

Abteilung Neuroanatomie

■ Direktorin: Prof. Dr. rer. nat. Claudia Grothe

Forschungsprofil

In der Abteilung Neuroanatomie stehen Fragen zur Funktion neuronaler Wachstumsfaktoren bei der Entwicklung des Nervensystems und bei neurodegenerativen Erkrankungen im Mittelpunkt des Interesses. Neben der Expression, Regulation und Funktion von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren ist der mögliche Einsatz solcher Substanzen bei der Etablierung neuer therapeutischer Strategien zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen Gegenstand der Untersuchungen. Besonders intensiv werden Mitglieder der Fibroblastenwachstumsfaktor-Familie (FGF-2, FGF-20) und neurotrophe Zytokine (Interleukin-6, CNTF) analysiert. Die Studien werden an neuronalen und glialen Zellkulturen, in in vivo-Läsions-Tiermodellen und an Mausmutanten des FGF-2 Systems durchgeführt. Hauptsächlich werden fetale mesenzephalale dopaminerge Neurone bzw. dopaminerge Progenitorzellen und spinale Motoneurone des zentralen Nervensystems sowie periphere Nerven und Spinalganglien untersucht. Darüber hinaus werden die biochemischen und molekularen Interaktionen insbesondere von FGF-2 analysiert, um die Wirkungskaskaden des Faktors aufzuklären.

Forschungsprojekte

Genetisch modifizierte dopaminerge Progenitorzellen – Charakterisierung und morphologische und funktionelle Evaluation in vitro und nach intrastriateller Transplantation in vivo

Morbus Parkinson ist durch den progredienten Verlust dopaminergener Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra des Mesenzephalons gekennzeichnet. Als aussichtsreiche, alternative Behandlungsstrategie gilt die Zelltransplantation, die auf dem Konzept basiert, dass die degenerierten dopaminergen Neurone substituiert werden. In der klinischen Anwendung wurden bisher embryonale mesenzephalale Zellen intrastriatal implantiert. Die Verwendung embryonaler mesenzephalaler Neurone ist aus praktischen und ethischen Gründen beschränkt und bietet keine standardisierte Zellquelle. Außerdem überleben nur ein bis fünf Prozent der transplantierten Zellen. Die Verwendung neuraler Progenitorzellen als standardisierte Zellquelle in Kombination mit neurotrophen Faktoren, die die dopaminerge Differenzierung und das Überleben der transplantierten Zellen stimulieren, ist ein aussichtsreicher experimenteller Ansatz bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien des Morbus Parkinson und ist Gegenstand des Projektes. In dem interdisziplinärem Vorhaben werden native und genetisch veränderte (Überexpression von FGF-2 Isoformen und von FGF-20) Progenitorzellen in vitro und nach intrastriateller Transplantation vergleichend im Hinblick auf morphologische,

morphometrische, verhaltensbiologische und elektrophysiologische Parameter analysiert.

Im Mittelpunkt der *in vitro* Arbeiten steht die Propagierung und Differenzierung dopaminerger Neurone und deren anschließende genetische Modifikation (mittels Elektroporation oder Lipofectamine). Dopaminerge Neurone werden aus Progenitorzellen des ventralen Mesenzephalons embryonaler Ratten (E12) gewonnen. Dazu werden Dissoziate der ventralen Mesenzephalie unter experimentell ermittelten Bedingungen expandiert und zum dopaminergen Phänotyp hin differenziert. Abbildung 1 zeigt den Anteil dopaminerger Neurone (Tyrosinhydroxylase-immunreaktiv) an der Gesamtneuronpopulation (β III-Tubulin-immunreaktiv). Die höchste Anzahl hochangereicherter dopaminerger Neurone ist nach fünfzügiger Kultur unter Differenzierungsbedingungen zu erhalten.

