



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 35 191 T2** 2008.06.19

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 173 548 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 35 191.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP00/03842**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 929 454.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/066713**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.11.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.06.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 5/06** (2006.01)

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 35/30 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

132317 P 03.05.1999 US

(73) Patentinhaber:

Neuro Therapeutics AB, Stockholm, SE

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**ARENAS, Ernest Lab. of Mole, S-171 77
Stockholm, SE; PERLMANN, Thomas The Ludwig
I, S--171 77 Stockholm, SE; SNYDER, Evan Y. Dep.
of Neur, 320 Longwood Avenue, Boston, MA
02115, US; WAGNER, Joseph Lab. of Mole, S-171
77 Stockholm, SE; AKERUD, Peter Lab of Molec,
S-171 77 Stockholm, SE**

(54) Bezeichnung: **MATERIALIEN UND METHODEN ZUR ENTWICKLUNG VON DOPAMINERGEN NEURONEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Fachgebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft das Induzieren eines dopaminergen neuronalen Schicksals in neuronalen Stammzellen oder neuronalen Vorläuferzellen. Sie betrifft das Induzieren eines spezifischen neuronalen Phänotyps und insbesondere das Induzieren eines dopaminergen neuronalen Mittelhirnphänotyps.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Neurale Stammzellen haben die Fähigkeit, sich in Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren. Jüngste Fortschritte in der Biologie neuraler Stammzellen haben gezeigt, dass solche Stammzellen isoliert, vermehrt und als Quellenmaterial für Hirntransplantate verwendet werden können (E. Y. Snyder et al., Cell 68, 33–51 (1992); A. Rosenthal, Neuron 20, 169–172 (1998), F. H. Gage et al., Ann. Rev. Neurosci. 18, 159–192 (1995); S. Weiss et al., Trends Neurosci. 19, 387–393 (1996); E. Y. Snyder et al., Clin. Neurosci. 3, 310–316 (1996); A. Martínez-Serrano et al., Trends Neurosci. 20, 530–538 (1997); R. McKay, Science 276, 66–71 (1997); L. Studer et al., Nature Neurosci. 1, 290–295 (1998)). Obwohl mehrere Studien zeigen, dass implantierte neurale Stammzellen erfolgreich legitime neurale Phänotypen einfügen und annehmen, scheinen diese Zellen jedoch, wenn sie in das intakte erwachsene Gehirn transplantiert werden, in Richtung Astro- und Oligodendrogliaschicksale beeinflusst zu sein (A. Martínez-Serrano et al., Trends Neurosci. 20, 530–538 (1997); R. McKay, Science 276, 66–71 (1997); E. Y. Snyder et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 11663–11668 (1997)).

[0003] Die meisten neurodegenerativen Erkrankungen beeinflussen neuronale Populationen. Weiters tritt der meiste Schaden an einem spezifischen neurochemischen Phänotyp auf. Bei einer Parkinson-Erkrankung beim Menschen besteht z.B. der Hauptzelltyp, der verloren geht, aus dopaminergen Mittelhirnneuronen. Funktionelles Ersetzen spezifischer neuronaler Populationen durch Transplantation von Nervengewebe ist eine attraktive therapeutische Strategie zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen (A. Rosenthal, Neuron 20, 169–172 (1998)).

Zusammenfassung der Erfindung

[0004] Ein ideales Material zur Verwendung in Transplantationstherapie ist eine vermehrbare Zelle, welche die Aufgabe bekommt, bei Differenzierung einen neuronalen Phänotyp anzunehmen, insbesondere einen spezifischen neuronalen Phänotyp. Diese Strategie würde ethische und praktische Themen, welche die Verwendung von menschlichem fötalem

Gewebe zur Transplantation betreffen, umgehen. Insbesondere weisen implantierte Embryozellen eingeschränkte Lebensfähigkeit auf und werden oft abgestoßen. Zusätzlich dazu stellt jeder Fötus eine kleine Zahl an Zellen bereit.

[0005] Das In-vitro-Induzieren eines einzelnen und spezifischen neuronalen Phänotyps in multipotenten neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen hat sich als unzuverlässig erwiesen.

[0006] Nurr1 [Law et al., Mol. Endocrinol. 6, 2129–2135 (1992); Xing et al., Mol. Brain Res. 47, 251–261 (1997); Castillo, Genomics 41, 250–257 (1997); GenBank Nr. S53744, U72345, U86783) ist ein Transkriptionsfaktor der Schilddrüsenhormon/Retinsäure-Nuklearrzeptorüberfamilie. Die vorliegende Offenbarung zeigt, dass die Expression von Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau in neuronalen Stammzellen oder neuronalen Vorläuferzellen den Anteil von Zellen erhöht, die sich in Richtung eines neuronalen Schicksals differenzieren. Das Induzieren eines neuronalen Schicksals kann in vitro oder in vivo durchgeführt werden. Die Fähigkeit, Differenzierung von neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen in Richtung des neuronalen Schicksals zu induzieren, vor oder nach Transplantation, lindert die Beeinflussung von transplantierten Stammzellen zu Astro- und Oligodendroglia-Schicksalen.

[0007] Unter „neuraler Stammzelle“ versteht man jeden beliebigen Zelltyp, der sich mehr als einmal teilen kann und Zellen entstehen lassen kann, welche die primitivste Form von Phänotypen für Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten aufweisen. Die neurale Stammzelle kann einen oder mehrere der folgenden Marker exprimieren: Nestin; den p75-Neurotrophinrezeptor; Notch1. Unter „neuraler Vorläuferzelle“ versteht man eine multipotente Tochter einer neuronalen Stammzelle, wobei die Tochter in ihren potenziellen Schicksalen eingeschränkt ist und/oder im Vergleich zur neuronalen Stammzelle ein reduziertes proliferatives Potenzial aufweist. In bevorzugten Ausführungsformen exprimiert die neurale Stamm- oder Vorläuferzelle Tyrosinhydroxylase entweder spontan oder nach Entzug von Mitogenen (z.B. bFGF, EGF oder Serum) nicht.

[0008] Die neurale Stammzelle oder neurale Vorläuferzelle kann aus einer beliebigen Region des Nervensystems, z.B. aus dem Cerebellum, der Ventrikelzone, der Subventrikelzone oder dem Hippocampus, erhalten oder aus dieser gewonnen werden. Sie kann aus einem Wirbeltierorganismus, z.B. einem Säugetier, menschlich oder nicht-menschlich, wie z.B. Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte, Maus oder einem anderen Nagetier, Katze, Hund, Schwein, Schaf, Ziege, Rind, Pferd oder Primat, oder aus einem Vogel, wie z.B. Huhn, erhalten oder aus diesem gewonnen werden.

[0009] In einem Verfahren zum Induzieren eines dopaminergen neuronalen Schicksals gemäß der vorliegenden Erfindung, worin eine Vielzahl von neuronalen Stammzellen und/oder Vorläuferzellen Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, kann eine Mehrheit von Stamm- oder Vorläuferzellen induziert werden, um ein neuronales Schicksal anzunehmen. In bevorzugten Ausführungsformen können mehr als 60%, mehr als 70%, mehr als 80%, mehr als 90% der Stamm- und/oder Vorläuferzellen auf ein neuronales Schicksal induziert werden.

[0010] Unter „Expression von Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau innerhalb der Zelle“ versteht man die Expression von Nurr1 in größeren Ausmaßen als jene, in welchen es in der (nicht-modifizierten) Zelle in vivo unter nicht-pathologischen Bedingungen exprimiert wird. Expression in einem Ausmaß über dem Grundniveau umfasst pharmakologische und künstliche Hinaufregulierung und Überexpression.

[0011] Expression von Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau kann durch ein beliebiges fachbekanntes Verfahren erreicht werden. Beispielsweise kann die Expression in einem Ausmaß über dem Grundniveau durch Modulation der Regulation von nativem genomischem Nurr1 induziert werden. Dies kann durch die Erhöhung der Transkription und/oder Translation von Nurr1 erreicht werden, z.B. durch Kontaktieren der Zelle mit Fibroblastenwachstumsfaktor 8 (FGF8), der die Transkription von Nurr1 hinaufreguliert (A. Rosenthal, Cell 93 (5), 755–766 (1998)), und/oder durch Einführen von heterologen regulierenden Sequenzen in oder angrenzend an die native regulierende Region von Nurr1 und/oder durch Ersetzen der nativen regulierenden Region von Nurr1 durch heterologe regulierende Sequenzen, z.B. durch homologe Rekombination, und/oder durch Unterbrechung oder Herabregulierung von Molekülen, die Transkription, Translation oder Funktion von Nurr1 blockieren oder herabregulieren, z.B. Nurr2 (Ohkura et al., Biochim. Biophys. Acta 14444, 69–79 (1999)).

[0012] Transkription kann durch Bereitstellung der neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle mit erhöhten Ausmaßen eines Transkriptionsaktivators erhöht werden, z.B. durch Kontaktieren der Zelle mit solch einem Aktivator oder durch Transformation der Zelle mit Nucleinsäure, die für den Aktivator kodiert. Alternativ dazu kann die Transkription durch Transformation der Zelle mit Antisense-Nucleinsäure zu einem Transkriptioninhibitor von Nurr1 erhöht werden.

[0013] Dementsprechend kann ein Verfahren der vorliegenden Erfindung zum Induzieren des dopaminergen neuronalen Schicksals in einer neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle das Kontaktieren der Zelle mit FGF8 umfassen.

[0014] Alternativ oder zusätzlich zum Anstieg der Transkription und/oder Translation von endogenem Nurr1 kann die Expression von Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau durch Einführung einer oder mehrerer zusätzlichen Kopien von Nurr1 in die neurale Stamm- oder Vorläuferzelle verursacht sein.

[0015] Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung in einem weiteren Aspekt ein Verfahren zum Induzieren eines dopaminergen neuronalen Schicksals in einer neuronalen Stammzelle oder neuronalen Vorläuferzelle bereit, wobei das Verfahren die Transformation der Zelle mit Nurr1 umfasst. Die Transformation der neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle kann in vitro oder in vivo durchgeführt werden.

[0016] Transformierter Nurr1 kann auf einem extragenomischen Vektor enthalten sein oder vorzugsweise stabil in das Genom aufgenommen sein. Er kann operabel an einen Promotor gebunden sein, der seine Expression in einem Ausmaß über dem Grundniveau in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen wie nachstehend im Detail beschrieben steuert.

[0017] „Operabel gebunden“ bedeutet gebunden als Teil desselben Nucleinsäuremoleküls, geeignet positioniert und orientiert, sodass Transkription vom Promotor begonnen wird.

[0018] Verfahren zur Einführung von Genen in Zellen sind fachbekannt. Vektoren können verwendet werden, um Nurr1 in neurale Stamm- oder Vorläuferzellen einzuführen, ob Nurr1 auf dem Vektor bleibt oder nicht oder in das Genom aufgenommen wird oder nicht. Es können geeignete Vektoren ausgewählt oder hergestellt werden, die geeignete regulierende Sequenzen umfassen, einschließlich Promotorsequenzen, Terminatorfragmente, Polyadenylierungssequenzen, Enhancersequenzen. Vektoren können Markergene und andere geeignete Sequenzen enthalten. Die regulierenden Sequenzen können die Expression von Nurr1 innerhalb der neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen steuern. Zum Beispiel kann der Vektor ein extragenomischer Expressionsvektor sein, oder die regulierenden Sequenzen können mit Nurr1 in das Genom aufgenommen werden. Vektoren können Plasmide oder virale Vektoren sein.

[0019] Nurr1 kann unter die Kontrolle eines extern induzierbaren Genpromotors gestellt werden, um es unter die Kontrolle des Benutzers zu stellen. Der Begriff „induzierbar“, wie er für einen Promotor verwendet wird, ist Fachleuten einfach verständlich. Im Wesentlichen wird die Expression unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors „angeschaltet“ oder als Reaktion auf einen angewendeten Reiz erhöht. Das Wesen des Reizes variiert zwischen den Promotoren. Einige induzierbare Promotoren verursachen geringe oder nicht-detektierbare Ausmaße von Expression (oder keine Expression) bei Fehlen des geeigneten

ten Reizes. Welches Expressionsausmaß bei Fehlen des Reizes auch vorliegt, die Expression ausgehend von einem beliebigen induzierbaren Promotor wird in Gegenwart des korrekten Stimulus erhöht. Ein Beispiel für einen induzierbaren Promotor ist das Tetracyclin-ON/OFF-System (Gossen et al., *Science* 268, 1766–1769 (1995)), in welchem die Genexpression durch Tetracyclinanaloge reguliert wird.

