zu generieren, wie an Mäusen gezeigt werden konnte (Arnhold et al., 2000). Zweifelsohne aber ist die ethische Akzeptanz für die Isolation postnataler Zellen im Rahmen einer medizinisch indizierten Operation am größten (Sheldon, 2000; Watson, 2000). Neuere Publikationen eröffnen die interessante Perspektive, neurale Stammzellen und konsekutiv möglicherweise auch Astrozytenvorläuferzellen aus adulten humanen Stammzellen, wie der mesenchymalen Stammzelle, zu generieren (Joannides et al., 2003; Joannides et al., 2004; Shih et al., 2005).

Überraschenderweise wurde bei der immunzytochemischen Untersuchung der Astrozytenvorläufer auch die Expression der neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin und NeuN festgestellt. Während alle Zellen positiv für  $\beta$ -III-Tubulin waren, zeigte sich für NeuN eine Subpopulation von 30% als immunpositiv. Der neuronale Marker MAP 2 sowie die oligodendroglialen Marker MBP und O4 konnten allerdings nicht nachgewiesen werden. Eine Expression des neuronalen Protein MAP2, nicht aber von  $\beta$ -III Tubulin, konnte von Geisert et al. (1990) an reaktiven Astrozyten gezeigt werden. In diesem Zusammenhang sind Publikationen erwähnenswert, die Astrozyten in bestimmten Hirnregionen als neurale Stammzellen ansehen. 1999 beschrieben Doetsch et al., dass subventrikuläre Astrozyten der Maus Neurosphären ausbilden können und in vivo neue Neurone generieren. Immunzytochemisch waren diese Astrozyten positiv für GFAP, S 100 $\beta$  und Vimentin, wie auch die hier vorliegenden Astrozytenvorläufer. Leider untersuchten Doetsch et al. nicht, ob die Astrozyten auch neuronale Marker exprimieren. Interessanterweise zeigten Laywell et al. (2000), dass Astrozyten aus verschiedenen Regionen des postnatalen und adulten Mäusehirn Neurosphären bilden können, aus denen sich sowohl neuronale als auch gliale Zellen entwickeln können. Charakteristischerweise waren diese neurosphärenbildenden Astrozyten unter anderem immunpositiv für  $\beta$ -III-Tubulin.

### **Proliferation:**

Für EGF, bFGF und FCS wurden mitogene Einflüsse auf Astrozyten sowie neurale Vorläuferzellen beschrieben. Dabei ist die Datenlage in der Literatur für unreife und adulte Astrozyten durchaus widersprüchlich. So stellte Fischer (1984) eine optimale Proliferation von unreifen Astrozyten aus postnatalem Maushirn in Gegenwart von EGF fest. Kniss und Burry (1988) zeigten ähnliche Effekte für bFGF an astroglialen Zellen des neonatalen Rattencerebellums, sowie Vescovi et al. (1993) an bipotenten Vorläuferzellen der Maus, die sich zu Neuronen und Astrozyten differenzieren können. Auch fetale humane Astrozyten konnten durch bFGF zu erhöhter mitotischer Aktivität angeregt werden (Cauley et al., 1997; Yong et al., 1988). Eine optimale Proliferationsrate ermittelten Cauley et al. (1997) für eine Kombination von bFGF und 10% FCS. Im Gegensatz dazu wies FGF an humanen adulten Astrozyten keine mitogene Aktivität auf (Yong et al., 1988; Ridet et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten astrozytären Vorläuferzellen zeigten unter Einfluss von 10 % FCS die höchste proliferative Kapazität. Jedoch wurde auch durch EGF und bFGF ein mitogener Einfluss ausgeübt, der jedoch geringer war als unter 10 % FCS. Das Proliferationsverhalten ist also typisch für unreife astrogliale Zellen, wobei sowohl unter EGF und bFGF, als auch unter FCS eine verstärkte Proliferation beobachtet werden kann. Insgesamt konnten die astrozytären Vorläuferzellen über 6 Monate expandiert werden. Bei konsequenter Zellvermehrung wäre es dabei schon nach 4 Passagen möglich 1-5 Millionen Zellen durch eine Entnahme zu generieren, was eine für eine Zelltransplantation ausreichende Zellpopulation darstellt (Ridet et al., 1999).

### **Neurotrophe Faktoren:**

Im epileptischen Hippocampus konnten erhöhte Konzentrationen von Neurotrophinen nachgewiesen werden (Shetty et al. 2003, Poulsen et al., 2004). Es stellt sich somit die Frage, ob auch humane astrozytäre Vorläuferzellen aus dem epileptischen Hippocampus Neurotrophine sezernieren. So konnte in den vorliegenden Untersuchungen tatsächlich eine Sekretion von NGF und BDNF festgestellt werden. Allerdings war keine Sekretion von GDNF oder NT3 nachweisbar. Lambert et al. (2004) beschrieben ebenfalls die Sekretion von NGF und BDNF durch humane Astrozyten des N. opticus. Leider wurde in dieser Arbeit nicht die genaue Sekretionsleistung pro Zellzahl und Zeit errechnet, so dass ein genauerer Vergleich mit den in dieser Arbeit untersuchten humanen hippocampalen Astrozytenvorläuferzellen

nicht möglich ist. Humane fetale Astrozyten zeigten keine Sekretion von NGF (Lin et al., 1997), können aber nach genetischer Modifikation mit einem retroviralen Vektor dazu angeregt werden. Für Typ 1 Astrozyten der Ratte wurde eine Sekretionsrate von 0,2pg / 24h /  $10^5$  Zellen beschrieben (Cunningham et al., 1994), während eine Sekretion von BDNF nicht nachweisbar war (Castillo et al., 1994). Diese Daten zeigen im Vergleich, dass die untersuchten Zellen aus dem epileptischen Hippocampus eine erwartungsgemäß erhöhte Sekretionsleistung für NGF und BDNF aufweisen.

In der Literatur werden die neurotrophen Effekte für NGF bei Konzentrationen von meist 20 bis 100 ng/ml beschrieben (Kirschenbaum und Goldman, 1995; Weis et al., 2001; Du et al., 1995; Mattson et al., 1995). Ähnliches gilt für BDNF (Kirschenbaum und Goldman, 1995; Du et al., 1995; Mistry et al., 2002; Mattson et al., 1995). Mit der gemessenen Sekretionsleistung von humanen astrozytären Vorläuferzellen von 36,2 pg/ $10^5$  Zellen / 24h für NGF bzw. 16,7 pg/ $10^5$  Zellen / 24h wären jedoch selbst unter günstigen Bedingungen nur Konzentrationen von ca 75 pg/ml (NGF) und 35 pg/ml (BDNF) in vitro erreichbar (kalkuliert für 500.000 Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale mit 10ml Medium und einer Inkubationszeit von 4 Tagen). Somit sind keine nennenswerten neurotrophen Effekte der Zellen durch die Sekretion von NGF und BDNF in vitro zu erwarten. Nach Transplantation von  $10^7$  Zellen ist eine maximale Sekretion von 3,6 ng / 24 h NGF und 1,7 ng / 24 h BDNF erreichbar. Es bleibt spekulativ, ob dies für therapeutische Effekte in vivo nach einer Transplantation hinreichend ist, da genaue Vergleichsdaten in der Literatur fehlen. Lediglich für GDNF existieren vergleichbare Daten, wobei nach Transplantation von 100.000 transduzierten Astrozyten (Sekretionsleistung: 115pg / 24 h /  $10^5$  Zellen) eine signifikante positive Beeinflussung im 6-OHDA Modell der Maus erreicht werden konnte (Cunningham und Su, 2002).

Eine Transduktion mit einem NGF oder BDNF exprimierenden viralen Vektor bietet in diesem Zusammenhang die Möglichkeit die Sekretion von Neurotrophen erheblich zu steigern.