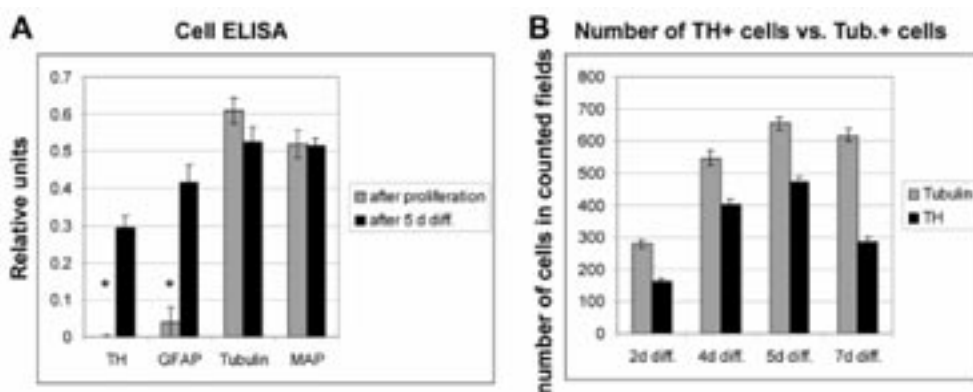


Abb.1: A zeigt die Erhöhung des Anteils dopaminerger Neurone (TH-immunreaktiv) unter fünfzügiger Differenzierungsbedingung. Während auch der Anteil der Astrozyten (GFAP) zugenommen hat, ist die Gesamtneuronpopulation unverändert (β III-Tubulin, MAP). In Abbildung 1 B ist ersichtlich, dass der Anteil dopaminerger Neurone (TH) an der Gesamtneuronpopulation (β III-Tubulin) nach fünfzügiger Differenzierungsphase am höchsten ist.

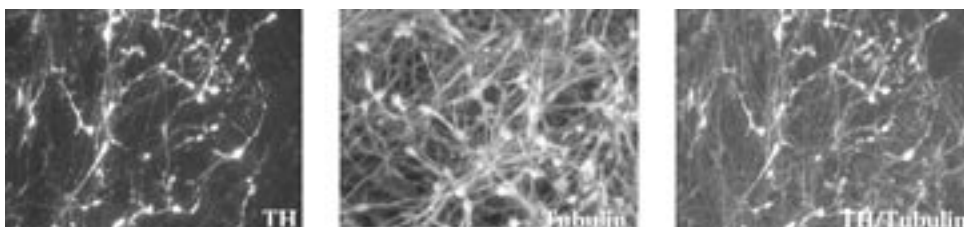


Abb. 2: zeigt repräsentative Kulturbilder nach fünfzügiger Differenzierung.

Eine Veränderung dopaminerger Markermoleküle konnte mittels semiquantitativer RT-PCR in differenzierten versus immaturren Kulturen beobachtet werden.

Die Eigenschaften der dopaminergen Progenitorzellen wurden *in vivo* nach intrastriateller Transplantation im Morbus Parkinson-Modell der Ratte verhaltensbiologisch und morphometrisch analysiert und mit Präparationen der ventralen Mesenzephalie der E14 Ratte, die bisher

übliche Zellquelle in diesem Modell, verglichen. Die funktionelle Verbesserung der Tiere zeigte sich in Abhängigkeit von der Dauer der Differenzierungsphase *in vitro*. Nach viertägiger Differenzierung konnten mit dopaminergen Progenitorzellen gleich gute funktionelle Verbesserungen erzielt werden wie mit E14 Kulturen.

Die morphometrische Auswertung hinsichtlich der Anzahl der überlebenden dopaminergen Neurone 15 Wochen nach intrastriateller Transplantation ergab ein ähnliches Bild wie die Verhaltensdaten. Etwa gleiche Anzahl und gleiche Dichte TH-positiver Zellen zeigte sich in den experimentellen Gruppen, die E14 Zellsuspensionen und dopaminerge Progenitorzellen nach viertägiger Differenzierungsphase erhielten (Abb. 3).

Zur Zeit wird die Transfektion der Progenitorzellen etabliert. Dabei haben sich die Me-