[0020] Für weitere Details siehe zum Beispiel *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 2. Auflage, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Viele bekannte Verfahren und Protokolle zur Manipulation von Nucleinsäure, zum Beispiel in der Herstellung von Nucleinsäurekonstrukten, Mutagenese, Sequenzierung, Einführung von DNA in Zellen und Genexpression und Analyse von Proteinen, sind in *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., Hrsg., John Wiley & Sons (1992), detailliert beschrieben.

[0021] Markergene, wie z.B. Antibiotikaresistenz- oder -empfindlichkeitsgene, können fachbekannt zur Identifikation von Klonen verwendet werden, welche die Nucleinsäure von Interesse enthalten. Klone können auch identifiziert oder weiter durch Bindungsstudien erforscht werden, z.B. durch Southern-Blot-Hybridisierung.

[0022] Nucleinsäure, die Nurr1 umfasst, kann in das Genom der neuralen Wirtszelle oder neuralen Vorläuferzelle integriert werden. Integration kann durch Aufnahme in die transformierte Nucleinsäuresequenz, die eine Rekombination mit dem Genom fördern, gemäß Standardverfahren gefördert werden. Die integrierte Nucleinsäure kann regulierende Sequenzen umfassen, die in der Lage sind, die Expression des Nurr1-Gens in neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen zu steuern. Die Nucleinsäure kann Sequenzen umfassen, die ihre Integration in eine Stelle im Genom steuern, wo die für Nurr1 kodierende Sequenz unter die Kontrolle der regulierenden Elemente fällt, die in der Lage sind, ihre Expression innerhalb der neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle zu lenken und/oder zu steuern. Die integrierte Nucleinsäure kann von einem Vektor abstammen, der dazu verwendet wurde, Nurr1 wie hierin diskutiert in neurale Stamm- oder Vorläuferzellen zu transformieren.

[0023] Die Einführung von Nucleinsäure, die Nurr1 umfasst, ob die Nucleinsäure unverzweigt, verzweigt oder zirkulär ist, kann im Allgemeinen ohne Einschränkung als „Transformation“ bezeichnet werden. Sie kann ein beliebiges geeignetes Verfahren anwenden, Geeignete Verfahren können Kalziumphosphattransfektion, DEAE-Dextran, Elektroporation, mechanische Verfahren, wie z.B. Mikroinjektion, direkte DNA-Aufnahme, Rezeptorvermittelten DNA-Transfer, Transduktion unter Verwendung von Retrovirus oder einem anderen Virus und liposomenvermittelter

Transfektion umfassen. Wenn ein ausgewähltes Genkonstrukt in eine Zelle eingeführt wird, müssen bestimmte fachbekannte Überlegungen berücksichtigt werden. Es wird einem Fachmann offensichtlich sein, dass die spezielle Auswahl des Transformationsverfahrens zur Einführung von Nurr1 in neurale Stamm- oder Vorläuferzellen nicht für die Erfindung wesentlich ist oder eine Einschränkung der Erfindung ist.

[0024] Geeignete Vektoren und Verfahren zur In-vivo-Transformation von neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen mit Nurr1 sind fachbekannt. Geeignete Vektoren umfassen Adenovirus, Papovavirus, Vakzinavirus, Herpesvirus und Retroviren. Unschädlich gemachte Virusvektoren können in Helferzelllinien produziert werden, in welchen Gene, die für die Produktion von infektiösen Viruspartikeln erforderlich sind, exprimiert werden. Es sind geeignete Helferzelllinien fachbekannt. Für Beispiele siehe F. J. Fallaux et al., *Hum. Gene Ther.* 7 (2), 215–222 (1996), W. Willenbrink et al., *J. Virol.* 68 (12), 8413–8417 (1994), F. L. Cosset et al., *Virology* 193 (1), 385–395 (1993), M. K. Highkin et al., *Poult. Sci.* 70 (4), 970–981 (1991), J. P. Dougherty et al., *J. Virol.* 63 (7), 3209–3212 (1989), B. Salmons et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159 (3), 1191–1198 (1989), J. Sorge et al., *Mol. Cell. Biol.* 4(9), 1730–1737 (1984), S. Wang et al., *Gene Ther.* 4 (11), 1132–1141 (1997), K. W. Moore et al., *Science* 248 (4960), 1230–1234 (1990), C. S. Reiss et al., *J. Immunol.* 139 (3), 711–714 (1987). Helferzelllinien fehlt im Allgemeinen eine Sequenz, die vom Mechanismus erkannt wird, der das Virusgenom verpackt. Sie produzieren Virione, die keine Nucleinsäure enthalten. Ein Virusvektor, der ein intaktes Verpackungssignal gemeinsam mit dem Gen oder einer anderen zu verabreichenden Sequenz enthält (Nurr1), wird in den Helferzellen in infektiöse Virionteilchen verpackt, die dann zur Genverabreichung an neurale Stamm- oder Vorläuferzellen verwendet werden können.

[0025] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Induzieren eines dopaminergen neuronalen Schicksals in einer neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle bereit, worin die Stammzelle oder Vorläuferzelle Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, wobei das Verfahren das Kontaktieren der Zellen mit einem oder mehreren Faktoren umfasst, die von einem Typ-1-Astrozyt bereitgestellt werden oder von diesem abstammen. Der Faktor oder die Faktoren können durch gemeinsames Kultivieren der neuralen Stammzelle oder neuralen Vorläuferzelle mit einem Typ-1-Astrozyten bereitgestellt werden. Das Verfahren kann in vitro oder in vivo bereitgestellt werden. Die neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, können durch Transformation der Zellen mit Nurr1 produziert werden.

[0026] Der Faktor oder die Faktoren können von einem sich unbegrenzt vermehrenden Astrozyten bereitgestellt werden oder von ihm gewonnen werden. Der Faktor oder die Faktoren können von einer Astrozytenzelllinie bereitgestellt oder von dieser gewonnen werden, z.B. einer Mittelhirnzelllinie. Zelllinien stellen eine homogene Zellpopulation bereit.

[0027] Die vorliegende Offenbarung stellt den ersten Beweis bereit, dass Typ-1-Astrozyten in die Bestimmung von spezifischen neuronalen Schicksalen involviert sind. Die hierin präsentierten Daten lassen vermuten, dass Astrozyten aus unterschiedlichen Gehirnregionen als Signalquelle verwendet werden, die für das induzieren von regional geeigneten neuronalen Phänotypen in mehreren Gehirnstrukturen erforderlich sind.

[0028] Wichtige Aspekte der vorliegenden Erfindung basieren auf der Feststellung, dass dopaminerge Neuronen aus multipotenten neuronalen Stammzellen oder Vorläuferzellen in vitro durch ein Verfahren hergestellt werden, das die Expression von Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau in den Zellen und den Kontakt von Zellen mit einem oder mehreren Faktoren umfasst, die von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons bereitgestellt werden oder daraus gewonnen werden.

[0029] Dementsprechend ist das spezifische neuronale Schicksal ein dopaminerges Schicksal, und der Typ-1-Astrozyt ist ein Typ-1-Astrozyt des Ventralmesenzephalons.

[0030] Die vorliegende Erfindung ermöglicht die Herstellung großer Zahlen an dopaminergen Neuronen. Diese dopaminergen Neuronen können als Quellenmaterial zum Ersetzen von Zellen verwendet werden, die bei Parkinson-Erkrankung zerstört werden oder verloren gehen.

[0031] Vorzugsweise ist die neurale Stammzelle oder Vorläuferzelle, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, mitotisch, wenn sie mit einem oder mehreren Faktoren kontaktiert wird, die vom Typ-1-Astrozyt bereitgestellt werden oder aus diesem gewonnen werden.

[0032] Im Induzieren eines dopaminergen Schicksals in einer neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle kann die Zelle zusätzlich mit einem oder mehreren Mitteln kontaktiert werden, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die Folgendes umfasst: basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), einen Aktivator des Retinoid-X-Rezeptors (RXR), z.B. des synthetischen Retinoidanalogons SR11237, [G. J. Gendimenico et al., J. Invest. Dermatol. 102 (5), 676–80 (1994)] oder 9-cis-Retinol. Die Behandlung einer gemeinsamen Kultur von neuronalen Stamm- und/oder Vorläuferzel-

len, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, und Typ-1-Astrozyten mit einem oder mehreren dieser Mittel kann verwendet werden, um den Anteil der Stamm- und/oder Vorläuferzellen zu erhöhen, die ein dopaminerges Schicksal annehmen, wie nachstehend demonstriert wird. Das Verfahren zum Induzieren eines dopaminergen Schicksals gemäß der vorliegenden Erfindung kann das Kontaktieren der neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle mit einem Element der FGF-Familie von Wachstumsfaktoren, z.B. FGF4, FGF8, umfassen.

[0033] Günstigerweise können die Zellen mit zwei oder mehreren der obigen Mittel kontaktiert werden. Die Erfinder haben unerwarteterweise festgestellt, dass die vorteilhaften Wirkungen von bFGF oder EGF und SR11237 in sättigenden Dosen additiv sind.

[0034] Diese Feststellung lässt vermuten, dass diese Mittel durch verschiedene Mechanismen wirken können.

[0035] Das Verfahren zur Induktion eines dopaminergen Phänotyps kann die Vorbehandlung der neuronalen Stammzelle oder neuronalen Vorläuferzelle mit bFGF und/oder EGF vor dem Kontaktieren dieser mit dem einen oder mehreren Faktoren umfassen, die von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons bereitgestellt werden oder aus diesen gewonnen werden, z.B. vor gemeinsamem Kultivieren mit einem Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons.

[0036] Der optionale Vorbehandlungsschritt entsteht aus den zwei weiteren unerwarteten Feststellungen der Erfinder: (i) dass neurale Stammzelllinien, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren und hohe Proliferation zeigen, verstärktes Induzieren von dopaminergem Schicksal zeigen, wenn sie mit Typ-1-Astrozyten vom Ventralmesenzephalon gemeinsam kultiviert werden, und (ii) dass nach Behandlung mit bFGF oder EGF in serumfreiem Medium (SFM) die Grundlinienproliferation der meisten Stammzelllinien, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, nach Passagieren in SFM alleine erhöht bleiben.

[0037] Das Verfahren zum Induzieren eines dopaminergen Phänotyps kann die Vorbehandlung einer neuronalen Stammzelle oder Vorläuferzelle mit einem Element der FGF-Familie von Wachstumsfaktoren, z.B. FGF4, FGF8, umfassen.

[0038] Ein Verfahren, in welchem ein dopaminerges neuronales Schicksal in einer multipotenten neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle induziert wird, kann die Detektion eines Markers für das dopaminerge neuronale Schicksal umfassen. Für das dopaminerge Schicksal kann die Expression von Tyrosinhydroxylase (TH) und/oder die Freisetzung von Dopamin und/oder DOPAC z.B. durch Immunreaktivität detek-

tiert werden [J. R. Cooper et al., *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, 7. Auflage, Oxford University Press (1996)]. Das Fehlen von Dopamin- β -Hydroxylase (in Gegenwart von TH/Dopamin/DOPAC) gibt auch dopaminerges Schicksal an.

[0039] Detektion eines Markers kann gemäß eines beliebigen fachbekannten Verfahrens durchgeführt werden. Das Detektionsverfahren kann ein spezifisches Bindungselement verwenden, das in der Lage ist, sich an eine Nucleinsäuresequenz zu binden, die für den Marker kodiert, wobei das spezifische Bindungselement eine Nucleinsäuresonde umfasst, die mit der Sequenz hybridisierbar ist, oder eine Immunglobulin/Antikörperdomäne mit Spezifität für die Nucleinsäuresequenz oder das Polypeptid, für welches kodiert wird, wobei das spezifische Bindungselement markiert ist, sodass die Bindung des spezifischen Bindungselements an die Sequenz oder das Polypeptid detektierbar ist. Ein „spezifisches Bindungselement“ hat eine besondere Spezifität für den Marker und bindet sich unter normalen Bedingungen lieber an den Marker als an andere Spezies. Alternativ dazu kann der Marker, wenn er eine spezifische mRNA ist, durch Bindung an spezifische Oligonucleotidprimer und Amplifikation in z.B. der Polymerasekettenreaktion detektiert werden.