### **Transduktion:**

Um zu prüfen, ob humane Astrozytenvorläufer als Vehikel für eine ex vivo Gentherapie in Frage kommen, wurden sie in der vorliegenden Arbeit mittels eines high capacity adenoviralen Vektors mit Expression von EGFP transduziert. Gegenüber adenoviralen Vektorsystemen früherer Generationen zeichnen sich high capacity

Adenovirusvektoren durch eine erhöhte Aufnahmekapazität für fremde DNA (36 KB), sowie einer verminderten Immunogenität bei verlängerter Transgenexpression aus (zur Übersicht: Kochanek et al., 2001). Es zeigte sich, dass ein hoher Prozentsatz der Zellen (71%) transduziert wurde und EGFP exprimierte. In der Literatur finden sich Transduktionsraten von 30-50% für GFP bei reifen Rattenastrozyten nach retroviraler Infektion (Selkirk et al., 2002). Durch adenovirale Infektion erreichten Ridet et al. (1999) eine Transduktionseffizienz von bis zu 60% bei adulten humanen Astrozyten, bei Verwendung eines lentiviralen Vektors erreichte dieselbe Arbeitsgruppe sogar eine Transduktionseffizienz von 100% (Ridet et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit erreichte Rate von 71% zeigt somit eine vergleichsweise hohe Effizienz des adenoviralen Vektorsystems, wobei dieser Wert durch Verwendung eines lentiviralen Vektors möglicherweise noch gesteigert werden kann (Ridet et al., 2003). Die Verwendung nicht viraler Vektorsysteme für den in vitro Gentransfer in Astrozyten ist ebenfalls denkbar, allerdings sind die Transduktionsraten mit 10-20 % deutlich geringer als bei viralen Vektorsystemen (Mertz et al., 2002; Tinsley et al., 2004). Vorteil des nicht viralen Gentransfers ist ein geringer methodischer Aufwand und der Ausschluss einer möglichen toxischen Viruswirkung.

Die in der vorliegenden Arbeit erzielte hohe Transduktionseffizienz eröffnet die weitere Möglichkeit nach adenoviraler genetischer Modifikation die Sekretion von NGF und / oder BDNF durch die hippocampalen Astrozytenvorläuferzellen deutlich zu steigern. Lin et al. (1997) konnten humane fetale Astrozyten retroviral mit der DNA Sequenz für NGF transduzieren. Während vor der Transduktion keine Sekretion von NGF messbar war, wurden danach 41 ng /  $10^5$  Zellen / 24 h gemessen. Dadurch konnte ein Neuritenauswuchs von chromaffinen Zellen aus dem Nebennierenmark stimuliert werden. Für BDNF konnten durch retrovirale Transduktion Sekretionsraten bis zu 3,9 ng /  $10^5$  Zellen / 24 h durch embryonale Rattenastrozyten gemessen werden (Castillo et al., 1994). Für GDNF wurde eine Sekretion von 2,7 ng /  $10^5$  Zellen / 24 h beschrieben, wodurch nach Transplantation eine Neuroprotektion von dopaminergen Zellen in einem Mausmodell des M. Parkinson beschrieben wurde (Cunningham und Su, 2002).

Auch 3 Monate nach Transduktion und Transplantation in Nacktmäuse oder Nacktratten konnte eine Expression des Transgen EGFP beobachtet werden (vgl. Abb. 15). Ericson et al. (2002) berichteten von einem Verlust der GFP Expression in transplantierten lentiviral modifizierten embryonalen Rattenastrozyten. Die Autoren postulierten, dass die GFP Expression unter Kontrolle des CMV Promotor nur in

proliferierenden oder reaktiven Astrozyten auftritt, da der CMV Promotor in diesem Zusammenhang induziert wird (Ericson et al., 2002). In human Astrozyten konnten jedoch Langzeitexpressionsraten für GFP nach Transduktion durch einen lentiviralen Vektor bis zu 6 Monaten nachgewiesen werden (Buchet et al., 2002). Wahrscheinlich hängen die Expressionsunterschiede in den verschiedenen Spezies mit der Verwendung von unterschiedlichen Promotoren zusammen (Ridet et al., 2003). Diese Vermutung wird von Experimenten unterstützt, die unterschiedliche Expressionsmuster für das LacZ-Reportergen unter Kontrolle des humanen oder Maus CMV Promotor in transgenen Tieren aufweisen. Unter Kontrolle des Maus CMV Promotor wird LacZ spezifisch in adulten Astrozyten exprimiert (Aiba-Masago et al., 1999), während unter Kontrolle des humanen CMV Promotor eine Expression nur in aktivierten Gliazellen zu finden ist (Fritschy et al., 1996).

### **Transplantation und Sicherheit:**

Zellen, deren Eignung zur ex-vivo Gentherapie diskutiert werden, müssen genau auf eine mögliche Transformation untersucht werden. In den zahlreichen Studien, die bisher über ex vivo Gentherapien in Tierversuchen berichtet haben, wurde der Sicherheitsaspekt oft nur unzureichend beleuchtet. Lediglich Ridet et al. (2003) und Cauley et al. (1997) konnten eine Transformation der verwendeten Zellen sicher ausschließen. Um eine Transformation der hier untersuchten Zellen auszuschließen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zunächst wurde die Proliferationskapazität der Zellen in mittleren und hohen Passagen in Gegenwart von 10% FCS miteinander verglichen. Dabei zeigte sich für Zellen der Passage 10 eine Zunahme der Zellzahl in 120h um 58%. Zellen der Passage 6 konnten sich in dem selben Zeitraum um 174% vermehren. Dies zeigt, dass die Zellen ihre Proliferationsfähigkeiten mit der Zahl der durchgemachten Zellteilungen einbüßen. Dies bestätigt auch die beobachtete Einstellung der Proliferation von Zellen in Passage 12-13 nach 6 Monaten in Kultur. Für transformierte Zellen ist eine solcher Rückgang der Proliferation in hohen Passagen untypisch. Außerdem wurde die Chromosomenanzahl der Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass die humanen Astrozytenvorläufer einen normalen diploiden Satz von 23 Chromosomen besitzen. Der Goldstandard, um nachzuweisen, dass Zellen keine tumorigen Eigenschaften besitzen, ist jedoch die Transplantation ins tierische ZNS. Dazu wurden neben Wistar Ratten auch Nacktmäuse und Nacktratten verwendet, die bei ausgeschalteter T-Zellimmunität nicht in der Lage sind, transformierte Zellen

immunologisch abstoßen (Rygaard und Povlsen, 1969; zur Übersicht: Povlsen, 1980). Es wurden jeweils je 30.000 EGFP exprimierende und 30.000 genetisch unveränderte Astrozyten in das rechte Striatum der Versuchstiere transplantiert. Zwei bzw. drei Monate nach intrazerebraler Transplantation konnte kein Anhalt für eine Tumorbildung festgestellt werden. In Kryostatschnitten konnten vereinzelte transplantierte Zellen durch EGFP-Fluoreszenz im rechten Striatum der Nackttiere wiederentdeckt werden, wobei sie die typische Morphologie von Astrozyten aufwiesen (vgl. Abb. 15). Außerhalb des Striatums konnten trotz gründlicher Mikroskopie keine EGFP-fluoreszierenden Zellen aufgefunden werden, so dass nicht von einer ausgedehnten Migration der Zellen nach Transplantation auszugehen ist. In den Gehirnen der Wistar Ratten waren keine grünfluoreszierenden Zellen auffindbar. Dies ist als Ausdruck der Immunkompetenz der Wistar Ratten im Gegensatz zu den Nackttieren zu werten. Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Zellen nicht tumorigen sind und somit ein wichtiges Sicherheitskriterium für eine Transplantation erfüllen. Ridet et al. (2003) fanden ähnliche Ergebnisse für die Transplantation von GFP exprimierenden adulten humanen Astrozyten nach Transplantation in das Striatum von Nacktmäusen. Auch hier waren nach 8 Wochen transplantierte Zellen im Striatum der Nacktmäuse nachweisbar, wobei auch eine Migration von Zellen bis zu 100 µm vom Injektionsort nachweisbar war. Eine Tumorgenese konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

