

Institut für Neuroanatomie

■ Direktor: Prof. Dr. Claudia Grothe

Tel.: 0511/532-2896 • E-Mail: neuroanatomie@mh-hannover.de • www.mh-hannover.de/neuroanatomie.html

■ Keywords: BIOHYBRID; Nervenimplantate; FGF-2; dopaminerge Neurone; Nervenregeneration; Spinale Muskelatrophie; Amyotrophe Lateralsklerose; Nerveninterponat; Neuroinfektion; Synuclein

Forschungsprofil

Im Mittelpunkt unseres wissenschaftlichen Interesses steht die physiologische Rolle neurotropher Faktoren während der neuronalen Entwicklung und bei De- und Regenerationsvorgängen im Nervensystem sowie die potentielle therapeutische Applikation neurotropher Faktoren bei neurodegenerativen Erkrankungen. Besonderes Interesse liegt dabei auf den zellulären und molekularen Interaktionen beim Morbus Parkinson, der Spinalen Muskelatrophie und der peripheren Nervenregeneration. Die verschiedenen Fragestellungen werden *in vitro* und *in vivo* unter Verwendung entsprechender Mausmutanten und geeigneter Tiermodelle bearbeitet. Erkenntnisse aus diesen Studien bilden die Grundlage für die Entwicklung alternativer therapeutischer Strategien. Die Effizienz der Applikation gentechnisch modifizierter Zellen evaluieren wir in entsprechenden Rattenmodellen des Morbus Parkinson und nach peripherer Nervenläsion im Hinblick auf die morphologische und funktionelle Integration der transplantierten dopaminergen Neurone (Morbus Parkinson) und Schwann-Zellen (periphere Nerven). Am Institut für Neuroanatomie wird ein EU-Konsortium koordiniert, das Chitosan-basierte periphere Nerveninterponate - angereichert mit luminalen Strukturgebern sowie neurotrophen Faktoren und/oder gentechnisch modifizierten Zellen - entwickelt.

Forschungsprojekte

Zellersatztherapien im Tiermodell des Morbus Parkinson

Verminderte Bewegungen, erhöhte Muskelspannung und Zittern gehören zu den dominierenden körperlichen Einschränkungen bei Morbus Parkinson. Diesem Krankheitsbild liegt eine sich in zunehmendem Maße verschlechternde Feinabstimmung bei der Koordination von Bewegungsabläufen im Gehirn zugrunde. Normalerweise werden initiale Bewegungsimpulse aus dem motorischen Kortex nachfolgend in einem Rückkopplungskreislauf von miteinander verschalteten Kerngebieten, wie zum Beispiel Striatum, Globus pallidus, Nucleus subthalamicus und Substantia nigra, moduliert. Bei Morbus Parkinson treten in diesen Kerngebieten stark veränderte neuronale Aktivitätsmuster auf, die ursächlich auf einer Unterversorgung des Striatums mit dem Botenstoff Dopamin (DA) beruhen. DA wird von spezialisierten Neuronen in der Substantia nigra des Mittelhirns gebildet und gelangt über lange Zellfortsätze (Axone) in das Striatum. Das vermehrte Absterben dieser DA Neurone im Verlauf der Erkrankung liefert daher die Ursache für die eingangs beschriebenen körperlichen Einschränkungen.

Im Tiermodell des Morbus Parkinson lässt sich der Verlust der DA Neurone gezielt modellieren. Zunächst wird das spezifische Neurotoxin 6-Hydroxydopamin mittels eines stereotaktischen Injektionsapparats auf der rechten Hirnhälfte punktgenau appliziert, wodurch es zum selektiven Absterben der DA Neurone in der Substantia nigra kommt. Bei diesen Parkinson-Ratten lässt sich mithilfe von speziellen Verhaltenstests ein verminderter Gebrauch der linken Vorderpfote, beispielsweise beim Fressen oder beim Erkundungsverhalten, feststellen. Unsere Arbeitsgruppe verwendet seit mehreren Jahren dieses Rattenmodell, um verschiedene therapeutische Ansätze zu untersuchen. Bei der Zellersatztherapie werden DA Neurone in der Zellkultur differenziert und anschließend als Zellsuspension in das Striatum der Parkinson-Ratten stereotaktisch transplantiert (Abb. 1). Nur wenn genügend DA Neurone den Trans-

plantationsvorgang und die Ansiedlung im Zielgewebe überleben, kann genügend DA freigesetzt werden, um eine quantitativ messbare Verbesserung im Verhalten der Tiere zu bewirken.