[0040] Nucleinsäuresonden und -Primer können mit dem Marker unter stringenten Bedingungen hybridisieren. Geeignete Bedingungen umfassen, z.B. zur Detektion von Markersequenzen, die etwa 80–90% identisch sind, Hybridisierung über Nacht bei 42°C in 0,25 M Na₂HPO₄, pH 7,2, 6,5% SDS, 10% Dextran-sulfat und eine Endwaschung bei 55°C in 0,1 × SSC, 0,1% SDS. Zur Detektion von Markersequenzen, die zu mehr als etwa 90% ident sind, umfassen geeignete Bedingungen Hybridisierung über Nacht bei 65°C in 0,25 M Na₂HPO₄, pH 7,2, 6,5% SDS, 10% Dextran-sulfat und eine Endwaschung bei 60°C in 0,1 × SSC, 0,1% SDS.

[0041] Das Neuron kann Nucleinsäure umfassen, die für ein Molekül kodiert, das neuroschützende oder neuroregenerative Eigenschaften aufweist, das operabel an einen Promotor gebunden ist, der in der Lage ist, die Expression des Moleküls in dem Neuron zu steuern. Der Promotor kann ein induzierbarer Promotor sein, z.B. der chimäre TetON-Promotor, sodass jegliche schädigende Überexpression vermieden werden kann. Der Promotor kann mit einem spezifischen neuronalen Phänotyp assoziiert sein, z.B. der TH-Promotor.

[0042] Das Molekül, für welches kodiert wird, kann so sein, dass seine Expression das Neuron unabhängig von der Umgebung macht, d.h. so, dass sein Überleben nicht von der Gegenwart von einem oder mehreren Faktoren oder Bedingungen in z.B. der neuronalen Umgebung abhängt, in welche es implan-

tiert werden soll. Beispielsweise kann das Neuron Nucleinsäure umfassen, die für eines oder mehrere der neuroschützenden oder neuroregenerativen Moleküle kodiert, die nachstehend beschrieben sind, die operabel an einen Promotor gebunden sind, der in der Lage ist, die Expression des Moleküls im Neuron zu steuern.

[0043] Zusätzlich oder alternativ dazu kann die Expression des Moleküls, für das kodiert wird, im Neuronenschutz oder der Neuroregeneration der Zellumgebung, die das Neuron umgibt, wirken. Auf diese Weise kann das Neuron in einem kombinierten Zell- und Gentherapieansatz verwendet werden, um Moleküle mit neuroschützenden oder neuroregenerativen Eigenschaften zu verabreichen.

[0044] Beispiele für Moleküle mit neuroschützenden und neuroregenerativen Eigenschaften umfassen Folgende:

(i) Neurotrope Faktoren, die in der Lage sind, für Neurodegeneration zu kompensieren und diese zu vermeiden. Ein Beispiel ist von Glia abstammender neurotroper Wachstumsfaktor (GDNF), der ein wirksamer Faktor für das Überleben von Neuronen ist und das Sprouting aus dopaminergen Neuronen fördert und Tyrosinhydroxylaseexpression verstärkt [Tomic et al., *Nature* 373, 335–339 (1995); Arenas et al., *Neuron* 15, 1465–1473 (1995)]. Durch die Verstärkung der axonalen Elongation von GDNF kann GDNF die Fähigkeit der Neuronen verstärken, ihre lokale Umgebung zu innervieren. Andere neurotope Moleküle der GDNF-Familie umfassen Neurturin, Persephin und Artemin. Neurotrope Moleküle der Neurotrophin-Familie umfassen Nervenwachstumsfaktor (NGF), von Gehirn abstammenden neurotrophen Faktor (GDNF) und Neurotrophin –3, –4/5 und –6.

(ii) antiapoptotische Moleküle Bcl2, das eine zentrale Rolle im Zelltod spielt. Überexpression von Bcl2 schützt Neuronen vor natürlich auftretendem Zelltod und Ischämie [Martinou et al., *Neuron*, 1017–1030 (1994)]. Ein anderes antiapoptotisches Molekül ist BclX-L.

(iii) Axon, das Moleküle, die das Neuron in der Innervierung und Bildung von Verbindungen mit der Umwelt unterstützen, z.B. Ephrine, regeneriert und/oder elongiert und/oder steuert. Ephrine definieren eine Klasse von membrangebundenen Liganden, die in der Lage sind, Tyrosinkinaserzeptoren zu aktivieren. Ephrine sind in der neuronalen Entwicklung impliziert gewesen [Irving et al., *Dev. Biol.* 173, 26–38 (1996); Krull et al., *Curr. Biol.* 7, 571–580 (1997); Frisen et al., *Neuron* 20, 235–243 (1998); Gao et al., *PNAS* 93, 11161–11166 (1996), Torres et al., *Neuron* 21, 1453–1463 (1998); Winslow et al., *Neuron* 14, 973–981 (1995), Yue et al., *J. Neurosci.* 19 (6), 2090–2102 (1999)].

(iv) Differenzierungsmoleküle, z.B. das Homöoblastomdomänenprotein Ptx3 [M. P. Smidt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (24), 13305–13310 (1997)].

[0045] Ein Neuron gemäß der vorliegenden Erfindung und zur Verwendung in dieser kann im Wesentlichen frei von einem oder mehreren Zelltypen sein, z.B. von neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen. Neuronen können aus neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen unter Einsatz fachbekannter Verfahren separiert werden. Beispielsweise können Antikörper gegen extrazelluläre Regionen von Molekülen verwendet werden, die auf neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen zu finden sind, aber nicht auf Neuronen. Solche Moleküle umfassen Notch-1 und den von der Glia-Zelllinie abstammenden neurotrophischen Faktorrezeptor GFR- α 2. Stammzellen, die an Antikörper gebunden sind, können durch Exposition gegenüber Komplement lysiert werden oder z.B. durch magnetisches Sortieren getrennt werden [Johansson et al., Cell 96, 25–34 (1999)]. Wenn Antikörper, die gegenüber dem beabsichtigten Empfänger der Neuronen xenogen sind, verwendet werden, dann werden z.B. neurale Stamm- oder Vorläuferzellen, die ein solches Zellsortierverfahren umgehen, mit xenogenen Antikörpern markiert und sind Hauptziele für das Immunsystem des Empfängers.

[0046] Eine pharmazeutische Zusammensetzung, ein Medikament, Arzneimittel oder eine andere Zusammensetzung kann ein Neuron umfassen, das gemäß einem beliebigen der hierin offenbarten Verfahren hergestellt worden ist, ein solches Neuron oder eine solche Zusammensetzung kann in einem Verfahren medizinischer Behandlung, einem Verfahren, das die Verabreichung eines solchen Neurons oder einer Zusammensetzung an einen Patienten umfasst, z.B. zur Behandlung (die Präventivbehandlung umfassen kann) von Parkinson-Erkrankung oder anderen (z.B. neurodegenerativen) Erkrankungen, verwendet werden, ein solches Neuron kann in der Herstellung einer Zusammensetzung zur Verabreichung z.B. zur Behandlung von Parkinson-Erkrankung oder anderen (z.B. neurodegenerativen Erkrankungen) verwendet werden und in einem Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, welches die Mischung eines solchen Neurons mit einem pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten, Vehikel oder Träger und gegebenenfalls einem oder mehreren anderen Inhaltsstoffen, z.B. einem neuroschützenden Molekül, einem neuroregenerativen Molekül, einem Retinoid, einem Wachstumsfaktor, einem Astrozyten, einem antiapoptotischen Faktor oder einem Faktor, der Genexpression in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen oder im Wirtsgehirn reguliert, umfasst. Solche optionalen Inhaltsstoffe können das Neuron von seiner Umgebung unabhängig machen, d.h. sodass sein Überleben nicht von der Gegenwart eines oder mehrerer Faktoren oder Be-

dingungen in ihrer Umwelt abhängt. Beispielsweise kann das Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung die Mischung des Neurons mit einem oder mehreren Faktoren umfassen, die in dem sich entwickelnden Ventralmesencephalon zu finden sind. Das Neuron kann mit GDNF und/oder Neurturin (NTN) gemischt werden.

[0047] Eine Zusammensetzung kann ein Neuron umfassen, das gemäß der Erfindung produziert worden ist, und eine oder mehrere weitere Komponenten. Pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung können zusätzlich zum Neuron einen pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten, Träger, Puffer, Konservierungsstoff, Stabilisator, ein Antioxidans oder ein anderes fachbekanntes Material umfassen. Solche Materialien sollen nicht-toxisch sein und die Aktivität des Neurons nicht beeinflussen. Das genaue Wesen des Trägers oder eines anderen Materials hängt vom Verabreichungsweg ab. Die Zusammensetzung kann ein oder mehrere neuroschützende Moleküle, ein neuroregeneratives Molekül, ein Retinoid, einen Wachstumsfaktor, einen Astrozyten oder einen Faktor umfassen, der Genexpression in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen reguliert. Solche Substanzen können das Neuron wie oben beschrieben unabhängig von seiner Umgebung machen.

[0048] Flüssige pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen im Allgemeinen einen flüssigen Träger, wie z.B. Wasser, Erdöl, tierische oder pflanzliche Öle, Mineralöl oder synthetisches Öl. Physiologische Kochsalzlösung, Dextrose oder eine andere Saccharidlösung oder Glykole, wie z.B. Ethylenglykol, Propylenglykol oder Polyethylenglykol, können enthalten sein.

[0049] Die Zusammensetzung kann in Form einer parenteral annehmbaren wässrigen Lösung vorliegen, die pyrogenfrei ist und geeignete(n) pH, Isotonizität und Stabilität aufweist. Fachleute sind in der Lage, geeignete Lösungen herzustellen, unter Verwendung von z.B. isotonische Vehikel, wie z.B. Natriumchlorid, Ringer-Injektion oder Ringer-Laktat-Injektion. Eine Zusammensetzung kann unter Verwendung von künstlicher Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit hergestellt werden.

[0050] Ein Neuron, das gemäß der Erfindung hergestellt wird, kann in einem Verfahren zur medizinischen Behandlung verwendet werden, insbesondere zur Behandlung eines medizinischen Leidens, das mit Schaden an oder Verlust von oder einer Erkrankung in neuronalen Zellen assoziiert ist. Insbesondere kann ein dopaminerges Neuron, das gemäß der Erfindung hergestellt wurde, in der Behandlung von menschlicher Parkinson-Erkrankung verwendet werden. Während die Neuronen, die gemäß der Erfindung hergestellt wurden, insbesondere zur Behand-

lung von neurodegenerativen Erkrankungen (z.B. Parkinson-Erkrankung) nützlich sind, sind sie jedoch nicht darauf beschränkt, Beispielsweise können sie auch zur Behandlung von Schäden am Rückenmark und/oder Großhirnrinde verwendet werden.

[0051] In Behandlungsverfahren, in welchen das verabreichte Neuron eine pluripotente Zelle ist, die in der Lage ist, zwei oder mehrere unterschiedliche neuronale Phänotypen entstehen zu lassen, kann das Neuron oder die Zusammensetzung in eine Region eingeführt werden, die Astrozyten enthielt, welche die Differenzierung des Neurons zu einem gewünschten dopaminergen neuronalen Schicksal steuern. Das Neuron oder die Zusammensetzung können zum Beispiel in das Ventralmesenzephalon injiziert werden, wo es mit Typ-1-Astrozyten Wechselwirken kann, und kann dazu gebracht werden, einen dopaminergen Phänotyp anzunehmen. Alternativ oder zusätzlich dazu kann eine implantierte Zusammensetzung ein pluripotentes Neuron in Kombination mit einem oder mehreren Faktoren enthalten, die ihre Entwicklung in Richtung eines dopaminergen neuronalen Schicksals wie oben beschrieben steuern, z.B. mit einem Typ-1-Astrozyten.

[0052] Neuronen können durch ein beliebiges fachbekanntes Verfahren in einen Patienten implantiert werden [z.B. O. Lindvall, *Mov. Disord.* 13, Suppl. 1, 83–7 (1998), C. R. Freed et al., *Cell Transplant* 6, 201–202 (1997); Kordower et al., *New England Journal of Medicine* 332, 1118–1124 (1995), C. R. Freed, *New England Journal of Medicine* 327, 1549–1555 (1992)].

[0053] Eine Verabreichung einer Zusammensetzung, die Neuronen enthält, die gemäß der vorliegenden Erfindung produziert wurden, erfolgt vorzugsweise in einer „prophylaktisch wirksamen Menge“ oder einer „therapeutisch wirksamen Menge“ (wie es der Fall sein kann, auch wenn Prophylaxe als Therapie angesehen werden kann), wobei diese ausreichend ist, um Nutzen für das Individuum zu bringen. Die tatsächliche verabreichte Menge und die Geschwindigkeit und der Zeitverlauf der Verabreichung hängen vom Wesen und der Schwere, was behandelt wird, ab. Eine Verschreibung der Behandlung, z.B. Entscheidungen über Dosierung etc., liegt im Verantwortungsbereich von Allgemeinmedizinerinnen und anderen Ärzten.