### **Astrozyten und Epilepsie:**

Neben den Implikationen für die Verwendung humaner Astrozytenvorläuferzellen für eine Zelltherapie bietet die vorliegende Arbeit die Möglichkeit, astrozytäre Veränderungen im epileptischen Hippocampus zu untersuchen. Blümcke et al. (2001) beschrieben ein vermehrtes Auftreten von Nestin positiven neuronalen Vorläuferzellen mit konsekutiv erhöhter Neurogenese bei pädiatrischen Patienten mit Temporal-lappenepilepsie. Ähnliche Ergebnisse zeigten Experimente von Parent et al. (1997) am Pilocarpin Modell für Epilepsie an adulten Ratten. In vitro Experimente mit Nestin positiven neuronalen Vorläuferzellen aus dem epileptischem Hippocampus der Ratte zeigten, dass die Zellen Neurosphären bilden können, aus denen sich Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten ableiten (Becq et al., 2004). Scorza et al. (2005) fanden im Pilocarpinmodell eine Colokalisation von Nestin und GFAP, was auf die Anwesenheit astrozytärer Vorläuferzellen hinweist. Es ist somit denkbar, dass sich die

vorliegenden Astrozytenvorläuferzellen von neuronalen Vorläuferzellen ableiten, die im epileptischen Milieu verstärkt proliferieren. Dies könnte auch die ungewöhnlichen immunzytochemischen Eigenschaften der Zellen mit Expression der neuronalen Proteine  $\beta$ -III-Tubulin und NeuN verständlicher machen, da die Expression der neuronalen Antigene MAP2 (Rosser et al., 1997) und Tau (Schinstine und Iacovitti, 1996) für Astrozyten gezeigt werden konnten, die in vitro aus neuronalen Vorläuferzellen generiert wurden. Entsprechende Kontrollen bestehend aus normalen primären Astrozyten zeigten keine Expression neuronaler Proteine (Schinstine und Iacovitti, 1996). Andere Autoren vermuten, dass die Expression von Nestin und neuronalen Markern durch reaktive Astrozyten im adulten Hirn eine Zurückentwicklung reifer Astrozyten zu einem immaturren Phänotyp darstellt (Lin et al., 1995; Duggal et al., 1997).

Ein weiteres Charakteristikum des epileptischen Hippocampus sind die erhöhten Konzentrationen von Neurotrophinen. So zeigt sich im Pilocarpin Modell eine verstärkte Transkription von NGF und BDNF, die innerhalb von 24 Stunden ein Maximum erreicht (Poulsen et al., 2004). Im Kainatsäure Modell für Temporal-lappenepilepsie konnte gezeigt werden, dass erhöhte Konzentrationen von BDNF bis 45 Tage, von NGF sogar über 120 Tage nachweisbar waren (Shetty et al., 2003). Untersuchungen bei humaner Temporallappenepilepsie zeigten hingegen nur erhöhte Konzentrationen von BDNF, nicht aber von NGF (Takahashi et al., 1999). Inwiefern Astrozyten zu der erhöhten Sekretion von Neurotrophinen im epileptischen Milieu beitragen, ist meines Wissens bislang nicht untersucht worden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Astrozytenvorläufer aus dem humanen epileptischem Hippocampus BDNF und NGF sezernieren und somit wahrscheinlich zu Veränderungen im epileptischen Gewebe beitragen. Während neurotrophe Faktoren bei neurodegenerativen Erkrankungen ein vielversprechendes therapeutisches Potential besitzen, führen sie bei epileptischen Anfallserkrankungen, allen voran BDNF, wahrscheinlich zu einer verstärkten Epileptogenese (zur Übersicht: Binder, 2004; Binder et al., 2001). Sowohl NGF (Adams et al., 1997) als auch BDNF (Scharfman et al., 1999) führen im epileptischen Hippocampus zum verstärkten axonalen Wachstum („mossy fiber sprouting“). Außerdem zeigt sich im Tierversuch eine erhöhte hippocampale Neurogenese nach BDNF Infusion (Scharfman et al., 2005). Zusammengenommen führt dies zu einer veränderten synaptischen Organisation mit einer erhöhten Excitabilität, was als Beitrag zur zellulären Grundlage von epileptischen

Entladungen vermutet wird (Koyama et al., 2004). Neue Therapiestrategien für Epilepsie haben folglich unter anderem zum Ziel den epileptogenen Effekten von BDNF und NGF entgegenzuwirken (zur Übersicht: Binder et al., 2001). Auch die astrozytäre Sekretion von Neurotrophinen wäre dabei eine vielversprechende Option. Die hier vorgestellte Arbeit liefert ein für diese Zwecke geeignetes in vitro Modell, um verschiedene Pharmaka auf eine Inhibition der astrozytären Neurotrophinsekretion hin zu evaluieren.

#### **4.4 Ausblick:**

Eine Isolation und effiziente in vitro Vermehrung von Astrozytenvorläuferzellen aus dem adulten humanen ZNS eröffnet die Möglichkeit zur autologen Transplantation bei Anwendung für eine ex vivo Gentherapie. Die Verwendung von allogenen Gewebe birgt eine hohe Gefahr der Transplantatabstoßung (Tornatore et al., 1996; Hida et al., 1999). Eine immunsuppressive Therapie kann dieses Risiko reduzieren (Okoye et al., 1994; Schwarz et al., 1996), ist allerdings mit enormen Nebenwirkungen verbunden, die zu einer deutlichen Einschränkung der Lebenserwartung führen (Dunn, 1990; Soullou und Girall, 2001). Die Verwendung embryonaler Stammzellen für zelltherapeutische Indikationen ist demgegenüber mit der Gefahr der Tumorgenese (Yanai et al., 1994; Arnhold et al., 2004) behaftet und birgt erhebliche ethische Bedenken (Sheldon, 2000; Watson, 2000). Die Verwendung autologer Zellen für eine ex vivo Gentherapie hat somit eindeutige Vorteile. Eine weitere wichtige Quelle für die autologe ex vivo Gentherapie könnten in Zukunft mesenchymale Stammzellen und von ihnen abgeleitete neurale Zellen darstellen (Joannides et al., 2004; Shih et al., 2005).

Die Isolation und Vermehrung autologer primärer Astrozytenvorläuferzellen ist zwangsläufig mit einem neurochirurgischen Eingriff verbunden, was für viele Patienten sicherlich ein inakzeptables Risiko darstellen würde. Deshalb könnte außerdem bei indizierten neurochirurgischen Operationen, wie der Temporallappenektomie bei refraktärer Epilepsie, aus dem resezitierten Gewebe Astrozytenkulturen angelegt werden. Langfristig könnte daraus eine Zellbank entstehen, die potentiellen Patienten Astrozyten mit optimalen HLA Eigenschaften anbietet. Dadurch wäre eine Transplantatabstoßung, bei entsprechender immunsuppressiver Therapie, die dabei wohl unausweichlich wäre, weniger wahrscheinlich.

Eine ex vivo Gentherapie bietet bei neurodegenerativen Erkrankungen die Aussicht auf eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs (Mohajeri et al., 1999; Cunningham und Su, 2002). Aber auch traumatische oder ischämische Läsionen des ZNS konnten durch eine ex vivo Gentherapie gelindert werden (Kim et al., 1996; Kurozumi et al., 2004).