In einer vorangegangenen Studie konnten wir in Zusammenarbeit mit der Klinik für Neurochirurgie zeigen, dass Transplantate aus embryonalem Mittelhirngewebe der Ratte nicht nur eine Verbesserung der motorischen Verhaltenstests, sondern auch eine Normalisierung der Überaktivität des Nucleus subthalamicus bewirken. In einer weiterführenden Arbeit wurden nun, in Kooperation mit der Zellulären Biophysik (Jülich), die elektrophysiologischen Eigenschaften der transplantierten DA Neurone selbst an Gewebeschnitten über mehrere Monate nach der Transplantation untersucht. Um diese Zellen eindeutig identifizieren zu können, wurde ein Mausstamm verwendet, welcher das grün-leuchtende eGFP-Protein speziell in DA Neuronen exprimiert (Abb. 1A, E). In einer weiteren Studie wurde getestet, ob sich das Überleben der transplantierten DA Neurone durch die Überexpression der hochmolekularen Isoform des Fibroblasten-Wachstumsfaktors-2 (FGF-2-HMW) steigern lässt (Abb. 1B, F). Jedoch konnte keine weitere Verbesserung bei der Gruppe mit FGF-2-HMW transfizierten Transplantaten im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden, obwohl bei Zellkulturversuchen FGF-2-HMW die Anzahl der DA Neurone erhöhte.

Eine alternative Zellquelle für die Gewinnung von DA Neuronen, gegenüber dem embryonalen Mittelhirn, stellen induzierte pluripotente Stammzellen (iPS Zellen) dar. In Zusammenarbeit mit der Neurologie und der HTTG-Chirurgie wurden iPS Zellen, die aus humanem Nabelschnurblut generiert wurden, in der Zellkultur zu DA Neuronen differenziert. Dabei wurden zwei verschiedene Differenzierungsprotokolle verglichen, wobei sich ein erhöhter Anteil an DA Neuronen bei Protokoll 2 ergab. Die Transplantation von mit Protokoll 1 differenzierten Zellen in das Striatum der Ratte zeigte einen weiteren Nachteil - eine sehr hohe Zellteilungsrate, die bei zwei von vier Tieren zu sehr großvolumigen Transplantaten führte (Abb. 1 C). Im Unterschied dazu war die Zellteilungsrate bei mit Protokoll 2 differenzierten Zellen stark vermindert und die Transplantatgröße normal (Abb. 1 D). Da die Anzahl der überlebenden DA Neurone bei den Protokoll 2 Transplantaten jedoch gering war, sind Optimierungen im Transplantationsprotokoll nötig, um die guten Differenzierungsergebnisse der Zellkulturversuche im Transplantat widerzuspiegeln.

Ausgehend von einer Studie am Schlaganfall-Modell der Ratte unseres Kollaborationspartners an der Universität Lethbridge (Kanada), bei der durch taktile Stimulation (Streicheln) eine Verbesserung im Verhalten und morphometrischer Parameter im Kortex erzielt werden konnte, haben wir die taktile Stimulation im 6-Hydroxydopamin Parkinson Rattenmodell untersucht. Es wurde vermutet, dass die schützende Wirkung der taktilen Stimulation durch das vermehrte Freisetzen von neurotrophen Faktoren vermittelt wird. Jedoch konnte keine Verbesserung in diesem „schnellen“ Parkinsonmodell festgestellt werden. Möglicherweise könnte dies in einem nicht so rasch voranschreitenden Parkinsonmodell anders ausfallen.