[0054] Eine Zusammensetzung kann alleine oder in Kombination mit anderen Behandlungen entweder gleichzeitig oder nacheinander abhängig vom zu behandelnden Leiden verabreicht werden.

[0055] Die hierin bereitgestellten Verfahren zum Induzieren eines neuronalen Schicksals in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen können unter Verwendung von neuronalen Stammzelllinien oder neuronalen

Vorläuferzelllinien als Quellenmaterial durchgeführt werden. Auf diese Weise gibt es im Wesentlichen keine Einschränkung der Zahl von Neuronen, die produziert werden können.

[0056] Um mögliche Nachteile, die mit immunologischer Abstoßung von transplantierten Zellen assoziiert sind, zu lindern, können neurale Stamm- oder Vorläuferzellen aus einem Patienten isoliert werden und der gewünschte Phänotyp induziert werden. Günstigerweise können isolierte neurale Stamm- oder Vorläuferzellen dazu verwendet werden, Stamm- oder Vorläuferzelllinien herzustellen, sodass große Zahlen an immunkompatiblen neuronalen Zellen produziert werden können. Eine weitere Option ist es, eine Zellbank herzustellen, die einen Bereich von immunologischen Kompatibilitäten abdeckt, von welchen eine geeignete Auswahl für einen bestimmten Patienten getroffen werden kann. Neuronale Stamm- oder Vorläuferzellen, die von einem Individuum abstammen, können verändert werden, um Abstoßung zu lindern, wenn sie oder ihre Nachkommen in ein zweites Individuum eingeführt werden. Beispielsweise können eine oder mehrere MHC-Allele in einer Spenderzelle durch jene eines Empfängers, z.B. durch homologe Rekombination, ersetzt werden.

[0057] Wenn neurale Stamm- oder Vorläuferzellen, die von einer Zelllinie abstammen, die ein sich unbegrenzt vermehrendes Onkogen trägt, für Implantation in einen Patienten verwendet werden, können die Onkogene unter Verwendung des CRE-loxP-Systems vor Implantation der Zellen in einen Patienten entfernt werden [K. A. Westerman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8971 (1996)]. Ein sich unbegrenzt vermehrendes Onkogen, das bei Körpertemperatur des Patienten inaktiv ist, kann verwendet werden.

[0058] Ein dopaminerges Neuron, das gemäß der Erfindung produziert wird, kann in einem Screeningverfahren auf ein Mittel zur Verwendung in der Behandlung von neurodegenerativer Erkrankung verwendet werden. Die neurodegenerative Erkrankung kann Parkinson-Erkrankung sein. Das Mittel kann ein neuroschützendes und/oder neuroregeneratives Molekül sein. Das Verfahren kann in vitro ausgeführt werden.

[0059] Das Verfahren kann Folgendes umfassen:

- (i) Behandlung eines Neurons der Erfindung mit einem Toxin für das Neuron;
- (ii) Trennen des Neurons von dem Toxin;
- (iii) Kontaktieren des behandelten Neurons mit einem Testmittel oder Testmitteln;
- (iv) Bestimmung der Fähigkeit des Neurons, sich von dem Toxin zu erholen;
- (v) Vergleich der Fähigkeit des Neurons, sich von dem Toxin zu erholen, mit der Fähigkeit des Neurons oder eines identischen Neurons, sich ohne Kontakt mit dem Testmittel/den Testmitteln von

dem Toxin zu erholen.

[0060] Das Verfahren kann Folgendes umfassen:

- (i) Behandlung eines Neurons der Erfindung mit einem Toxin für das Neuron in Gegenwart eines Testmittels oder von Testmitteln;
- (ii) Bestimmung der Fähigkeit des Neurons, das Toxin zu tolerieren;
- (iii) Vergleich der Fähigkeit des Neurons, das Toxin zu tolerieren, mit der Fähigkeit des Neurons oder eines identischen Neurons, das Toxin ohne Kontakt mit dem Testmittel/den Testmitteln zu tolerieren.

[0061] Das Toxin kann 6-Hydroxydopamin, 5,7-Dihydroxytryptamin oder 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) sein. Die Fähigkeit des Neurons, sich von dem Toxin zu erholen oder dieses zu tolerieren, kann durch ein beliebiges fachbekanntes Verfahren bestimmt werden, z.B. durch Überwachung der Zelllebensfähigkeit (z.B. durch Zellzählung, z.B. mithilfe des TUNEL-Verfahrens), durch Überwachung der Morphologie (z.B. Sprouting, axonale Elongation und/oder Verzweigung) und/oder Überwachung von Biochemie (z.B. TH-Aktivität, z.B. Neurotransmitteraufnahme/-freisetzung/-gehalt).

[0062] Neurale Stamm- oder Vorläuferzellen, die in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, umfassen C17.2 [E. Y. Snyder et al., Cell 68, 33–51 (1992)] und die menschliche H6-Zelllinie [Flax et al., Nature Biotech. 16 (1998)]. Weitere Beispiele sind in F. H. Gage et al., Ann. Rev. Neurosci. 18, 159–192 (1995), aufgelistet.

[0063] Während die vorliegende Diskussion unter Verweis auf neurale Stammzellen oder neurale Vorläuferzellen durchgeführt worden ist, können die hierin bereitgestellten Verfahren auf das Induzieren von neuronalen Schicksalen in anderen Stamm-/Vorläuferzellen angewendet werden. Beispiele für solche Zellen umfassen Stammzellen, die mit nicht-neuralen Systemen assoziiert sind. Die Verfahren können auf hämopoetische Stammzellen und/oder proliferative Zellen aus der Epidermis angewendet werden. Hämopoetische Zellen können aus Blut oder mittels Knochenbiopsie gewonnen werden. Epithelzellen können mittels Hautbiopsie oder durch Abkratzen, z.B. der Mundschleimhaut, gewonnen werden. Da ein neuronaler Phänotyp kein physiologisches In-vivo-Schicksal dieser Stamm-/Vorläuferzellen ist, kann das induktive Verfahren als Transdifferenzierung oder Desdifferenzierung und neurale Redifferenzierung bezeichnet werden. Ein Verfahren zum Induzieren eines neuronalen Schicksals bei solchen Zellen kann die Verwendung von Antisense-Regulatoren zu Genen umfassen, die mit nicht-neuronalen Phänotypen assoziiert sind, d.h. um die Differenzierung dieser Zellen zu nicht-neuronalen Schicksalen zu unterdrücken und/oder umzukehren.

[0064] Die Verfahren der vorliegenden Erfindung können auf Stammzellen angewendet werden, die sich vor neuralen Stammzellen im Entwicklungsweg befinden. Sie können auf Stammzellen angewendet werden, die in der Lage sind, zwei oder mehrere Tochterstammzellen entstehen zu lassen, die mit verschiedenen Entwicklungssystemen assoziiert sind. Beispiele für Tochterstammzellen sind hämopoetische Stammzellen, proliferative Zellen aus der Epidermis und neurale Stammzellen.

[0065] Wie oben beschrieben zeigt die vorliegende Offenbarung, dass dopaminerge Neuronen aus multipotenten neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen durch ein Verfahren, das die Expression von Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau erfordert, in Kombination mit einem oder mehreren Faktoren, die von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesencephalons bereitgestellt werden oder davon abstammen, hergestellt werden können. Der eine oder mehrere Faktoren sind löslich und sekretiert, wie durch eine Fähigkeit bestimmt wird, durch ein mikroporöses Insert hindurchzutreten. Der Faktor oder die Faktoren scheinen auch labil zu sein.

[0066] In verschiedenen weiteren Aspekten befasst sich die vorliegende Erfindung mit der Bereitstellung von Tests und Verfahren zum Screening auf einen Faktor oder Faktoren, die ein dopaminerges Schicksal in einer neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, und mit einem Faktor oder Faktoren, die dadurch identifiziert werden.

[0067] Die Erfindung stellt ein Screeningverfahren auf einen Faktor oder Faktoren bereit, die in der Lage sind, entweder alleine oder in Kombination ein dopaminerges Schicksal in einer neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle zu induzieren, die Nurr1 über dem Grundniveau exprimiert. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt die Verwendung einer neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, beim Screening oder der Suche nach einem Faktor oder Faktoren und/oder Gewinnen/Identifizieren eines Faktors oder Faktoren bereit, der/die ein dopaminerges Schicksal in einer solchen Stamm- oder Vorläuferzelle induziert/induzieren.

[0068] Ein Screeningverfahren kann Folgendes umfassen:

- (a) Kontaktieren einer Testsubstanz mit einer neuralen Stammzelle oder neuralen Vorläuferzelle, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, wobei der Kontakt eine Wechselwirkung zwischen der Testsubstanz und der neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle hervorrufen kann; und
- (b) Bestimmung der Wechselwirkung zwischen der Testsubstanz und der neuralen Stamm- oder

Vorläuferzelle.

[0069] Ein Screeningverfahren kann das Kontaktieren einer Testsubstanz mit einer Membranfraktion, die von einer neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle abstammt, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, und die Bestimmung der Wechselwirkung zwischen der Testsubstanz und der Membranfraktion umfassen. Die Herstellung von Membranfraktionen liegt innerhalb der Fähigkeiten von Fachleuten.

[0070] Bindung oder Wechselwirkung kann durch eine beliebige Zahl an fachbekannten Verfahren bestimmt werden, qualitativ oder quantitativ. Wechselwirkung zwischen der Testsubstanz und der Stamm- oder Vorläuferzelle kann durch Markierung einer davon mit einer detektierbaren Markierung und Kontaktieren mit der anderen, die möglicherweise auf einem festen Träger immobilisiert wurde, z.B. durch Verwendung eines Antikörpers, der an einen festen Träger gebunden ist, oder über andere per se bekannte Technologien, studiert werden.

[0071] Ein Screeningverfahren kann das Kultivieren einer neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle in Gegenwart einer Testsubstanz oder von Testsubstanzen und Analyse der Zelle auf Differenzierung zu einem dopaminergen Phänotyp umfassen, z.B. durch Detektion eines Markers des dopaminergen Phänotyps wie hierin beschrieben. Tyrosinhydroxylase (TH) ist ein Marker des dopaminergen Phänotyps.

[0072] Jegliche der gemäß der vorliegenden Erfindung gescreenten Substanzen kann eine natürliche oder synthetische chemische Verbindung sein.

[0073] Ein Screeningverfahren kann den Vergleich von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons mit neuronalen Zellen (z.B. Astrozyten) umfassen, die nicht in der Lage sind, ein dopaminerges Schicksal in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen zu induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren. Der Vergleich kann zum Beispiel zwischen den Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons und Typ-1-Astrozyten aus anderen neuronalen Orten erfolgen.

[0074] Ein Screeningverfahren, das Astrozyten umfasst, kann sich unbegrenzt vermehrende Astrozyten verwenden. Es kann Astrozytenzelllinien umfassen, z.B. Astrozytenmesenzephalonzelllinien. Solche Zelllinien stellen eine homogene Zellpopulation bereit.

[0075] Ein Screeningverfahren kann ein beliebiges Verfahren zur Analyse eines phänotypischen Unterschieds zwischen Zellen verwenden und auf DNA-, mRNA-, cDNA- oder Polypeptidebene vorliegen. Differentielles Screening und Genscreening sind zwei solche Verfahren. Eine Substanz, die durch ein belie-

biges der hierin beschriebenen Screeningverfahren identifiziert wird, kann als Testsubstanz in einem beliebigen der anderen hierin beschriebenen Screeningverfahren verwendet werden.

[0076] Ein Screeningverfahren kann eine Nuclein-expressionsanordnung, z.B. eine Maus-cDNA-Expressionsanordnung, verwenden. In diesem Ansatz wird eine Anordnung verschiedener Nucleinsäuremoleküle auf einem Filter arrangiert, z.B. durch Vernetzung der Nucleinsäure mit dem Filter. Eine Testlösung oder ein Extrakt wird erhalten und die Nucleinsäure innerhalb markiert, z.B. durch Fluoreszenz. Die Lösung oder der Extrakt wird dann auf den Filter aufgetragen. Hybridisierung der Testnucleinsäure an die Nucleinsäure auf dem Filter wird bestimmt und mit der Hybridisierung verglichen, die mit einer Kontrolllösung erhalten wird. Ein Unterschied zwischen der Hybridisierung, die mit den Testproben und mit den Kontrollproben erhalten wird, gibt einen anderen Nucleinsäuregehalt an. Für weitere Informationen über Nucleinsäureanordnungen siehe www.clontech.com.