In der Zusammenschau kann festgehalten werden, dass die ex vivo Gentherapie vielfältige und vielversprechende Möglichkeiten zur Therapie verschiedenster Erkrankungen des ZNS bietet. Allerdings befindet sie sich in einem frühen Stadium der experimentellen Erprobung. Die Anwendungen von tierischen Zellen in verschiedenen Tiermodellen neurologischer Erkrankungen zeigt ermutigende Ergebnisse. Die weiteren

Schritte zur klinischen Anwendung müssen in der Evaluierung humaner Zellen auf Durchführbarkeit, Effizienz und Anwendungssicherheit liegen. Dazu soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag leisten.

## **5. Zusammenfassung:**

Astrozytäre Vorläuferzellen wurden erstmals aus postnatalem humanen Hippocampus isoliert und als Primärkultur in vitro für mehr als 6 Monate expandiert. Die Zellen wiesen die typische Morphologie protoplasmatischer Astrozyten auf und zeigten sich in der immunzytochemischen Analyse positiv für GFAP, Nestin, Vimentin und S-100 $\beta$ . Außerdem konnte eine Positivität für die neuronalen Marker  $\beta$ -III-Tubulin und NeuN nachgewiesen werden, was für Astrozytenvorläufer bislang nicht beschrieben wurde. Proliferierende Zellen konnten mit dem Ki-67 Antikörper identifiziert werden. Dabei betrug die initiale Generationszeit zwei bis drei Tage und verlangsamte sich nach der achten Passage in Zellkultur. Die Zellproliferation wurde in Anwesenheit von 10% FCS oder anderen Wachstumsfaktoren bestimmt. Durch Giemsa Färbung konnte ein diploider Chromosomensatz bestimmt werden und eine Transplantation sowohl in Nacktmäuse, als auch in Nacktratten ergab keinen Anhalt für ein tumorigenes Potential der Zellen. Die humanen hippocampalen Astrozytenvorläufer sezernieren NGF und BDNF in Konzentrationen von 36,2 bzw. 16,7 pg / 10<sup>5</sup> Zellen pro Tag. Die Zellen konnten effizient durch einen EGFP-exprimierenden adenoviralen Vektor transduziert werden. Transplantierte EGFP-positive Zellen überlebten im Empfängerhirn und zeigten eine typisch astrozytäre Morphologie.

Humane astrozytäre Vorläuferzellen stellen somit eine vielversprechende Quelle für eine ex vivo Gentherapie bei neurodegenerativen Erkrankungen dar.

### **Summary:**

Astrocyte precursor cells from the human adult hippocampus can be expanded in long term culture, secret neurotrophic factors and are transduceable with adenoviral vectors. Thus they represent a promising source for an ex vivo gene therapy of neurodegenerative disorders.

## Literatur

Adams B., Sazgar M., Osehobo P, Van der Zee C.E., Diamond J., Fahnstock M., Racine R.J. (1997). Nerve growth factor accelerates seizure development, enhances mossy fiber sprouting, and attenuates seizure-induced decreases in neuronal density in the kindling model of epilepsy. *J. Neurosci.* 17, 5288-5296.

Ahmed S., Reynolds B.A., Weiss S. (1995). BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors. *J. Neurosci.* 15, 5765-78.

Ard M.D., Schachner M., Rapp J.T., Faissner A. (1993). Growth and degeneration of axons on astrocyte surfaces: effects on extracellular matrix and on later axonal growth. *Glia* 9, 248-259.

Aiba-Masago S., Baba S., Li R.Y., Shinmura Y., Kosugi I., Arai Y., Nishimura M., Tsutsui Y. (1999). Murine cytomegalovirus immediate-early promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 154, 735-743.

Altman J. (1966). Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp. Neurol.* 16, 263-278.

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

Arenas E., Trupp M., Akerud P., Ibanez C.F. (1995). GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 15, 1465-1473.

Arnhold S., Lenartz D., Kruttwig K., Klinz F.J., Kolossov E., Hescheler J., Sturm V., Andressen C., Addicks K. (2000). Differentiation of green fluorescent protein labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum. *J. Neurosurg.* 93, 1026-1032.

Arnhold S., Klein H., Semkova I., Addicks K., Schraermeyer U. (2004). Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 4251-4255.

Arnhold S., Kreppel F., Kandirali S., Lenartz D., Klinz F.J., Sturm V., Kochanek S., Andressen C., Addicks K. (2002) Intracerebral transplantation and successful integration of astrocytes following genetic modification with a high-capacity adenoviral vector. *Cell Transplant.* 11, 663-670.

Bajocchi G., Feldman S.H., Crystal R.G., Mastrangeli A. (1993). Direct gene transfer to ependymal cells in the central nervous system using recombinant adenovirus vectors. *Nat. Genet.* 3, 229-234.

Barna B.P., Chou S.M., Jacobs B., Yen-Lieberman B., Ransohoff R.M. (1989). Interferon-beta impairs induction of HLA-DR antigen expression in cultured adult human astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 23, 45-53.

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

Becq H., Jorquera I., Ben-Ari Y., Weiss S., Represa A. (2005). Differential properties of dentate gyrus and CA1 neural precursors. *J. Neurobiol.* 62, 243-261.

Bierhuizen M.F., Westerman Y., Visser T.P., Wognum A.W., Wagemaker G. (1997). Green fluorescent protein variants as markers of retroviral-mediated gene transfer in primary hematopoietic cells and cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 371-375.

Binder D.K., Croll S.D., Gall C.M., Scharfman H.E. (2001). BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.* 24, 47-53.

Binder D.K, Scharfman H.E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22, 123-131.

Biran R., Noble M.D., Tresco P.A. (2003). Directed nerve outgrowth is enhanced by engineered glial substrates. *Exp. Neurol.* 184, 141-152.

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

Bjorklund L.M., Sanchez-Pernaute R., Chung S., Andersson T., Chen I.Y., McNaught K.S., Brownell A.L., Jenkins B.G., Wahlestedt C., Kim K.S., Isacson O. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2344-2349.

Blümcke I., Schewe J.C., Normann S., Brüstle O., Schramm J., Elger C.E., Wiestler O.D. (2001). Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11, 311-321.

Boewenkamp K.E., Hoffman A.F., Gerhardt G.A., Henry M.A., Biddle P.T., Hoffer B.J., Granholm A.C.E. (1995). Glial cell line-derived neurotrophic factor supports survival of injured midbrain dopaminergic neurons. *J. Comp. Neurol.* 355, 479-489.

Bottenstein J.E., Sato G.H. (1979). Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 514-517.

Buchan A.M., Williams L., Bruederlin B. (1990). Nerve growth factor: pretreatment ameliorates ischemic hippocampal neuronal injury. *Stroke* 21, 177.

Buchet D., Serguera C., Zennou V., Charneau P., Mallet J. (2002). Long-term expression of beta-glucuronidase by genetically modified human neural progenitor cells grafted into the mouse central nervous system. *Mol. Cell Neurosci.* 19, 389-401.

Cameron R.S., Rakic P. (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: A review and synthesis. *Glia* 4, 124-137.

Carter B.D., Kaltschmidt C., Kaltschmidt B., Offenhauser N., Bohm-Matthaei R., Baeuerle P.A., Barde Y.A. (1996). Selective activation of NF-kappa B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* 272, 542-545.

Castillo B. Jr., del Cerro M., Breakfield X.O., Frim D.M., Barnstable C.J., Dean D.O., Bohn M.C. (1994). Retinal ganglion cell survival is promoted by genetically modified astrocytes designed to secrete brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Brain Res.* 647, 30-36.