Ein alternatives Tiermodell, welches den verzögerten Krankheitsverlauf bei Morbus Parkinson besser widerspiegelt, bietet die alpha-Synuclein Überexpression in der Substantia nigra. Solche alpha-Synuclein enthaltenden Proteinaggregate (Lewy-Körperchen) sind charakteristische Veränderungen in den DA Neuronen von Parkinson Patienten. Zunächst wird dieses Modell in Zellkultur verwendet, um geeignete neurotrophe Faktoren auf ihre schützende Wirkung zu untersuchen. Anschließend soll dieses alpha-Synuclein Modell als weiteres Rattenmodell des Morbus Parkinson in unserem Institut etabliert werden.

Neben den eben genannten Ansätzen zur zellbasierten Therapie wird in unserer Arbeitsgruppe auch die embryonale Entwicklung von DA Neuronen in der Substantia nigra erforscht. Hierbei werden Mausmutanten, denen entweder die hochmolekulare- bzw. niedermolekulare Isoform des FGF-2 fehlt, zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten histologisch und molekularbiologisch untersucht. Dabei soll die Ursache des von unserer Arbeitsgruppe beschriebenen Phänotyps, einer 35% erhöhten Anzahl von DA Neuronen in der Substantia nigra bei Mausmutanten, denen beide FGF-2 Isoformen fehlen, entschlüsselt werden. Ergebnisse aus diesen Arbeiten können vermutlich dazu beitragen, Zellkulturprotokolle für eine gesteigerte Differenzierung zu DA Neuronen aus embryonalen Mittelhirnzellen bzw. iPS Zellen zu optimieren und das Überleben der transplantierten Zellen bei der Zellersatztherapie zu verbessern.

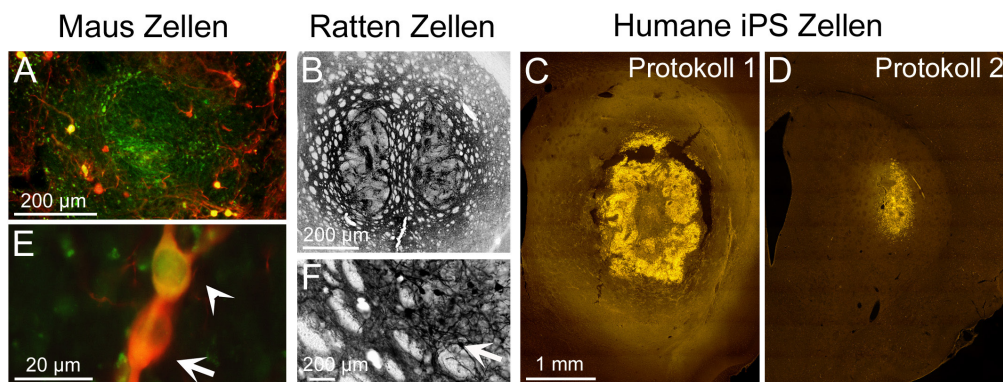


Abb. 1: Immunohistochemische Färbungen histologischer Schnitte durch das Ratten Striatum mit den enthaltenen transplantierten Zellen. (A, E) In den grün-leuchtenden Zellen der TH-eGFP Maus lässt sich die Tyrosinhydroxylase (rot angefärbt) als charakteristisches Enzym der DA-Synthese nachweisen (modifiziert nach Hohmann et al. 2014). (B, F) Zeigt schwarz angefärbte, transplantierte Ratten DA Neurone mit langen Zellausläufern ins umgebende Gewebe (modifiziert nach Rumpel et al. 2014). (C, D) Transplantate von differenzierten humanen iPSC Zellen wurden mittels hNuc Antikörper als gelbe Färbung dargestellt. Es zeigte sich ein tumorartiges Wachstum bei zwei Transplantaten nach Protokoll 1 Differenzierung (C), aber nicht bei Protokoll 2 (D) (modifiziert nach Effenberg et al. 2014).