[0077] Ein Screeningverfahren kann den Vergleich von C17.2-Elternzellen mit C17.2-Zellen umfassen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, z.B. um Targetgene von Nurr1 und/oder den/die Rezeptor(en) für den Faktor oder die Faktoren zu identifizieren, die von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons bereitgestellt oder daraus gewonnen werden und die ein dopaminerges Schicksal in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren. Sobald das/die Targetgen(e) und/oder Rezeptor(en) identifiziert worden sind, können sie isoliert und/oder gereinigt und/oder kloniert werden und in Verfahren zum Screening auf den Faktor oder Faktoren selbst, z.B. durch Affinitätschromatographie, verwendet werden.

[0078] Ein Screeningverfahren kann die Reinigung und/oder das Isolieren einer Substanz oder von Substanzen auf einem Gemisch umfassen. Das Verfahren kann die Bestimmung der Fähigkeit einer oder mehrerer Fraktionen des Gemisches umfassen, mit einer neuralen Stammzelle oder neuronalen Vorläuferzelle wechselzuwirken, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, z.B. die Fähigkeit, sich an solche neurale Stamm- oder Vorläuferzellen zu binden und/oder ein dopaminerges Schicksal in diesen zu induzieren. Die Reinigung und/oder das Isolieren kann ein beliebiges fachbekanntes Verfahren umfassen.

[0079] Ein Screeningverfahren kann einen induzierbaren Promotor umfassen, der operabel an eine Nucleinsäure gebunden ist, die für eine Testsubstanz kodiert. Ein solches Konstrukt wird in eine Wirtszelle inkorporiert, und eine oder mehrere Eigenschaften der Zelle unter den permissiven oder nicht-permissi-

ven Bedingungen des Promotors werden bestimmt und verglichen. Die bestimmte Eigenschaft kann die Fähigkeit der Wirtszelle sein, einen dopaminergen Phänotyp in einer gemeinsam kultivierten neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle zu induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert. Ein Unterschied der Fähigkeit der Wirtszelle zwischen den permissiven und nicht-permissiven Bedingungen gibt an, dass die Testsubstanz in der Lage sein kann, entweder alleine oder in Kombination ein dopaminerges Schicksal in einer neuralen Stamm- oder Vorläuferzelle zu induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert.

[0080] Das genaue Format eines beliebigen der Screeningverfahren der vorliegenden Erfindung kann von Fachleuten unter Verwendung von routinemäßigen Fähigkeiten und Wissen variiert werden.

[0081] Ein Faktor oder Faktoren, der/die durch ein beliebiges Verfahren identifiziert worden ist/sind, das von der Erfindung bereitgestellt wird, kann/können isoliert und/oder gereinigt und/oder weiter erforscht werden. Er kann hergestellt werden.

[0082] Ein Faktor, der durch oh beliebiges der hierin offenbarten Verfahren identifiziert wurde, kann zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung, einem Medikament, Arzneimittel oder einer anderen Zusammensetzung formuliert werden, die einen solchen Faktor umfasst (wobei die Zusammensetzung eine neurale Stamm- oder Vorläuferzelle umfasst, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau umfasst), oder dazu verwendet werden, neurale Stamm- oder Vorläuferzellen zu induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, um einen dopaminergen Phänotyp anzunehmen, oder ein solcher Faktor oder eine Zusammensetzung kann in einem Verfahren zur medizinischen Behandlung oder in einem Verfahren verwendet werden, das die Verabreichung eines solchen Faktors oder einer Zusammensetzung an einen Patienten umfasst, z.B. zur Behandlung (die Präventivbehandlung umfassen kann) eines medizinischen Leidens, das mit Schäden an, Verlust von oder einem Leiden in dopaminergen Neuronen assoziiert ist, z.B. zur Behandlung von Parkinson-Erkrankung oder einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, oder ein solcher Faktor kann zur Herstellung einer Zusammensetzung, eines Medikaments oder eines Arzneimittels zur Verabreichung, z.B. zur Behandlung von Parkinson-Erkrankung oder einer anderen Erkrankung (z.B. neurodegenerative Erkrankungen), verwendet werden, wobei ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung die Mischung eines solchen Faktors mit einem pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten, Vehikel oder Träger und gegebenenfalls anderen Inhaltsstoffen umfasst.

[0083] In einem verwandten Aspekt stellt die vorlie-

gende Erfindung ein Verfahren zum Screening auf eine Substanz bereit, welche die Fähigkeit von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons moduliert, um ein dopaminerges Schicksal in neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen zu induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren.

[0084] Ein solches Verfahren kann eines oder mehrere der Folgenden umfassen:

- (i) gemeinsames Kultivieren von Typ-1-Astrozyten mit neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, in Gegenwart einer oder mehrerer Testsubstanzen;
- (ii) Kontaktieren von neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, mit einem oder mehreren Faktoren, die durch ein von der Erfindung bereitgestelltes Screeningverfahren identifiziert wurden, dass sie in der Lage sind, einen dopaminergen Phänotyp in diesen Zellen zu induzieren, wobei der Kontakt in Gegenwart einer oder mehrerer Testsubstanzen erfolgt;
- (iii) Analyse des Anteils der Stamm- oder Vorläuferzellen, die ein dopaminerges Schicksal annehmen;
- (iv) Vergleich des Anteils der Stamm- oder Vorläuferzellen, die ein dopaminerges Schicksal annehmen, mit der Anzahl der Stamm- oder Vorläuferzellen, die in einem vergleichbaren Reaktionsmedium und unter vergleichbaren Bedingungen in Abwesenheit der Testsubstanz(en) ein dopaminerges Schicksal annehmen. Ein Unterschied im Anteil von dopaminergen Neuronen zwischen den behandelten und unbehandelten Co-Kulturen zeigt eine modulierende Wirkung der relevanten Testsubstanz(en).

[0085] Ein solches Screeningverfahren kann Folgendes umfassen:

- (i) gemeinsames Kultivieren von Typ-1-Astrozyten mit neuralen Stamm- oder Vorläuferzellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, in Gegenwart einer oder mehrerer Testsubstanzen; oder
- (ii) Analyse des Anteils der Stamm- oder Vorläuferzellen, die ein dopaminerges Schicksal annehmen;
- (iii) Vergleich des Anteils der Stamm- oder Vorläuferzellen, die ein dopaminerges Schicksal annehmen, mit der Anzahl der Stamm- oder Vorläuferzellen, die in einem vergleichbaren Reaktionsmedium und unter vergleichbaren Bedingungen in Abwesenheit der Testsubstanz(en) ein dopaminerges Schicksal annehmen.

[0086] Ein solches Screeningverfahren kann Folgendes umfassen:

- (i) Kontaktieren von neuralen Stamm- oder Vor-

läuferzellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, mit einem oder mehreren Faktoren, die durch ein von der Erfindung bereitgestelltes Screeningverfahren identifiziert wurden, dass sie in der Lage sind, einen dopaminergen Phänotyp in diesen Zellen zu induzieren, wobei der Kontakt in Gegenwart einer oder mehrerer Testsubstanzen erfolgt;

(ii) Analyse des Anteils der Stamm- oder Vorläuferzellen, die ein dopaminerges Schicksal annehmen;

(iii) Vergleich des Anteils der Stamm- oder Vorläuferzellen, die ein dopaminerges Schicksal annehmen, mit der Anzahl der Stamm- oder Vorläuferzellen, die in einem vergleichbaren Reaktionsmedium und unter vergleichbaren Bedingungen in Abwesenheit der Testsubstanz(en) ein dopaminerges Schicksal annehmen.

[0087] Nach Identifikation einer Substanz, die induktive Aktivität moduliert, kann die Substanz weiter erforscht werden. Sie kann hergestellt und/oder in der Zubereitung, d.h. Herstellung oder Formulierung, einer Zusammensetzung, wie z.B. eines Medikaments, einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Arzneimittels, verwendet werden. Eine beliebige Substanz, die auf ihre Modulationsaktivität getestet wird, kann eine natürliche oder synthetische chemische Verbindung sein.

[0088] Nun werden Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung durch Beispiele, unter Verweis auf die Figuren im Anhang veranschaulicht. Weitere Aspekte und Ausführungsformen sind für Fachleute verständlich.

Kurzbeschreibung der Zeichnungen

[0089] [Fig. 1](#) zeigt die Charakterisierung von Nurr1-C17.2-Klonen.

[0090] [Fig. 1A](#) zeigt die verbleibende Proliferationsgeschwindigkeit der Eltern-, Nurr1- und Mock-C17.2-Kontrollklone. % BrdU+ gibt den Prozentsatz der Zellen an, die BrdU nach sechs Stunden Puls in serumfreiem Medium inkorporierten.

[0091] [Fig. 1B](#) zeigt, dass Expression von Nurr1 neuronales Schicksal in serumfreiem Medium signifikant verstärkt. % TuJ1+/% BrdU- gibt den Prozentsatz der Zellen an, die β -Tubulin-III exprimierten, aber BrdU nicht inkorporierten.

[0092] [Fig. 1C](#) zeigt, dass das gemeinsame Kultivieren zweier Klone mit E16-Zellen des Ventralmesenzephalons das dopaminerge Schicksal signifikant erhöht. % TH+ gibt den Prozentsatz von tyrosinhydroxylasepositiven C17.2-Zellen an.

[0093] [Fig. 2](#) zeigt die Rolle von Retinoiden, bFGF

und Proliferation beim Induzieren von dopaminergen Neuronen aus Nurr1-überexprimierenden neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelllinien in gemeinsamen Kulturen des Ventralmesenzephalons.

[0094] [Fig. 2A](#) zeigt die Wirkungen von SR11237, bFGF und EGF auf dopaminerge Induktion. % TH+ gibt den Prozentsatz von C17.2-Zellen, die Tyrosinhydroxylase exprimieren, in gemeinsamer Kultur an. (C) Gemeinsame Kulturen von E16-VM-Zellen mit Eltern-C17.2-Zellen oder mit Nurr1-C17.2-Klon-42-Zellen; (SR) gemeinsame Kultur plus SR11237; (F) gemeinsame Kultur plus bFGF; (α F) gemeinsame Kultur plus Blockade des Antikörpers gegen bFGF; (E) gemeinsame Kultur plus EGF.

[0095] [Fig. 2B](#) zeigt die Verbindung zwischen Proliferation und dopaminergem Induktion. % TH+ gibt den Prozentsatz von C17.2-Zellen, die Tyrosinhydroxylase exprimieren, nach gemeinsamer Kultur für 9 DIV an. % BrdU+ gibt den Prozentsatz jener Zellen an, die BrdU inkorporierten.

[0096] [Fig. 3](#) zeigt, dass VM-Typ-1-Astrozyten einen dopaminergen Phänotyp auf einer Nurr1-überexprimierenden neuronalen Stammzelllinie (Nurr1-C17.2-Klon 42) induzieren. % TH+ gibt den Prozentsatz von Klon-42-Zellen an, die Tyrosinhydroxylase exprimieren. (E16VM) gemeinsame Kultur von Klon 42 mit E16-Ventralmesenzephalonzellen; (Tot) gemeinsame Kultur mit allen primären Zellen; (Ad+) gemeinsame Kultur mit adhärenter Zellfraktion; (Ad-) gemeinsame Kultur mit nicht-adhärenter Zellfraktion; (T1A) gemeinsame Kultur mit Typ-1-Astrozyten; (p1 T1A) gemeinsame Kultur mit Typt-Astrozyten vom ersten Tag nach Geburt aus dem Ventralmesenzephalon. (Insert) Insert trennt Klon-42-Zellen aus P1-T1A-Zellen in gemeinsamer Kultur; (CTX) gemeinsame Kultur mit Cortex, (HC) gemeinsame Kultur mit Hippocampus; (SC) gemeinsame Kultur mit Rückenmark.

[0097] [Fig. 4](#) veranschaulicht die HPLC-Analyse von Überständen, die aus gemeinsamen Kulturen von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons (T1A) entweder mit KCl-depolarisierten Nurr1-C17.2-Klon42-(c42-)Zellen oder KCl-depolarisierten Eltern-C17,2-(C17-2-)Zellen gewonnen wurden. (+SR+bFGF) gemeinsame Kulturen plus bFGF und SR11237.

[0098] [Fig. 5](#) zeigt, dass frühe Aktivität von Nurr1 langanhaltende Veränderungen in der Genexpression in C17.2-Zellen produziert. Relativ Lichteinheiten (RLU) zeigen die Expression von Luciferase aus einem Nurr1-aktivierten NBRE-Luciferasereporter.