Cauley K., Kukekov V., Young D. (1997). Kainate/AMPA receptors expressed on human fetal astrocytes in long-term culture. *J. Neurosci. Res.* 47, 311-321.

Chen K.S., Gage F.H. (1995). Somatic gene transfer of NGF to the aged brain: behavioral and morphological amelioration. *J. Neurosci.* 15, 2819-2825.

Cheng B., Mattson M.P. (1994). NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic / excitotoxic insults. *Brain Res.* 640, 56-67.

Crespel A., Coubes P., Rousset M.C., Alonso G., Bockaert J., Baldy-Moulinier M., Lerner-Natoli M. (2002). Immature-like astrocytes are associated with dentate granule cell migration in human temporal lobe epilepsy. *Neurosci. Lett.* 330, 114-118.

Cunningham L.A., Short M.P., Breakefield X.O., Bohn M.C. (1994). Nerve growth factor released by transgenic astrocytes enhances the function of adrenal chromaffin cell grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 658, 219-231.

Cunningham L.A., Su C. (2002). Astrocyte delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in a mouse model of parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 174, 230-242.

Culmsee C., Stumm R.K., Schafer M.K., Weihe E., Krieglstein J. (1999). Clenbuterol induces growth factor mRNA, activates astrocytes, and protects rat brain tissue against ischemic damage. *Eur. J. Pharmacol.* 379, 33-45.

Doetsch F., Caille I., Lim D.A., Garcia-Verdugo J.M., Alvarez-Buylla A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 1-20.

Dinser R., Kreppel F., Zaucke F., Blank C., Paulsson M., Kochanek S., Maurer P. (2001). Comparison of long-term transgene expression after non-viral and adenoviral gene transfer into primary articular chondrocytes. *Histochem. Cell Biol.* 116, 69-77.

Du X., Stull N.D., Iacovitti L. (1995). Brain-derived neurotrophic factor works coordinately with partner molecules to initiate tyrosine hydroxylase expression in striatal neurons. *Brain Res.* 680, 229-233.

Duggal N., Schmidt-Kastner R., Hakim A.M. (1997). Nestin expression in reactive astrocytes following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 768, 1-9.

Dunn D.L. (1990). Problems related to immunosuppression. Infection and malignancy occurring after solid organ transplantation. *Crit. Care Clin.* 6, 955-977.

Espinosa de los Monteros A., Zhang M., De Vellis J. (1993). O2A progenitor cells transplanted into the neonatal rat brain develop into oligodendrocytes but not astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 50-54.

Eng L.F., Ghirnikar R.S., Lee Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439-1451.

Ericson C., Victorin K., Lundberg C. (2002). Ex vivo and in vitro studies of transgene expression in rat astrocytes transduced with lentiviral vectors. *Exp. Neurol.* 173, 22-30.

Fischer G. (1984). Growth requirements of immature astrocytes in serum-free hormonally defined media. *J. Neurosci. Res.* 12, 543-552.

- Fok-Seang J., Miller R.H. (1992). Astrocyte precursors in neonatal rat spinal cord cultures. *J. Neurosci.* 12, 2751-2764.
- Franklin R.J., Bayley S.A., Milner R., French-Constant C., Blakemore W.F. (1995). Differentiation of the O-2A progenitor cell line CG-4 into oligodendrocytes and astrocytes following transplantation into glia-deficient areas of CNS white matter. *Glia* 13, 39-44.
- Fritschy J.M., Brandner S., Aguzzi A., Koedood M., Luscher B., Mitchell P.J. (1996). Brain cell type specificity and gliosis-induced activation of the human cytomegalovirus immediate-early promoter in transgenic mice. *J. Neurosci.* 16, 2275-2282.
- Gash D.M., Zhang Z., Ovadia A., Cass W.A., Yi A., Simmerman L., Russell D., Martin D., Lapchak P.A., Collins F., Hoffer B.J., Gerhardt G.A. (1996). Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380, 252-255.
- Gerdes J., Lemke H., Baitsch H., Wacker H.H., Schwab U., Stein H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki 67. *J. Immunol.* 133, 1710-1715.
- Geschwind M.D., Hartnick C.J., Liu W., Amat J., Van De Water T.R., Federoff H.J. (1996). Defective HSV-1 vector expressing BDNF in auditory ganglia elicits neurite outgrowth: model for treatment of neuron loss following cochlear degeneration. *Hum. Gene Ther.* 7, 173-182.
- Gotz M., Hartfuss E., Malatesta P. (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain. Res. Bull.* 57, 777-788.
- Grinspan J.B., Stern J.L., Pustilnik S.M., Pleasure D. (1990). Cerebral white matter contains PDGF-responsive precursors to O2A cells. *J. Neurosci.* 10, 1866-1873.
- Groves A.K., Barnett S.C., Franklin R.J., Crang A.J., Mayer M., Blakemore W.F., Noble M. (1993). Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified O-2A progenitor cells. *Nature.* 362, 453-455.

Günzburg W.H., Salmons B. (1997). *Gentransfer in Säugetierzellen*. Spektrum Verlag.

Haase G., Kennel P., Pettmann B., Vigne E., Akli S., Revah F., Schmalbruch H., Kahn A. (1997). Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat. Med.* 3, 429-436.

Hartikka J., Hefti F. (1988). Development of septal cholinergic neurons in culture: plating density and glial cells modulate effects of NGF on survival, fiber growth, and expression of transmitter-specific enzymes. *J. Neurosci.* 8, 2967-2985.

Hefti F., Dravid A., Hartikka J. (1984). Chronic intraventricular injections of nerve growth factor elevate hippocampal choline acetyltransferase activity in adult rats with partial septal-hippocampal lesions. *Brain Res.* 293, 305-311.

Henderson C.E., Phillips H.S., Pollock R.A., Davies A.M., Lemeulle C., Armanini M., Simpson L.C., Moffet B., Vandlen R.A., Koliatsos V.E., Rosenthal A. (1994). GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science* 266, 1062-1064.

Hermens W.T.J.M.C., Verhaagen J. (1998). Viral vectors, tools for gene transfer in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 55, 399-432.

Hinterkeuser S., Schroder W., Hager G., Seifert G., Blumcke I., Elger C.E., Schramm J., Steinhauser C. (2000). Astrocytes in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy display changes in potassium conductances. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2087-2096.

Hida H., Hashimoto M., Fujimoto I., Nakajima K., Shimano Y., Nagatsu T., Mikoshiba K., Nishino H. (1999). Dopa-producing astrocytes generated by adenoviral transduction of human tyrosine hydroxylase gene: in vitro study and transplantation to hemiparkinsonian model rats. *Neurosci. Res.* 35, 101-112.

Hoane M.R., Gulwadi A.G., Morrison S., Hovanesian G., Lindner M.D., Tao W. (1999). Differential in vivo effects of neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp. Neurol.* 160, 235-243.

Huttmann K., Sadgrove M., Wallraff A., Hinterkeuser S., Kirchhoff F., Steinhauser C., Gray W.P. Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2769-2778.

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.

Joannides A., Gaughwin P., Scott M., Watt S., Compston A., Chandran S. (2003). Postnatal astrocytes promote neural induction from adult human bone marrow-derived stem cells. *J Hematother Stem Cell Res.* 12, 681-688.

Joannides A., Gaughwin P., Schwiening C., Majed H., Sterling J., Compston A., Chandran S. (2004). Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet* 364, 172-178.

Johansson S., Stromberg I. (2002). Guidance of dopaminergic neuritic growth by immature astrocytes in organotypic cultures of rat fetal ventral mesencephalon. *J. Comp. Neurol.* 443, 237-249.

Kalyani A., Hobson K., Rao M.S. (1997). Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. *Dev. Biol.* 186, 202-223.