Originalpublikationen

Baron O, Ratzka A, Grothe C. Fibroblast growth factor 2 regulates adequate nigrostriatal pathway formation in mice. *J Comp Neurol* 2012;520:3949-3961

Effenberg A, Klein A, Gibb R, Carroll C, Baumgärtner W, Grothe C, Ratzka A. Adult hemiparkinsonian rats do not benefit from tactile stimulation. *Behavioural Brain Research* 2014;261:97-105

Effenberg A#, Stanslowsky N#, Klein A, Wesemann M, Haase A, Martin U, Dengler R, Grothe C, Ratzka A*, Wegner F*. Striatal transplantation of human dopaminergic neurons differentiated from induced pluripotent stem cells derived from umbilical cord blood using lentiviral reprogramming. *Cell Transplant* 2014; Epub ahead of print

Hohmann M, Rumpel R, Fischer M, Donert M, Ratzka A, Klein A, Wesemann M, Effenberg A, Fahlke C, Grothe C. Electrophysiological characterization of eGFP-labeled intra-striatal dopamine grafts. *Cell Transplant* 2014; Epub ahead of print

Rumpel R#, Alam M#, Klein A, Özer M, Wesemann M, Jin X, Krauss JK, Schwabe K, Ratzka A*, Grothe C*. Neuronal firing activity and gene expression changes in the subthalamic nucleus after transplantation of dopamine neurons in hemiparkinsonian rats. *Neurobiol Dis* 2013;59:230-243

Rumpel R, Hohmann M, Klein A, Wesemann M, Baumgärtner W, Ratzka A*, Grothe C*. Transplantation of fetal ventral mesencephalic progenitor cells overexpressing high molecular weight fibroblast growth factor 2 isoforms in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neuroscience* 2015;286:293-307

Equally contributing authors and senior authors are marked by # or *, respectively.

■ Projektleitung: Grothe, Claudia (Prof. Dr.); Ratzka, Andreas (Dr.); Kooperationspartner: Christoph Fahlke (Prof. Dr.), Zelluläre Biophysik, Jülich; Robbin Gibb (Dr.), Universität Lethbridge, Kanada; Ulrich Martin (Prof. Dr.), HTTG-Chirurgie, MHH; Kerstin Schwabe (Prof. Dr.), Klinik für Neurochirurgie, MHH; Florian Wegner (PD Dr.), Klinik für Neurologie, MHH; Förderung: HiLF, MHH, Cusanuswerk

Weitere Forschungsprojekte

Biohybride Nerveninterponate zur Steigerung der peripheren Nervenregeneration

■ Projektleitung: Grothe, Claudia (Prof. Dr.), Haastert-Talini, Kirsten (Prof. Dr.); Förderung: European Commission EU-FP7-HEALTH-2011-278612 (Koordination MHH)

Pathogenese der Spinalen Muskelatrophie und Entwicklung einer Therapie durch Inhibition der Rho-Kinase

■ Projektleitung: Claus, Peter (Prof. Dr.); Förderung: Philipp & Freunde - SMA Deutschland e.V.

Bedeutung des neurotrophen Faktors FGF-2 bei der Amyotrophen Lateralsklerose - Untersuchungen an Doppelmausmutanten

■ Projektleitung: Grothe, Claudia (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Petri, Susanne (Prof. Dr.); Förderung: Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM)

Entwicklung eines „intelligenten“ Nerveninterponates

■ Projektleitung: Haastert-Talini, Kirsten (Prof. Dr.); Förderung: Internationale Stiftung Neurobionik

Evaluation des Effektes eines Peptidfragmentes des C3bot-Proteins auf die Regeneration peripherer Nerven

■ Projektleitung: Haastert-Talini, Kirsten (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Just, Ingo (Prof. Dr.); Förderung: Stiftung Sibylle Assmus