Detaillierte Beschreibung

VERFAHREN

Nurr1-überexprimierende Zelllinien

[0099] C17.2-Zellen wurden mit einem CMX-Nurr1-Expressionsvektor (T. Perlmann et al., Genes Dev. 9, 769–782 (1995)) und PGK-Puromycin-resistenzplasmiden (Nurr1-Klone) oder einem PGK-Puromycin alleine (Scheinklone) cotransfiziert. Für Reportertests wurden C17.2-Elternzellen mit dem Nurr1-Expressionsvektor, dem Reporterplasmid (NGFIB-Bindungsreaktionselement-(NBRE-)Triplett stromauf von minimalem TK-Promotor, an Glühwürmchenluciferase fusioniert) und einem pRSV-alkalische-Phosphatase-Plasmid in einem Verhältnis 2:1:2 transfiziert.

[0100] Fünzig Nurr1-transfizierte Klone wurden aufgrund von Puromycinresistenz ausgewählt, isoliert und amplifiziert, und Nurr1-mRNA-Expression wurde durch einen RNase-Schutztest (RPA) analysiert. Tests wurden unter Verwendung des RPAII-Ribonuclease-Schutztestsets (Ambion) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Eine 288-bp-Antisense-Nurr1-cRNA-Sonde, die sich über die Nucleotide 1798–2086 der Maus-Nurr1-cDNA-Sequenz erstreckt (S. W. Law et al., Mol. Endocrinol. 6, 2129–2135 (1992)), wurde mit T7 (aus einer Nurr1-cDNA, die in die Eco-RI/XhoI-Stelle des PBS-KS+-Vektors kloniert wurde, linearisiert mit Eco-RI) transkribiert und mit (α -³²P)CTP (Amersham) markiert. Geschützte cRNA-Fragmente wurden auf 4% PAGE unter denaturierenden Bedingungen getrennt. Die Intensität des Signals wurde mit einem Phosphorbildgeber MD Storm 840 analysiert, und Nurr1-Signal wurde auf den Gehalt von GAPDH in jeder Probe standardisiert.

Zellkultur und Behandlungen

[0101] Neurale C17.2-Stammzellen [E. Y. Snyder et al., Cell 68, 33–51 (1992)] wurden aufrechterhalten und wie zuvor beschrieben passagiert [E. Y. Snyder et al., Cell 68, 33–51 (1992)]. Ventralmesenzephal von E16-Rattenembryos wurden seziiert, mechanisch dissoziiert und bei einer Enddichte von 1×10^5 Zellen/cm² auf Poly-DLysinbeschichteten Kulturwells in einem definierten serumfreien Medium (N2, das aus einem 1:1-Gemisch aus F12 und DMEM besteht, das Insulin (10 ng/ml), Transferrin (100 µg/ml), Putrescin (100 µM), Progesteron (20 nM), Selen (30 nM), Glucose (6 mg/ml) und Rinderserumalbumin (1 mg/ml) enthält) ausplattiert. Nach 24 Stunden in vitro wurden die gemeinsamen Kulturen durch direktes Ausplattieren von $2,5\text{--}5 \times 10^4$ von C17.2 abstammenden Zellen in Primärkulturen ausplattiert, wobei alle Kulturalter diesen Punkt als 0 DIV verwenden. Diese Abfolge des Ausplattierens und das Verhältnis von primären

zu C17.2-Zellen resultiert in den gesündesten Kulturen, obwohl variierende Anzahlen von C17.2-Zellen über einen 10fachen Bereich den Anteil von beobachteten TH+-Zellen nicht signifikant beeinflussten. Gereinigte Typ-1-Astrozyten wurden aus gemischten Gliakulturen gewonnen, die gemäß einem Standardprotokoll aus verschiedenen Regionen von P1-Ratten gewonnen wurden [K. D. McCarthy et al., J. Cell Biol. 85, 890–902 (1980)]. Nach erneutem Ausplattieren in 6- oder 12-Wellplatten wurden Astrozyten in serumenthaltendem Medium zu Konfluenz gezüchtet und auf N2-Medium geändert. Nach 3–5 DIV wurden gemeinsame Kulturen in frischem N2 wie oben beschrieben initiiert. Alle Faktoren wurden auf einmal beim Initiieren der gemeinsamen Kultur hinzugegeben (Konzentrationen sind im Kapitel Ergebnisse und Diskussion angeführt), mit der Ausnahme von 5-Bromdesoxyuridin (BrdU), das 4–6 Stunden vor Fixierung hinzugegeben wurde. Die Kulturen wurden in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO₂, 95% Luft bei 37°C aufrechterhalten und nach einer bestimmten Zeitperiode mit 4% Paraformaldehyd 45 Minuten lang für immunzytochemische Analyse fixiert.

Immunzytochemische Analyse und HPLC

[0102] Fixierte Kulturen wurden mit einem der folgenden Antikörper, in geeigneter Weise in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) verdünnt, die 1% Rinderserumalbumin und 0,3% Triton-X-100 enthält, inkubiert: Maus-Anti-BrdU, 1:50 (DAKO, Dänemark), Maus-Anti-β-Tubulin, Typ III (TuJ1), 1:250 (Sigma), Maus-Anti-TH, 1:1000 (Incstar, USA), Kaninchen-Anti-β-Galactosidase, 1:250 (Cappel, USA), Kaninchen-Anti-GFAP, 1:500 (DAKO, Dänemark), Kaninchen-Anti-AHD-2, 1:4000. Inkubationen wurden entweder bei 4°C über Nacht oder bei Raumtemperatur eine Stunde lang durchgeführt. Beide Verfahren erbrachten ähnliche Ergebnisse. Nach Waschung wurden die Kulturen 1–3 Stunden lang mit geeigneten sekundären Antikörpern (biotinyliertem Pferd-Anti-Maus-IgG oder Ziegen-Antikaninchen-IgG, Vector, USA), 1:100, im selben Verdünnungspuffer inkubiert. Immunfärbung wurde mit dem Vector-Laboratory-ABC-Immunperoxidase-Set unter Verwendung von entweder AEC-(rot) oder SG-(grau) Substraten sichtbar gemacht. Fluoreszenz-Doppelmarkierung von β-Galactosidase (β-gal) wurde durch Substitution des biotinylierten, mit FITC-konjugierten sekundären Antikörper (Vector, USA), 1:100, durchgeführt. Quantitative immunzytochemische Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler von 100–500 Zellen, die in jedem von 3–6 separaten Wells aus 2–4 Versuchen gezählt wurden. Für eine Quantifizierung von TH-Expression in gemeinsamen Kulturen von primären und von C17.2-abstammenden Zellen wurde TH mit dem Hellfeld-AEC-Substrat sichtbar gemacht, während β-gal unter Verwendung von FITC beurteilt wurde, daher repräsentieren alle Daten, die als „% TH+“ ausgedrückt wurden, die Anzahl von

TH+/ β -gal+, dividiert durch alle β -gal-positive Zellen.

[0103] Zur Analyse von Dopaminfreisetzung wurden große (10 cm) gemeinsame Kulturen, die etwa 1 Million Nurr1-C17.2-c42-Zellen oder C17.2-Elternzellen mit P1-VM-T1A enthielten, mit 200 μ l 50 mM KCl in PBS/0,1 M Natriumcitrat 5 Minuten lang während Verwirbeln behandelt. Die Überstände wurden unter Verwendung von Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) sofort auf Dopamingehalt getestet. Die Proben wurden mit einer Umkehrphasen-C-18-Säule getrennt, mit Acetonitril eluiert und elektrochemisch detektiert. Die Ergebnisse wurden mit einem Standard, der Dopamin, DOPAC, 5-HT und 5-HIAA enthielt, verifiziert.

Langfristige Kulturen und Transplantation

[0104] C17.2-Elternzellen oder C17.2-Nurr1-c42-Zellen wurden in großen (10 cm) gemeinsamen Insert-Kulturen mit VM-Typ-1-Astrozyten 8 Tage lang in Gegenwart von bFGF (10 ng/ml) und SR11237 (1 μ M) gezüchtet. Zellen wurden vom Insert abtrypsinisiert, pelletiert und in einer Konzentration von 100.000 Zellen/ μ l in ihrem eigenen konditionierten Medium resuspendiert; eine Aliquote dieses Gemisches wurde dann in eine mit Poly-D-Lysin behandelte 6-Wellgewebeskulturplatte ausplattiert, die N2-Medium enthielt, während der Rest zur Transplantation verwendet wurde. Erwachsene (25–30 Gramm) CD1-Mäuse, die gemäß den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft (86/609/EEC) beherbergt und behandelt wurden, wurden mit Pentobarbital (60 mg/kg i.p.) anästhetisiert. 25.000 Zellen wurden stereotaktisch an jeder der zwei folgenden Koordinaten (in mm) in das Striatum injiziert: AP (Bregma) = 0,56, L = 1,9, DV (Dura) = –2,55 und –2,75, mit dem Inzisivbalken bei –3. Zwölf Tage nach Transplantation wurden die Mäuse transkardial mit 4% Paraformaldehyd perfundiert. Gehirne wurden 2 Stunden lang postfixiert, in 10% Saccharose mehr als 1 Tag lang eingebettet und in trockeneisgekühltem Isopentan gefroren. 14 μ m große Kryostatsektionen wurden für TH-Immunhistochemie unter Verwendung von Maus-Anti-TH-(Incstar, Minnesota, USA), 1:1000, und Esel-Anti-Maus-Rhodamin-(Jackson, Pennsylvania, USA), 1:100, Antikörpern verarbeitet. TH-positive Zellen wurden unter Verwendung einer Hamamatsu-Kamera, die an Zeiss-Axioplan-2-Mikroskop angeschlossen ist, fotografiert.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Expression von Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau in multipotenten neuralen Stammzellen

[0105] Die Erfinder verwendeten einen gut charakterisierten Klon von multipotenten neuralen Stammzellen, die C17.2 genannt wurden (E. Y. Snyder et al., Cell 68, 33–51 (1992)). Anfänglich von sich entwi-

ckelndem Mauscerebellum abstammend, sind C17.2-Zellen mit v-myc immortalisiert worden, besitzen einen lacZ-Reporter, besitzen die Fähigkeit, sich in vitro und in vivo zu Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren, und nehmen bei Transplantation in das sich entwickelnde Gehirn geeignete neuronale Phänotypen an [E. Y. Snyder et al., Cell 68, 33–51 (1992); E. Y. Snyder et al., Nature 374, 367–370 (1995)]. Weiters steuern dieselben einzelnen Faktoren, von denen bekannt ist, dass diese die Differenzierung von primären Stammzellen aus dem fötalen und erwachsenen zentralen Nervensystem steuern [K. K. Johe et al., Genes Dev. 10, 3129–3140 (1996)], die In-vitro-Differenzierung von C17.2-Zellen.

[0106] C17.2-Zellen wurden wie nachstehend beschrieben stabil transfiziert, und fünfzig Nurr1-Klone wurden mittels RNase-Schutztest (RPA) auf Transgenexpression analysiert. Mehrere Nurr1-Klone überexprimierten das Transgen, wovon die fünf höchsten Expressoren für Analyse ausgewählt wurden. Diese fünf ausgewählten Klone exprimierten viel höhere Ausmaße von Nurr1 als C17.2-Elternzellen oder Zellen des Ventralmesenzephalons, Cerebellums oder Cortex. Acht zufällig ausgewählte Scheinkontrollklone wurden ebenfalls ausgewählt. Alle Nurr1-Klone verhielten sich ähnlich wie die Eltern- und Scheinklone in serumenthaltendem Medium, mit keinen offensichtlichen Unterschieden in Wachstumsrate oder Morphologie.

Differenzierungsvermögen von Nurr1-überexprimierenden Klonen

[0107] Zur Definition des Differenzierungsvermögens und des phänotypischen Schicksals von Nurr1-überexprimierenden Klonen untersuchten die Erfinder das Verhalten der Klone nach Passagieren mit geringer Dichte in serumfreies, definiertes Medium (Bedingungen ermöglichen Differenzierung): In diesem Zustand beginnt die Elternzelllinie sich zu differenzieren, sodass nach 4–5 Tagen in vitro (DIV) 80–85% der Population post-mitotisch sind (d.h. BrdU ist nach erweitertem Puls negativ), während etwa 20–30% der post-mitotischen Zellen ein neuronales Schicksal annehmen, beurteilt durch die Expression von β -Tubulin-III (TuJ1).