Kempermann G., Kuhn H., Gage F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in enriched environment. *Nature* 386, 493-495.

Kim D.H., Gutin P.H., Noble L.J., Nathan D., Yu J.S., Nockels RP. (1996). Treatment with genetically engineered fibroblasts producing NGF or BDNF can accelerate recovery from traumatic spinal cord injury in the adult rat. *Neuroreport* 7, 2221-2225.

Kirschenbaum B., Goldman S.A. (1995). Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival of neurons arising from the adult rat forebrain subependymal zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 210-214.

Kniss D.A., Burry R.W. (1988). Serum and fibroblast growth factor stimulate quiescent astrocytes to re-enter the cell cycle. *Brain Res.* 439, 281-288.

Knusel B., Winslow J.W., Rosenthal A., Burton L.E., Seid D.P., Nikolics K., Hefti F. (1991). Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 961-965.

Kochanek S., Clemens P.R., Mitani K., Chen H., Chan S., Caskey C.T. (1996). A new adenoviral vector: replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and  $\beta$ -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5731-5736.

Kochanek S., Schnieder G., Volpers C. (2001). High capacity, gutless, adenoviral vectors. *Cur. Opin. Mol. Ther.* 3, 454-463.

Kordower J.H., Palfi S., Chen E.Y., Ma S.Y., Sendera T., Cochran E.J., Mufson E.J., Penn R., Goetz C.G., Comella C.D. (1999). Clinicopathological findings following intraventricular glial derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 46, 419-424.

Koyama R., Yamada M.K., Fujisawa S., Katoh-Semba R., Matsuki N., Ikegaya Y. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces hyperexcitable reentrant circuits in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 24, 7215-7224.

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

Kuhn H.G., Dickinson-Anson H., Gage F.H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 16, 2027-2033.

Kuroki T., Huh N. H.(1993). Why are human cells resistant to malignant cell transformation in vitro? *Jpn. J. Cancer Res.* 84, 1091-1100.

Kurozumi K., Nakamura K., Tamiya T., Kawano Y., Kobune M., Hirai S., Uchida H., Sasaki K., Ito Y., Kato K., Honmou O., Houkin K., Date I., Hamada H. (2004). BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol. Ther.* 9, 189-197.

Lachyankar M.B., Condon P.J., Quesenberry P.J., Litofsky N.S., Recht L.D., Ross A.H. (1997). Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF. *Exp. Neurol.* 144, 350-60.

La Gamma E.F., Wiesinger G., Lenn N.J., Strecker R.E. (1993). Genetically modified primary astrocytes as cellular vehicles for gene therapy in the brain. *Cell Transplant.* 2, 207-214.

Lambert W.S., Clark A.F., Wordinger R.J. (2004). Neurotrophin and Trk expression by cells of the human lamina cribrosa following oxygen-glucose deprivation. *BMC Neurosci.* 5, 51.

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

Lee S.H., Magge S., Spencer D.D., Sontheimer H., Cornell-Bell A.H. (1995). Human epileptic astrocytes exhibit increased gap junction coupling. *Glia* 15, 195-202.

Lee J.C., Mayer-Proschel M., Rao M.S. (2000). Gliogenesis in the central nervous system. *Glia* 30, 105-121. Levinson S.W., Goldman J.E. (1997). Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. *J. Neurosci. Res.* 48, 83-94.

Lin L.-F.H., Doherty D.H., Lile J.D., Bektesh S., Collins F. (1993). GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260, 1130-1132.

Lin Q., Cunningham L.A., Epstein L.G., Pechan P.A., Short M.P., Fleet C., Bohn MC. (1997). Human fetal astrocytes as an ex vivo gene therapy vehicle for delivering biologically active nerve growth factor. *Hum. Gene. Ther.* 8, 331-339.

Lin R.C., Matesic D.F., Marvin M., McKay R.D., Brustle O. (1995). Re-expression of the intermediate filament nestin in reactive astrocytes. *Neurobiol. Dis.* 2, 79-85.

Liu Y., Rao M.S. (2004). Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol. Cell* 96, 279-290.

Liu J., Solway K., Messing R.O., Sharp F.R. (1998). Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J. Neurosci.* 18, 7768-7778.

Lowenstein P.R., Wilkinson G.W.G., Castro M.G., Shering A.F., Fooks, A.R., Bain D. (1996). Non-neurotrophic adenovirus: a vector for gene transfer to the brain and possible gene therapy of neurological disorders. *Aus Neurosciences perspectives: Genetic manipulation of the nervous system.* 11-39. Academic press.

Lundberg C., Horellou P., Mallet J., Björklund A. (1996). Generation of DOPA-producing astrocytes by retroviral transduction of the human tyrosine hydroxylase gene: In vitro characterization and in vivo effects in the rat parkinson model. *Exp. Neurol.* 139, 39-53.

Luskin M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189.

Luskin M.B., Parnavelas J.G., Barfield J.A. (1993). Neurons, astrocytes, and oligodendrocytes of the rat cerebral cortex originate from separate progenitor cells: an ultrastructural analysis of clonally related cells. *J. Neurosci.* 13, 1730-1750.

Mayer-Proschel M., Rao M.S., Noble M., (1997). Progenitor cells of the central nervous system: a boon for clinical neuroscience. *J. NIH Res.* 9, 31-36.

Malatesta P., Hack M.A., Hartfuss E., Kettenmann H., Klinkert W., Kirchhoff F., Gotz M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37, 751-764.

Marroni M., Agrawal M.L., Kight K., Hallene K.L., Hossain M., Cucullo L., Signorelli K., Namura S., Bingaman W., Janigro D. (2003). Relationship between expression of multiple drug resistance proteins and p53 tumor suppressor gene proteins in human brain astrocytes. *Neuroscience* 121, 605-617.

Mattson M.P., Lovell M.A., Furukawa K., Markesbery W.R. (1995). Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 65, 1740-1751.

Menet V., Gimenez Y., Ribotta M., Sandillon F., Privat A. (2000). GFAP null astrocytes are a favorable substrate for neuronal survival and neurite growth. *Glia* 31, 267-272.

Mertz K.D., Weisheit G., Schilling K., Luers G.H. (2002). Electroporation of primary neural cultures: a simple method for directed gene transfer in vitro. *Histochem. Cell Biol.* 118, 501-506.

Mi H., Barres B.A. (1999). Purification and characterization of astrocyte precursor cells in the developing rat optic nerve. *J. Neurosci.* 19, 1049-1061.

Mohajeri M.H., Figlewicz D.A., Bohn M.C. (1999). Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent

motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Gene Ther.* 10, 1853-1866.

Nakafuku M., Nakamura S. (1995). Establishment and characterization of a multipotential neural cell line that can conditionally generate neurons, astrocytes, and oligodendrocytes in vitro. *J. Neurosci. Res.* 4, 153-168.

Niquet J., Ben-Ari Y., Represa A. (1994). Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *J. Neurocytol.* 23, 641-656.

Mi H., Haerberle H., Barres B.A. (2001). Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J. Neurosci.* 21, 1538-1547.

Okoye G.S., Freed W.J., Geller H.M. (1994). Short-term immunosuppression enhances the survival of intracerebral grafts of A7-immortalized glial cells. *Exp. Neurol.* 128, 191-201.

Parent J.M., Yu T.W., Leibowitz R.T., Geschwind D.H., Sloviter R.S., Lowenstein D.H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 17, 3727-3738.

Parent J.M., Janumpalli S., McNamara J.O., Lowenstein D.H. (1998). Increased dentate granule cell neurogenesis following amygdala kindling in the adult rat. *Neurosci. Lett.* 247, 9-12.

Paxinos G. und Watson C. (1986). *The rat brain in stereotactic coordinates.* Academic Press.