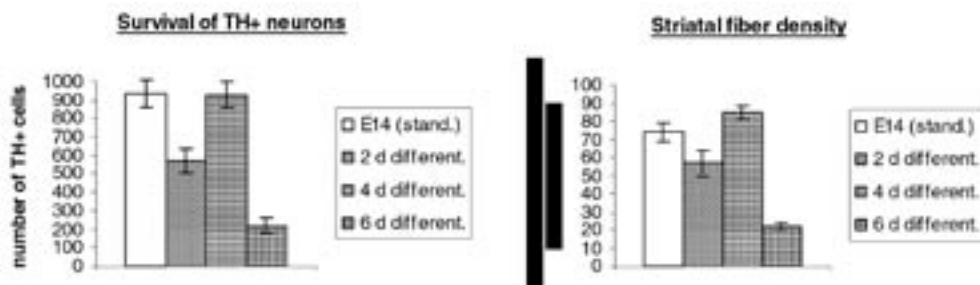


Abb.3

thode der Elektroporation und der Einsatz von Lipofectamine bewährt. Erste Befunde zeigen eine Transfektionsrate von ca. 20–30% BIII-Tubulin-positiver Zellen. Eine Erhöhung der Rate wird zur Zeit verfolgt, indem die Transfektion zu unterschiedlichen Phasen der Kultur mit anschließender Anreicherung der transfizierten Zellen vorgenommen wird. Auch transfizierte TH-positive Neurone konnten identifiziert werden. Nächster Schritt ist die Transplantation genetisch manipulierter Progenitorzellen im Rattenmodell des Morbus Parkinson.

■ Verantwortlicher Projektleiter: Prof. Dr. C. Grothe; Drittmittel: PhD-Stipendium, Zentrum Systemische Neurowissenschaften (ZSN) Hannover

Elektrophysiologische Untersuchungen *in vitro* und im M. Parkinson-Model der Ratte nach Transplantation genetisch modifizierter DA-Progenitorzellen.

■ Projektleiter: Prof. Dr. Claudia Grothe, Prof. Dr. Johannes Bufler (Neurologie, MHH); Förderung: PhD-Stipendium, Zentrum Systemische Neurowissenschaften (ZSN) Hannover

Analyse des nigrostriatalen Systems in Mausmutanten (FGF-2 ko; TgFGF-2), in intakten Tieren und nach Neurotoxin-Läsion (6-OHDA) der DA-Neurone

■ Projektleiter: Prof. Dr. Claudia Grothe

Fibroblastenwachstumsfaktoren: Signaltransduktionswege und ihre Regulation durch einen neuen Inhibitor.

■ Projektleiter: Prof. Dr. C. Grothe, Prof. Dr. D. Ron, Haifa; Förderung: Niedersächsisch-Israelische Forschungsförderung durch das MWK

Interaktives Testen und Optimierung der Effekte von Polysialinsäure-Matrizes in Zell-Systemen basierend auf DNA Microarray-Techniken.

■ Projektleiter: Prof. Dr. C. Grothe, Prof. Dr. T. Scheper, Universität Hannover; Förderung: DFG-Forschergruppe

Analyse des FGF-2 Systems im peripheren Nervensystem bei Mausmutanten.

■ Projektleiter: Prof. Dr. C. Grothe, Dr. Julia Jungnickel; Förderung: DFG

Funktionelle in vivo-Untersuchung zur Rolle des FGF-2 Systems bei der Regeneration peripherer Nerven - Einsatz genetisch veränderter neonataler Schwann Zellen im in vivo-Regenerationsmodell des Nervus ischiadicus der adulten Ratte

■ Projektleiter: Dr. Kirsten Haastert, Prof. Dr. Claudia Grothe; Förderung: DFG, Internationale Stiftung Neurobionik

Einsatz genetisch veränderter adulter Schwann-Zellen in Interponaten zur Steigerung der funktionellen Wiederherstellung nach Verletzungen des peripheren Nervensystems

■ Projektleiter: Dr. Kirsten Haastert; Förderung: Kogge-Stiftung für veterinär-medizinische Forschung

Morphometrische Untersuchung des Einflusses von Polysialinsäure auf die Entwicklung peripherer Nerven im Mausmodell

■ Projektleiter: Prof. Dr. Claudia Grothe, Dr. Kirsten Haastert gemeinsam mit Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn, Dr. Birgit Weinhold, Abteilung Zelluläre Chemie, MHH; Förderung: DFG

Untersuchung zur Kalzium-induzierten Kalzium-Freisetzung im Rahmen von AMPA-Rezeptor-vermittelter Exozytotoxizität in spinalen Ratten-Motoneuronen

■ Projektleiter: Dr. Kirsten Haastert gemeinsam mit Dr. Julian Großkreutz, Prof. Dr. Bufler, Abteilung Neurologie, MHH; Förderung: HILF, DFG