[0108] Die Wirkungen von Nurr1 auf Differenzierungsvermögen, wie durch die Inkorporation von 10 μ M BrdU nach einem 6-Stundenpuls in serumfreies Medium gemessen wurde, wurden variiert. Obwohl es einen Trend zu erhöhter Differenzierung innerhalb der Nurr1-Klone gibt, war keine klare Wirkung des Transgens auf dieses Verfahren zu beobachten (**Fig. 1A**). Jedoch waren die Wirkungen von Nurr1 auf das Schicksal von postmitotischen Zellen klar und robust (**Fig. 1B**). Expression des Nurr1-Transgens verstärkt das neuronale Schicksal in serumfreiem Medi-

um, wie durch die Expression von β -Tubulin-III (TuJ1) beurteilt, auf einen Durchschnitt von 68% der postmitotischen Zellen über alle fünf Klone signifikant (allgemeine Wirkung von Nurr1-Transgen gegen Schein, $*P < 0,0001$ durch 2-Weg-ANOVA). In vier von fünf Nurr1-Klonen nahm die große Mehrheit von postmitotischen Zellen (größer als 60%) ein neuronales Schicksal an, ein Phänomen, das in keinem Scheinklon zu sehen war.

[0109] Obwohl Nurr1 die C17.2-Zelllinie auf neuronale Linien einzuschränken schien, war das neurochemische Schicksal dieser Neuronen nicht dopaminerg, da keine signifikante Tyrosinhydroxylase-(TH, ein Marker für dopaminerge Neuronen) Immunreaktivität in einem beliebigen der Nurr1-Klone unter diesen Bedingungen detektiert wurde.

Induzieren von dopaminergem Schicksal in Nurr1-überexprimierenden Klonen

[0110] Die Erfinder behandelten Nurr1-Klone mit einer Vielzahl von trophischen Faktoren, Mitogenen, Cytokinen und anderen Mitteln, von denen bekannt ist, dass sie bei der Proliferation (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), insulinähnlicher Wachstumsfaktor, fötales Kälberserum), Differenzierung (Retinsäure, Dopamin, Forskolin, Sonic Hedgehog) und Überleben (von Gliazelllinie abstammender neurotrophischer Faktor, gehirnstammender neurotrophischer Faktor, Neurotrophin-3, Ziliar-Neurotroph-Faktor) der endogenen dopaminergen Neuronen wichtig sind. Keiner dieser Faktoren induziert TH-Expression in einem beliebigen der Klone, alleine oder kombiniert.

[0111] Die Nurr1-Klone wurden in vitro gemeinsam mit primären Kulturen kultiviert, die aus E16-Ratten-Ventralmesenzephalon gewonnen wurden, wobei das Alter und die Region jene sind, wo endogene dopaminerge Neuronen der Substantia nigra gerade erst gebildet worden sind (J. Altman et al., *Neurogenesis und Neuronal Migration*, in: *The Rat Nervous System*, 2. Auflage, Hrsg. G. Paxinos, Academic Press, San Diego, 1054 (1995)). Unter diesen Bedingungen zeigte ein signifikanter Prozentsatz von Zellen aus zwei der Nurr1-Linien (die Klone mit der höchsten Proliferationskapazität, Klon 4 und 42) messbare Mengen von TH-Immunreaktivität (**Fig. 1C** – $*P < 0,0001$, Wechselwirkung von Transgenen gegen Klon durch 2-Weg-ANOVA). Wenig oder keine TH-Färbung war in der C17.2-Elternlinie oder einer beliebigen der Scheinkontrolllinien zu beobachten. Phasenkontrastmikroskopie der gemeinsamen Kulturen zeigte große proliferative Cluster von von Nurr1-Klon abstammenden TH⁺-Zellen.

[0112] Gemeinsam ließen diese Beobachtungen vermuten, dass einer oder mehrere lokale Faktoren,

die von primären Kulturen abstammten, direkt oder indirekt mit Nurr1 wechselwirkten, um TH-exprimierende Neuronen zu induzieren. TH-Expression wurde auf eine Minderheiten-Subpopulation innerhalb einer Fraktion der Nurr1-Klone eingeschränkt.

Behandlung von gemeinsamen Kulturen mit SR11237, bFGF und EGF

[0113] Behandlung von gemeinsamen Kulturen mit am stärksten TH-exprimierenden Nurr1-Klon (Klon 42) und primären VM-Zellen mit Kombinationen der zuvor erwähnten Faktoren war im Allgemeinen unwirksam in der Erhöhung von TH-Expression, mit drei wichtigen Ausnahmen, das synthetische Retinoidanalogon SR11237, bFGF und EGF (**Fig. 2A**).

[0114] Hinzufügung von SR11237 (auf 1 μ M) und bFGF (auf 10 ng/ml) zu C17.2-Elternzellen in gemeinsamer Kultur induzierte keine Expression von TH, wobei jedes dieser Moleküle TH-Expression in 40–60% der Nurr1-C17.2-Klon-42-Population erzeugte, wenn es zu gemeinsamen Kulturen in serumfreiem Medium hinzugegeben wurde. Die Wirkungen von bFGF konnten durch EGF substituiert werden. Weiters waren die Wirkungen von SR11237 und bFGF oder EGF bei sättigenden Dosen additiv (bis zu 90% LacZ⁺ waren TH⁺), was vermuten ließ, dass sie durch verschiedene Mechanismen wirkten.

[0115] SR11237 stimuliert spezifisch RXR-Retinoidrezeptoren [J. M. Lehmann et al., *Science* 258, 1944–1946 (1992)], von denen sich gezeigt hat, dass sie mit Nurr1 heterodimerisieren, um Transkriptionsinitiationskomplexe zu bilden [T. Perlmann et al., *Genes Dev.* 9, 769–782 (1995)]. Diese Beobachtung, gemeinsam mit Beobachtungen, dass All-trans-Retinsäure ohne Wirkung war, lassen vermuten, dass eine funktionale Wechselwirkung zwischen Nurr1, RXR-Rezeptoren und primären VM-Zellen involviert sein können.

[0116] Es hat sich zuvor erwiesen, dass Retinoide und FGF eine Rolle in normaler dopaminerg neuronaler Entwicklung spielen [W. Ye et al., *Cell* 93, 755–766 (1998), G. Sichele, *Trends Genet.* 13, 343–345 (1997); W. Krezel, *Science* 279, 864–867 (1998)]. Obwohl diese Faktoren den Anteil von TH-exprimierenden Zellen wie oben beschrieben erhöhen, haben die Erfinder gezeigt, dass die Wirkungen dieser Faktoren auf Nurr1-C17-2-c42 (c42) modulativ zu sein scheinen. Antagonismus von einem, mit blockierenden Antikörpern oder spezifischen RAR- oder RXR-Antagonisten, vermieden keine basale TH-Expression von c42 in gemeinsamer Kultur (d.h. etwa 10%, **Fig. 1C**). Antagonismus von Sonic Hedgehog unter Verwendung von blockierenden Antikörpern war ebenfalls in der Prävention von basaler TH-Expression unwirksam. Daher scheint die einzige obligate Anforderung an Induktion eines dopamin-

gen Phänotyps in c42 Exposition gegenüber Signalen zu sein, die aus primären Ventralmesenzephalonzellen gewonnen werden.

Vorbehandlung von Klonen mit bFGF und EGF

[0117] bFGF und EGF sind beide direkt mitogen zu den C17.2-Zellen [D. L. Kitchens et al., J. Neurobiol. 25 (7), 797–807 (1994)], aber es wurde festgestellt, dass nach verstärkter Behandlung mit einem Faktor in serumfreiem Medium (SFM) die Grundniveauproliferation der meisten Klonlinien nach Passagieren in SFM alleine unerwartet hoch blieb. Weiters war es überraschend, dass Nurr1-Klone mit dem höchsten Ausmaß an Restproliferation in serumfreiem Medium (Klone 4 und 42) signifikante TH-Expression in gemeinsamer Kultur zeigten.

[0118] Die Erfinder argumentierten, dass ein Anstieg der Proliferation von anderen Nurr1-Klonen die Anzahl von TH-exprimierenden Neuronen erhöhen sollte. Nurr1-Klone wurden mit bFGF 5 DIV vor Aufteilen und erneutem Ausplattieren in primäre Ventralmesenzephalonkulturen vorbehandelt. Schwesterkulturen wurden sowohl auf Proliferation nach Vorbehandlung und TH-Expression nach gemeinsamer Kultur für 9 DIV getestet. Dieses Verfahren ermöglichte eine selektive Untersuchung der Wirkungen von bFGF auf die Nurr1-Klone und eliminierte die mitogenen Wirkungen von bFGF auf primäre Zellen sowie ihre indirekte trophische Wirkung auf primäre dopaminerge Neuronen.

[0119] BrdU-Markierung von bFGF-vorbehandelten Nurr1-Klonen war 24 Stunden nach Passagieren der Zellen in gemeinsame Kultur im Vergleich zu Zellen, die direkt aus serumenthaltendem Medium gesplittet wurden, erhöht (Verschiebung nach rechts von einzelnen Klonen auf der X-Achse, **Fig. 2B**). Gleichzeitig mit diesem Anstieg der Proliferation wurden proportionale Anstiege im Prozentsatz von TH-positiven Zellen in allen Nurr1-Klonen beobachtet (Aufwärtsverschiebung von Klonen auf der Y-Achse, **Fig. 2B**), wobei 45% TH+ (Klon 42) erreicht wurden. Tatsächlich zeigt eine Regressionsanalyse eine signifikant lineare Beziehung ($r^2 = 0,890$ durch Regression) zwischen dem Proliferationsvermögen von Nurr1-überexprimierenden Klonen beim Beginn einer gemeinsamen Kultur und dem Hang zur Expression von TH nach Differenzierung innerhalb sowie zwischen einzelnen Klonen nach 9 DIV.

[0120] Die obigen Ergebnisse lassen daher vermuten, dass Nurr1-überexprimierende Klone vorzugsweise mitotisch sind, wenn sie zuerst mit primären VM-Zellen oder mit einem oder mehreren von primären VM-Zellen bereitgestellten oder davon abgeleiteten Faktoren kontaktiert werden, d.h. dass ein wichtiger Einfluss auf Differenzierung zu einem dopaminergen Schicksal in Nurr1-Klonen ihr Proliferationsver-

mögen ist.

[0121] Dies wird weiters durch die Beobachtung gestützt, dass zum Zeitpunkt, wenn die meisten TH-exprimierenden c42-Zellen in gemeinsamer Kultur zu erscheinen beginnen (6 DIV), fast alle davon immer noch mitotisch sind (BrdU-positiv nach akutem Pulsieren bei 6 DIV). Jedoch ist nach ähnlicher Behandlung von gemeinsamen Kulturen bei 9 DIV die große Mehrheit der TH+-Zellen BrdU-negativ, was eine Ausscheidung aus dem Zellzyklus nach Induzieren von messbarer TH-Expression vermuten lässt.

[0122] Frühere Studien, welche die Annahme von phänotypischem Schicksal während Cerebrokortex-[S. K. McConnell et al., Science 254, 282–285 (1991)] und Rückenmark-[J. Ericson et al., Cell 87, 661–673 (1996)] Entwicklung haben gezeigt, dass Exposition von nicht festgelegten Neuroblasten gegenüber räumlich eingeschränkten lokalen Faktoren spezifische Phänotypen innerhalb dieser Populationen induziert, aber diese Induktion ist von kontinuierlicher Exposition bis zur (und einschließlich der) terminalen S-Phase des Neuroblasten abhängig. Ein ähnlicher Mechanismus kann den vorliegenden Beobachtungen unterliegen.

Analyse des Induktionssignals aus primären Ventralmesenzephalonzellen

[0123] Primäre Ventralmesenzephalonkulturen umfassen typischerweise ein Gemisch von dopaminergen und anderen Neuronen, Astrozyten, Oligodendrozyten sowie verschiedenartigen nicht-neuralen Elementen, wie z.B. Microglia, Endothelzellen und Fibroblasten. Zur Identifikation der Quelle der TH-fördernden Aktivität führten die Erfinder eine Grobtrennung von primären Zellen basierend auf Adhäsion durch, die rasch adhärente Population wurde mit Glia- und nicht-neuralen Elementen angereichert, während die nicht-adhärente Population hauptsächlich aus Neuronen, Oligodendrozytenvorläufern und einigen wenigen Astrozyten bestand.