Axonal damage after infection - cellular mechanisms and signaling

■ Projektleitung: Claus, Peter (Prof. Dr.); Förderung: Niedersachsen Research Network on Neuroinfectiology (N-RENNT)

Validierung Neurotropher Faktoren zum Schutz dopaminergener Neurone im alpha-Synuclein Modell

■ Projektleitung: Ratzka, Andreas (Dr. rer. nat.); Förderung: HiLF, MHH

Funktionelle, molekulare und morphologische Evaluation im Morbus Parkinson Rattenmodell nach intrastriatarer Transplantation gentechnisch modifizierter neuronaler Progenitorzellen bzw. differenzierter induzierter pluripotener Stammzellen

■ Projektleitung: Grothe, Claudia (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Klinik für Neurochirurgie, Klinik für Neurologie, Institut für Neurophysiologie/MHH; Förderung: Cusanuswerk

Originalpublikationen

Duda S, Dreyer L, Behrens P, Wienecke S, Chakradeo T, Glasmacher B, Haastert-Talini K. Outer electrospun polycaprolactone shell induces massive foreign body reaction and impairs axonal regeneration through 3D multichannel chitosan nerve guides. *Biomed Res Int* 2014;2014:835269

Effenberg A, Stanslowsky N, Klein A, Wesemann M, Haase A, Martin U, Dengler R, Grothe C, Ratzka A, Wegner F. Striatal transplantation of human dopaminergic neurons differentiated from induced pluripotent stem cells derived from umbilical cord blood using lentiviral reprogramming. *Cell Transplant* 2014;DOI: 10.3727/096368914X685591

Haastert-Talini K, Geuna S, Shahar A, Freier T, Grothe C. BIOHY-BRID nerve transplants - development of chitosan-based nerve grafts. *Biomed Tech (Berl)* 2014;59(S1):S822

Haastert-Talini K, Grothe C. Comment to the paper: Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system by M. Ikeda, T. Uemura, K. Takamatsu, M. Okada, K. Kazuki, Y. Tabata, Y. Ikada, H. Nakamura, *J Biomed Mater Res A*. 2013 Jun 3 doi: 10.1002/jbm.a.34816. *J Biomed Mater Res A* 2014;102(4):1219-1220

Haastert-Talini K, Grothe C. Electrical Stimulation approaches to support peripheral nerve regeneration. *Biomed Tech (Berl)* 2014;59(S1):S1072

Hohmann M, Rumpel R, Fischer M, Donert M, Ratzka A, Klein A, Wesemann M, Effenberg A, Fahlke C, Grothe C. Electrophysiological characterization of eGFP-labeled intrastriatal dopamine grafts. *Cell Transplant* 2014;DOI: 10.3727/096368914X683034

Morano M, Wrobel S, Fregnan F, Ziv-Polat O, Shahar A, Ratzka A, Grothe C, Geuna S, Haastert-Talini K. Nanotechnology versus stem cell engineering - In vitro-comparison of neurite inductive potentials. *Int J Nanomed* 2014;9(1):5289-5306

Pustelny C, Komor U, Pawar V, Lorenz A, Bielecka A, Moter A, Gocht B, Eckweiler D, Grothe C, Lünsdorf H, Weiss S, Häussler S. Contribution of *Veillonella parvula* to *Pseudomonas aeruginosa* mediated pathogenicity in a murine tumor model system. *Infect Immun* 2015;83(1):417-429

Rumpel R, Hohmann M, Klein A, Wesemann M, Baumgärtner W, Ratzka A, Grothe C. Transplantation of fetal ventral mesencephalic progenitor cells overexpressing high molecular weight fibroblast growth factor 2 isoforms in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neuroscience* 2015;286:293-307