Pechan P.A., Yoshida T., Panahian N., Moskowitz M.A., Breakefield X.O. (1995). Genetically modified fibroblasts producing NGF protect hippocampal neurons after ischemia in the rat. *Neuroreport* 6, 669-672.

Pizzo D.P., Thal L.J. (2004). Intraparenchymal nerve growth factor improves behavioral deficits while minimizing the adverse effects of intracerebroventricular delivery. *Neuroscience* 124, 743-755.

Polkey C.E. (2004). Clinical outcome of epilepsy surgery. *Curr. Opin. Neurol.* 17, 173-178.

Poulsen F.R., Lauterborn J., Zimmer J., Gall C.M. (2004). Differential expression of brain-derived neurotrophic factor transcripts after pilocarpine-induced seizure-like activity is related to mode of Ca<sup>2+</sup> entry. *Neuroscience* 126, 665-676.

Pringle N.P., Guthrie S., Lumsden A., Richardson W.D. (1998). Dorsal spinal cord neuroepithelium generates astrocytes but not oligodendrocytes. *Neuron* 20, 883-893.

Rao M.S., Mayer-Proschel M. (1997). Glial restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. *Dev. Biol.* 188, 48-63.

Rao M.S., Noble M., Mayer-Proschel M. (1998). A tripotential glial precursor cell is present in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3996-4001.

Raff M.C., Abney E.R., Cohen J., Lindsay R., Noble M. (1983). Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surface gangliosides, and growth characteristics. *J. Neurosci.* 3, 1289-1300.

Raff M.C., Williams B.P., Miller R.H. (1984). The *in vitro* differentiation of a bipotential glial progenitor cell. *EMBO J.* 3, 1857-1864.

Ridet J.L., Sarkis C., Serguera C., Zennou V., Charneau P., Mallet J. (2003). Transplantation of human adult astrocytes: Efficiency and safety requirements for an autologous gene therapy. *J. Neurosci. Res.* 72, 704-708.

Ridet J.L., Corti O., Pencalet P., Naima H., Hamon M., Philippon J., Mallet J. (1999). Toward autologous *ex vivo* gene therapy for the central nervous system with human adult astrocytes. *Hum. Gen. Ther.* 10, 271-280.

Riss T.L., Moravec R.A. (1992). Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell* 3, 184a.

Riley C.P., Cope T.C., Buck C.R. (2004). CNS neurotrophins are biologically active and expressed by multiple cell types. *J. Mol. Histol.* 35, 771-783.

Roberts P., Chumas P.D., Picton S., Bridges L., Livingstone J.H., Sheridan E. (2001). A review of the cytogenetics of 58 pediatric brain tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* 131, 1-12.

Roy N.S., Wang S., Jiang L., Kang J., Benraiss A., Harrison-Restelli C., Fraser R.A.R., Couldwell W.T., Kawaguchi A., Okano H., Nedergaard M., Goldman S.A. (2000). In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nature Med.* 6, 271-277.

Rosser A.E., Tyers P., ter Borg M., Dunnett S.B., Svendsen C.N. (1997). Co-expression of MAP-2 and GFAP in cells developing from rat EGF responsive precursor cells. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 98, 291-295.

Rygaard J., Povlsen C.O. (1969). Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 77, 758-760.

Sager R., Tanaka K., Lau C.C., Ebina Y., Anisowicz A. (1983). Resistance of human cells to tumorigenesis induced by cloned transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7601-7605.

Sauer H., Rosenblad C., Björklund 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8935-8939.

Scharfman H., Goodman J., Macleod A., Phani S., Antonelli C., Croll S. (2005). Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp. Neurol.* 192, 348-356.

Scharfman H.E., Goodman J.H., Sollas A.L. (1999). Actions of brain-derived neurotrophic factor in slices from rats with spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 19, 5619-5631.

Schiedner G., Morral N., Parks R.J., Wu Y., Koopmans S.C., Langston C., Graham F.L., Beaudet A.L., Kochanek S. (1998). Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat. Genet.* 18, 180-183.

Schinstine M., Iacovitti L. (1996). Expression of neuronal antigens by astrocytes derived from EGF-generated neuroprogenitor cells. *Exp. Neurol.* 141, 67-78.

Schwarz S.C., Kupsch A.R., Banati R., Oertel W.H. (1996). Cellular immune reactions in brain transplantation: effects of graft pooling and immunosuppression in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Glia* 17, 103-120.

Schwarz J.P., Wilson D.J. (1992). Preparation and characterization of type 1 astrocytes cultured from adult rat cortex, cerebellum and striatum. *Glia* 5, 75-80.

Scolding N.J., Rayner P.J., Sussman J., Shaw C., Compston D.A. (1999). Identification of A2B5-positive putative oligodendrocyte progenitor cells and A2B5-positive astrocytes in human white matter. *Neuroscience* 89, 1-4.

Scolding N.J., Rayner P.J., Sussman J., Shaw C., Compston D.A. (1995). A proliferative adult human oligodendrocyte progenitor. *NeuroReport* 6, 441-445.

Scorza C.A., Arida R.M., Cavalheiro E.A., Naffah-Mazzacoratti M.G., Scorza F.A. (2005). Expression of nestin in the hippocampal formation of rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. *Neurosci. Res.* 51, 285-291.

- Seidman K.J., Teng A.L., Rosenkopf R., Spilotro P., Weyhenmeyer J.A. (1997). Isolation, cloning and characterization of a putative type-1 astrocyte cell line. *Brain Res.* 753, 18-26.
- Selkirk S.M., Greenberg S.J., Plunkett R.J., Barone T.A., Lis A., Spence P.O. (2002). Syngeneic central nervous system transplantation of genetically transduced mature, adult astrocytes. *Gene Ther.* 9, 432-443.
- Semkova I., Schilling M., Henrich-Noack P., Rami A., Kriegstein J. (1996). Clenbuterol protects mouse cerebral cortex and rat hippocampus from ischemic damage and attenuates glutamate neurotoxicity in cultured hippocampal neurons by induction of NGF. *Brain Res.* 717, 44-54.
- Semkova I., Kriegstein J. (1999). Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Res. Rev.* 30, 176-188.
- Seri B., Garcia-Verdugo J.M., Mc Ewen B.S., Alvarez-Buylla A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.* 21, 7153-7160.
- Sheldon T. (2000). European ethicists discuss stem cell research. *Nat. med.* 6, 845.
- Shetty A.K., Zaman V., Shetty G.A. (2003). Hippocampal neurotrophin levels in a kainate model of temporal lobe epilepsy: a lack of correlation between brain-derived neurotrophic factor content and progression of aberrant dentate mossy fiber sprouting. *J. Neurochem.* 87, 147-159.
- Shigeno T., Mima T., Takakura K., Graham D.I., Kato G., Hashimoto Y., Furukawa S. (1991). Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J. Neurosci.* 11, 2914-2919.
- Shih D.T., Lee D.C., Chen S.C., Tsai R.Y., Huang C.T., Tsai C.C., Shen E.Y., Chiu W.T. (2005). Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue. *Stem Cells.* 23, 1012-1020.

Shimohama S., Ogawa N., Tamura Y., Akeike A., Tsukahara T., Iwata H., Kimura J. (1993). Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 632, 296-302.

Shin S.I., Freedman V.H., Risser R., Pollack R. (1975). Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 4435-4439.

Song H., Stevens C.F., Gage F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44.

Soulillou J.P., Giral M. (2001). Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation* 72, 89-93.

Spranger M., Lindholm D., Bandtlow C., Heumann R., Gnahn H., Naher-Noe M., Thoenen H. (1990). Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in the rat central nervous system: Comparison between the effects of Interleukin-1 and various growth factors in astrocyte cultures and in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 2, 69-76.