Pharmakologische Beeinflussung der Expression des Survival of Motoneuron-Proteins in spinalen Ratten-Motoneuronen

■ Projektleiter: Dr. Kirsten Haastert, Dr. Peter Claus gemeinsam mit Dr. Eric Hahnen, Prof. Dr. Ingmar Blümcke, Universität Erlangen-Nürnberg

Untersuchungen zur Interaktion des Survival of Motoneuron-Proteins SMN mit dem neurotrophen Fibroblastenwachstumsfaktor –2 (FGF-2): Bedeutung für die molekulare Pathologie der Spinalen Muskelatrophie

■ Projektleiter: Dr. Peter Claus; Förderung: Fritz Thyssen Stiftung

Interaktion des Survival of Motoneuron-Proteins SMN mit dem neurotrophen Fibroblastenwachstumsfaktor –2 (FGF-2)

■ Projektleiter: Dr. Peter Claus; Förderung: Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM)

Analyse von Mutanten des Survival of Motoneuron-Proteins SMN in Motoneuronen

■ Projektleiter: Dr. Kirsten Haastert, Dr. Peter Claus

Originalpublikationen

Mauritz C, Grothe C, Haastert K. Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells. *J Neurosci Res* 77(3):453-461, 2004.

Gringel S, van Bergeijk J, Haastert K, Grothe C, Claus P Nuclear fibroblast growth factor-2 interacts specifically with splicing factor SF3a66. *Biol Chem* 385(12): 1203-1208, 2004.

Nindl W., Kavakebi P., **Claus P., Grothe C.**, Pfaller K., Klimaschewski, L. : Expression of FGF-2 isoforms in postmitotic sympathetic neurons: synthesis, nuclear transport and involvement in karyokinesis. *Neuroscience*.124: 561-572, 2004.

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

Claus P, Bruns AF, Grothe C.: Fibroblast

growth factor-223 is binding directly to the survival of motoneuron protein and is associated with small nuclear RNAs. *Biochem J.* 384: 559-565, 2004.

Jungnickel, J., Gransalke, K., Timmer, M., Grothe, C.: Fibroblast growth factor receptor 3 signaling regulates injury-related effects in the peripheral nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* 25(1): 21-9, 2004.

Jungnickel, J., Claus, P., Gransalke, K., Timmer, M., Grothe, C.: Targeted disruption of the FGF-2 gene affects the response to peripheral nerve injury. *Mol. Cell. Neurosci.* 25(3): 444-52, 2004.

Timmer, M., Kloth, V., Scholz, T., Winkler, C., Grothe, C.^{CA*}, Nikkhah, G.*: Enhanced functional recovery and reinnervation of intrastriatal dopamine-grafts co-transplanted with physiological Schwann cells over-expressing high molecular weight FGF-2 isoforms. *Exp. Neurol.* 187(1), 118-36, 2004. CA Corresponding Author; * contributed equally

Petri S, Krampfl K, Hashemi F, Schmalbach S, **Grothe C**, Hori A, Dengler R, Bufler J.: The mRNA expression of AMPA type glutamate receptors in the primary motor cortex of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an in situ hybridization study. *Neurosci Lett.* 360(3): 170-4, 2004.

Grothe C, **Timmer M**, Scholz T, Winkler C, Nikkhah G, **Claus P**, Itoh N, Arenas E: Fibroblast growth factor-20 promotes the dopaminergic differentiation of Nurr1-overexpressing neural stem cells. *Neurobiol. Dis.* 17, 163-170, 2004.

Haastert K, Grosskreutz J, Jaeckel M, Laderer C, Bufler J, **Grothe C.**, **Claus P.** (2004): Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann cells – a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level in vitro. *J. Neurosci. Methods*, [available online 22 October 2004, doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.09.003].

Abstracts

2004 wurden 24 Abstracts publiziert.

Diplomarbeiten

Rydel-Könecke K. (Dipl.- Biochem.): Analyse des survival of motoneuron (SMN) Protein-Komplexes mit small interfering RNA (siRNA).

Van Bergeijk J. (Dipl.- Biochem.): Anreicherung und Kultivierung embryonaler Motoneurone zur Untersuchung der Lokalisation des survival of motoneuron Proteins (SMN) und seiner Interaktionspartner.