Schenk HC, Haastert-Talini K, Jungnickel J, Grothe C, Meyer H, Rehage J, Fehr M, Bokemeyer J, Rohn C, Tipold A. Morphometric Parameters of Peripheral Nerves in Calves Correlated with Conduction Velocity. *J Vet Intern Med* 2014;28(2):646-655

van Neerven SG, Krings L, Haastert-Talini K, Vogt M, Tolba RH, Brook G, Pallua N, Bozkurt A. Human Schwann cells seeded on a novel collagen-based microstructured nerve guide survive, proliferate, and modify neurite outgrowth. *Biomed Res Int* 2014;2014:493823

Wrobel S, Morano M, Meyer C, Shahar A, Ziv O, Haastert-Talini K, Geuna S, Grothe C. Development of cell-enhanced chitosan scaffolds to overcome long gaps after peripheral nerve injury. *Cytotherapy* 2014;16(4, Suppl.):S102

Wrobel S, Serra SC, Ribeiro-Samy S, Sousa N, Heimann C, Barwig C, Grothe C, Salgado AJ, Haastert-Talini K. In vitro evaluation of cell-seeded chitosan films for peripheral nerve tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2014;20(17-18):2339-2349

Ziv-Polat O, Shahar A, Levy I, Skaat H, Neuman S, Fregnan F, Geuna S, Grothe C, Haastert-Talini K, Margel S. The role of neurotrophic factors conjugated to iron oxide nanoparticles in peripheral nerve regeneration: in vitro studies. *Biomed Res Int* 2014;2014:267808

Übersichtsarbeiten

Förthmann B, Grothe C, Claus P. A nuclear odyssey: fibroblast growth factor-2 (FGF-2) as a regulator of nuclear homeostasis in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2015;DOI: 10.1007/s00018-014-1818-6

Abstracts

2014 wurden 24 Abstracts publiziert.

Promotionen

Effenberg, Anna (Dr. med. vet.): Alternative therapies for Morbus Parkinson: effects of tactile stimulation in a rodent model of Parkinson's disease and induced pluripotent stem cells as a new source for neurotransplantation-therapy.

Hensel, Niko (Dr. rer. nat.): Analysis and inhibition of dysregulated pathways in a mouse model of the motoneuron disease spinal muscular atrophy.

Meyer, Cora (Dr. rer. nat.): Peripheral nerve regeneration using hollow and enriched chitosan-based guidance conduits.

Wrobel, Sandra (Dr. rer. nat.): In vitro evaluation of innovative cell-enriched peripheral nerve graft devices.

Master

Konen, Timo (M.Sc. Biochemie): Neuronal Signal Transduction of Fibroblast Growth Factors (FGF) -2 and -23.

Bachelor

Götting, Jasper (B.Sc.): Analyse des Rho-Kinase Weges in einem Zellkulturmodell der amyotrophen Lateralsklerose.

Wall, Inessa (B.Sc.): Regulation der Retinsäure-abhängigen Genexpression in einem Modell der Spinalen Muskelatrophie.

Stipendien

Stockbrügger, Inga (cand. med.): Sonderstipendium Neurowissenschaften im Rahmen des Stipendienprogramms Medical Excellence der Firma MLP. Die Manfred Lautenschläger-Stiftung fördert damit die Dissertation „In vivo und in vitro Charakterisierung dysregulierter Signalwege bei der Spinalen Muskelatrophie - molekularbiologische und biochemische Untersuchungen“.

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Grothe, Claudia (Prof. Dr.): Vorsitzende im Kuratorium der Stiftung Sibylle Assmus; gutachterliche Tätigkeiten für die DFG und andere Organisationen der Forschungsförderung; Gutachter für diverse Fachjournale.

Claus, Peter (Prof. Dr.): Gutachter für Organisationen der Forschungsförderung; gutachterliche Tätigkeiten für diverse Fachjournale; Mitglied in wissenschaftlichen Beiräten von Patientenorganisationen.

Haastert-Talini, Kirsten (Prof. Dr.): Gutachterliche Tätigkeiten für Forschungsförderung und diverse Fachjournale.

Ratzka, Andreas (Dr. rer. nat.): Gutachterliche Tätigkeiten für diverse Fachjournale.