Staecker H., Gabaizadeh R., Federoff H., Van De Water T.R. (1998). Brain-derived neurotrophic factor gene therapy prevents spiral ganglion degeneration after hair cell loss. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 119, 7-13.

Sturrock R.R. (1982). Gliogenesis in the prenatal rabbit spinal cord. *J. Anat.* 134, 771-793.

Tabernero A., Lavado E.M., Granda B., Velasco A., Medina J.M. (2001). Neuronal differentiation is triggered by oleic acid synthesized and released by astrocytes. *J. Neurochem.* 79, 606-616.

Takahashi M., Hayashi S., Kakita A., Wakabayashi K., Fukuda M., Kameyama S., Tanaka R., Takahashi H., Nawa H. (1999). Patients with temporal lobe epilepsy show an increase in brain-derived neurotrophic factor protein and its correlation with neuropeptide Y. *Brain. Res.* 818, 579-582.

- Tinsley R.B., Vesey M.J., Barati S., Rush R.A., Ferguson I.A. (2004). Improved non-viral transfection of glial and adult neural stem cell lines and of primary astrocytes by combining agents with complementary modes of action. *J. Gene Med.* 6, 1023-1032.
- Tom V.J., Doller C.M., Malouf A.T., Silver J. (2004). Astrocyte-associated fibronectin is critical for axonal regeneration in adult white matter. *J. Neurosci.* 24, 9282-9290.
- Tomac A., Lindquist E., Lin L.F., Ogren S.O., Young D., Hoffer B.J., Olson L. (1995). Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 373: 335-339.
- Tomaselli K.J., Neugebauer K.M., Bixby J.L., Lilien J., Reichardt L.F. (1988). N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron* 1, 33-43.
- Tornatore C., Baker-Cairns B., Yadid G., Hamilton R., Meyers K., Atwood W., Cummins A., Tanner V., Major E. (1996). Expression of tyrosine hydroxylase in an immortalized human fetal astrocyte cell line; in vitro characterization and engraftment into the rodent striatum. *Cell Transplant.* 5, 145-163.
- Trotter J., Schachner M. (1989). Cells positive for the O4 surface antigen isolated by cell sorting are able to differentiate into astrocytes or oligodendrocytes. *Brain . Res. Dev. Brain Res.* 46, 115-122.
- Tuszynski M.H., U H.S., Amaral D.G., Gage F.H. (1990). Nerve growth factor infusion in the primate brain reduces lesion-induced cholinergic neuronal degeneration. *J. Neurosci.* 10, 3604-3614.
- Tuszynski M.H. (2000). Intraparenchymal NGF infusions rescue degenerating cholinergic neurons. *Cell Transpl.* 9, 629-636.
- Ullian E.M., Sapperstein S.K., Christopherson K.S., Barres B.A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science* 291, 657-661.

- Verma R. and Babu A. (1989). Human chromosomes, manual of basic techniques. Pergammon Press, 42-47.
- Vescovi A.L., Reynolds B.A., Fraser D.D., Weiss S. (1993). bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron* 11, 951-966.
- Vicario-Abejon C., Yusta-Boyo M.J., Fernandez-Moreno C., de Pablo F. (2003). Locally born olfactory bulb stem cells proliferate in response to insulin-related factors and require endogenous insulin-like growth factor-I for differentiation into neurons and glia. *J. Neurosci.* 23, 895-906.
- Weis C., Marksteiner J., Humpel C. (2001). Nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor restore the cholinergic neuronal phenotype in organotypic brain slices of the basal nucleus of Meynert. *Neurosci.* 102, 129-138.
- Wennstrom M., Hellsten J., Ekdahl C.T., Tingstrom A. (2003). Electroconvulsive seizures induce proliferation of NG2-expressing glial cells in adult rat hippocampus. *Biol. Psychiatry.* 54, 1015-1024.
- Wiebe S. (2004). Effectiveness and safety of epilepsy surgery: what is the evidence? *CNS Spectr.* 9, 120-122, 126-132.
- Williams B.P., Price J. (1995). Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron* 14, 1181-1188.
- Wagner J., Akerud P., Castro D.S., Holm P.C., Canals J.M., Snyder E.Y., 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.
- Wang Z.H., Ji Y., Shan W., Zeng B., Raksadawan N., Pastores G.M., Wisniewski T., Kolodny E.H. (2002). Therapeutic effects of astrocytes expressing both tyrosine hydroxylase and brain-derived neurotrophic factor on a rat model of Parkinson's

disease. *Neuroscience* 113, 629-640.

Wang N., Zeng M., Ruan Y., Wu H., Chen J., Fan Z., Zhen H. (2002). Protection of retinal ganglion cells against glaucomatous neuropathy by neurotrophin-producing, genetically modified neural progenitor cells in a rat model. *Chin. Med. J. (Engl)*. 115, 1394-1400.

Watson R. (2000). EU institutions divided on therapeutic cloning. *BMJ* 321, 658.

Yamamoto H., Gurney M.E. (1990). Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.* 10, 3469-3478.

Yan Q., Matheson C., Lopez O. (1995). In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* 373, 341-344.

Yanai J., Doetchman T., Laufer N., Maslaton J., Mor-Yosef S., Safran A., Shani M., Sofer D. (1995). Embryonic cultures but not embryos transplanted to the mouse's brain grow rapidly without immunosuppression. *Int. J. Neurosci.* 81, 21-26.

Yong V.W., Kim S.U., Pleasure D.E. (1988). Growth factors for fetal and adult human astrocytes in culture. *Brain Res.* 444, 59-66.

Yong V.W., Moumdjian R., Yong F.P., Ruijs T.C., Freedman M.S., Cashman N., Antel J.P. (1991). Gamma-interferon promotes proliferation of adult human astrocytes in vitro and reactive gliosis in the adult mouse brain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7016-7020.

Zhang S.C., Lipsitz D., Duncan I.D. (1998). Self-renewing canine oligodendroglial progenitor expanded as oligospheres. *J. Neurosci. Res.* 54, 181-190.

Zhang Y., Pardridge W.M. (2001). Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system. *Stroke* 32, 1378-1384.

**Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren in Marburg:**

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Behr, Beyer, Bertalanffy, Bien, Braun, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Gemsa, Geus, Görg, Gotzen, Griss, Groß, Grzeschik, Gudermann, Happel, Hasilik, Hemmer, Hofmann, Joseph, Jungclas, Kann, Kern, Klaus, Klenk, Klingmüller, Klose, König, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuni, Lammel, Lange, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch, Mennel, Merte, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Plaul, Renschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer H, Schäfer J, Schäfer M, Schnabel, Schneider, Schüffel, Seifart, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Seyberth, Steiniger, Straßmann, Stempel, Sure, Suske, Vogelmeier, Vohland, Wagner H-J, Wagner U, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wolf, Wulf

**Meine akademischen Lehrer waren Herren in Köln:**

Addicks, Arnhold, Klinz

**Meine akademischen Lehrer waren Herren in Kapstadt:**

Naidoo, Nickel

**Meine akademischen Lehrer waren Herren in London:**

Blau, Duncan, Shorvon, Sisodya

**Danksagung:**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Klaus Addicks für die Überlassung des Themas und die gewährte fachliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Eberhard Weihe für seine Unterstützung und Bereitschaft, diese extern angefertigte Arbeit vor dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zu vertreten.

Allen Mitarbeitern des Institut I für Anatomie der Universität Köln bin ich zu großem Dank verpflichtet für die wertvollen fachlichen Ratschläge und Ihre kollegiale Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Franz-Josef Klinz und Herrn PD Dr. Stefan Arnhold danke ich herzlich für die sehr gute Betreuung und die Korrektur dieser Arbeit.

Meiner Familie danke ich für die unermüdliche Unterstützung während der ganzen Jahre.