[0124] Eine gemeinsame Kultur dieser Fraktionen mit c42 zeigte, dass die Mehrheit der TH-induzierenden Aktivität innerhalb einer rasch adhären Population von E16-Ventralmesenzephalonzellen enthalten war (**Fig. 3**). Die Erfinder stellten dann gereinigte Kulturen von Typ-1-Astrozyten aus E16-Ventralmesenzephalon bereit und zeigten, dass T1A die Quelle von TH-induzierender Aktivität war: bei Abwesenheit eines beliebigen hinzugefügten Faktors nahm die Anzahl dopaminergen Zellen, die von der Nurr1-c42-Linie abgeleitet waren, dramatisch zu. Weiters war die Aktivität nicht auf eine frühe Entwicklung beschränkt, da Astrozyten, die aus VM von neugeborenen Ratten isoliert wurden, äquivalente Anzahlen von TH-positiven c42-Zellen (etwa 70%) induzierten (**Fig. 3**).

[0125] Nurr1-C17.2-c42-Zellen wurden mit Typ-1-Astrozyten-konditioniertem Medium bzw. Membranfragmenten behandelt. Jedoch induzierte keine dieser Behandlungen einen signifikanten Anstieg der Anzahl von TH-exprimierenden Zellen, was vermuten lässt, dass diese induzierende Aktivität höchst labil war. Die Erfinder kultivierten gemeinsam Astrozyten und Nurr1-C17.2-c42-Zellen, trennten aber die zwei Populationen räumlich (um etwa 1 mm) über ein mikroporöses Insert (0,4 µm poröse Membran). Das Insert ermöglichte ein freies Passagieren von Makromolekülen, vermied aber Kontakt zwischen den zwei Populationen. In dieser Umgebung wurde TH-Expression in Nurr1-C17.2-c42-Zellen in einem Ausmaß induziert, das einer direkten gemeinsamen Kultur entspricht ([Fig. 3](#)). Diese Ergebnisse stellen ein Anzeichen dafür bereit, dass Ventralmesencephalon-Typ1-Astrozyten einen höchst labilen diffundierbaren Faktor sekretieren, der mit Nurr1-exprimierenden Linien wechselwirkt, um TH-Expression zu induzieren.

Induktionsaktivität von T1A aus anderen Gehirnregionen

[0126] Die Erfinder untersuchten dann, ob die Induktionsaktivität auf Typ-1-Astrozyten aus dem Ventralmesencephalon beschränkt ist. T1A wurden aus mehreren Gehirnregionen isoliert, die Populationen von Nurr1-exprimierenden Zellen in der Entwicklung enthalten [R. H. Zetterström et al., Mol. Brain Res. 41, 111–120 (1996)]. In c42 war kein Anstieg der Anzahl von TH-immunreaktiven Zellen im Vergleich zu C17.2-Elternzellen zu beobachten, wenn sie gemeinsam mit T1A aus anderen Gehirnregionen, einschließlich Cerebrocortex, Hippocampus oder Rückenmark, kultiviert wurden ([Fig. 3](#)). Dies zeigte, dass ein vermeintlicher TH-induzierender Faktor spezifisch und selektiv durch Ventralmesencephalon-Typ-1-Astrozyten produziert wurde.

[0127] Jedoch blieben c42-Zellen von Astrozyten aus diesen Regionen nicht unbeeinflusst. Zellen dieser Linie entwickelten unterschiedliche neuronal-ähnliche Morphologien, die für diese Region einzigartig waren. Unter denselben Bedingungen tendierte jedoch die C17.2-Elternlinie dazu, ein einheitliches Gemisch aus polygonalen, bi- und tripolaren Morphologien zu zeigen. Gemeinsam lassen diese Daten vermuten, dass Astrozyten aus unterschiedlichen Gehirnregionen einzigartige, oder einzigartige Kombinationen von, Faktoren sekretieren, die mit Nurr1-exprimierenden Zellen wechselwirken, um spezifische und vielleicht regional geeignete, neuronale Phänotypen zu produzieren. Ein Nachweis wird durch Identifikation der neuronalen Phänotypen erhalten, die in den gemeinsamen Kulturen produziert werden. Es werden spezifische neuronale Marker verwendet, wie z.B. NPY, Substanz P, Ach und Insel 1. Weitere Unterstützung wird durch Transplantation

der C17.2-Zellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, intracerebro-ventrikulär in frühen Embryonalzuständen erhalten, um ihre Integration zu ermöglichen. Die neuronalen Phänotypen, die aus diesen Zellen entstammen, werden durch lacZ-Expression und Immunhistochemie gegen einen spezifischen neuronalen Marker bestimmt.

Der Mechanismus dopaminerger Induktion

[0128] Die Erfinder verglichen Nurr1-Aktivität in C17.2-Zellen kurz nach Transfektion mit Nurr1-Aktivität in etablierten C17.2-Nurr1-Klonen. Sie stellten fest, dass signifikante Nurr1-Transaktivierungsaktivität 36 Stunden nach gemeinsamer Transfektion des Nurr1-Expressionsvektors und eines auf Nurr1 reagierenden NBRE-Luciferasereporters in C17.2-Zellen detektiert wurde. Nach Transfektion des Reporters in stabile, proliferierende C17.2-Nurr1-Klone (die in Serum gezüchtet wurden) ([Fig. 5](#)) oder nach Transfektion in differenzierte Klone, die nach Passagieren in serumfreies Medium erhalten wurden, war kein signifikanter Anstieg der Nurr1-Translationsaktivität bei Grundniveau zu beobachten.

[0129] Diese Daten zeigen, dass Nurr1 während neuronaler Differenzierung von stabilen C17.2-Nurr1-Klonen nicht aktiv ist, und lassen vermuten, dass frühere vorübergehende hohe Ausmaße von Nurr1-Aktivität den Nurr1-Klonen langandauernde Kompetenz verliehen, dopaminerg zu sein.

Veränderungen der Genexpression in Nurr1-Klonen

[0130] Die Erfinder untersuchten Veränderungen der Genexpression in Nurr1-Klonen. GFR-α1- und GFR-α2-mRNA-Ausmaße in Schein- und Nurr1-Klonen wurden unter Verwendung von RNase-Schutztests untersucht (GDNF-Familienrezeptor-α1; wobei GDNF sich auf von Glia-Zelllinien abstammenden neurotrophischen Faktor bezieht). C17.2 und alle untersuchten Scheinklone exprimierten hohe Ausmaße von GFR-α1-mRNA und sehr geringe Ausmaße des verwendeten Rezeptors GFR-α2. Hingegen zeigten alle Nurr1-Klone das umgekehrte Profil, d.h. sehr geringe GFR-α1- und sehr hohe GFR-α2-mRNA-Ausmaße, was vermuten ließ, dass Nurr1 den TH+-Phänotyp in C17.2-Zellen nicht direkt induziert, aber eher indirekt wirkt, indem stabile Hinauf- und Herabregulierung der relevanten Proteine produziert wird. Auf diese Weise verleiht Nurr1 multipotenten Zellen die Kompetenz, auf spezifische Faktoren zu reagieren, einschließlich jene, die von Ventralmesencephalonastrozyten herrühren.

[0131] Die Wirkungen von Nurr1-Aktivität auf das Muster der Genexpression werden durch Analyse der Expression von Genen, die für die Beschreibung von Mittelhirnneuronen und Ventralphänotypen wichtig sind (z.B. Shh, Patch, Smo, Gli-Gene, Hes, FGF8,

Ptx3, Pax-Gene, Engrailed 1 und 2), und Genen, die für Neurogenese und Differenzierung wichtig sind (z.B. Noggin, Chordin, Follistatin, Mash1, Math1, NeuroD, Neurogenin 1–3, Notch 1–3, Delta, Serratal und Myt1), weiter untersucht.

Der dopaminerge Phänotyp

[0132] Der Anstieg der TH-Expression repräsentierte die Annahme eines legitimen dopaminergen Phänotyps innerhalb der Nurr1-C17.2-c42-Linie. Üblicherweise ist die Fähigkeit, Dopamin als Reaktion auf Membrandepolarisierung freizusetzen, das Hauptkriterium für die Bezeichnung eines neurochemischen Phänotyps als dopaminerg. Gemeinsame Kulturen von Eltern- oder c42-Linien und VM-Astrozyten wurden daher aktiv mit 50 mM KCl behandelt und die Überstände auf Monoamingehalt mit HPLC getestet. Eine signifikante Freisetzung von Dopamin und seinem Metaboliten DOPAC wurde in gemeinsamen Kulturen detektiert, die c42 enthielten, mit einer erhöhten Freisetzung, die in gemeinsamen Kulturen detektiert wurde, die mit Faktoren behandelt wurden, die dopaminerge Differenzierung verstärkten, z.B. SR11237 und bFGF, wodurch eine Korrelation der Dopaminfreisetzung mit der Anzahl von TH-exprimierenden Zellen erfolgte (Fig. 4). Es war keine Dopaminfreisetzung in der Elternlinie zu beobachten. Daher können TH-exprimierende Nurr1-C17.2-c42-Zellen als echt dopaminerg angesehen werden.

[0133] Die TH-exprimierende Nurr1-C17.2-c42-Linie war von einer dopaminergen Ventralmesenzephalon-Art. Nurr1-C17-c42-Zellen in gemeinsamer Kultur erwarben Immunreaktivität für Aldehyddehydrogenase-2 (AHD-2, Fig. 4), ein Enzym, das selektiv in sich entwickelnden dopaminergen Vorläufern innerhalb des Ventralmesenzephalons exprimiert wurde [P. McCaffery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 7772–7776 (1994)]. Diese exprimierten auch c-ret-mRNA, den Signalgebungsrezeptor für GDNF [M. Trupp et al., Nature 381, 785–789 (1996); S. Q. Jing et al., Cell 85, 1113–1124 (1996)], der in dopaminergen Neuronen vorliegt [M. Trupp et al., Nature 381, 785–789 (1996)]. Weiters zeigten TH-positive c42-Zellen ähnliche Reaktionen auf Faktoren mit bekannten neurotrophen Wirkungen auf dopaminerge Vorläufer [L. Studer et al., Nature Neurosci. 1, 290–295 (1998)] und primäre dopaminerge Ventralmesenzephalon-Neuronen in vitro [C. Hyman et al., J. Neurosci., 14, 335–347 (1994); L. H. Lin et al., Science 260, 1130–1173 (1993)] (Fig. 4). Gemeinsame Kulturen wurden zuerst mit SR11237 und bFGF behandelt, um einen dopaminergen Phänotyp zu induzieren, nachdem das Medium mit oder ohne verschiedene Wachstumsfaktoren auf N2 geändert wurde. Bei 9 DIV erhöhten bFGF und Neurotrophin-3 (NT-3 30 ng/ml) die Anzahl von TH+-Zellen in der Kultur dramatisch, verglichen mit der N2-Kontrollbedingung; der gehirnabstammende neurotrope Fak-

tor (GDNF, 30 ng/ml), der Ziliar-Neurotroph-Faktor (CNTF, 10 ng/ml) und der von Gliazelllinie abstammende neurotrope Faktor (GDNF, 10 ng/ml) induzierte Neuritogenese und/oder Hypertrophie auf Nurr1-c42-abstammenden dopaminergen Neuronen. Daher verlief das Verhalten von TH-exprimierenden c42-Zellen parallel zu jenen der endogenen Neuronen der Substantia nigra, sodass die Zellen ventralmesenzephalonähnliche dopaminerge Neuronen sind.

Stabilität von induzierten dopaminergen Neuronen

[0134] Die Erfinder beurteilen die langfristige Stabilität des induzierten dopaminergen Phänotyps in vitro und in vivo, insbesondere nach Entfernung von astrozytabstammenden Induktionsfaktoren. c42-Zellen wurden gemeinsam mit VM-Typ-1-Astrozyten 8 Tage lang in Inserts kultiviert, aus den Inserts entfernt und 14 Tage lang erneut in definiertem N2-Medium ohne zusätzliche Faktoren ausplattiert. Obwohl ein gewisser zellulärer Abrieb in den zwei Wochen nach Entfernung aus der gemeinsamen Kultur zu beobachten war, zeigte eine signifikante Anzahl an Zellen einen höchst reifen dopaminergen Phänotyp, einschließlich langer ausführender Verfahren, hypertrophischer Zellkörper und intensiver Ausmaße von TH-Immunreaktivität.

[0135] c42-Zellen aus parallelen gemeinsamen Kulturen wurden auch chirurgisch in ein erwachsenes Mauscorpus-Striatum injiziert und 12 Tage lang reifen gelassen, in Abwesenheit beliebiger zusätzlicher tropischer Faktoren oder unterstützender Zellen (d.h. Astrozyten, Oligodendrozyten oder anderer Neuronen). Obwohl Zellen in diesem Zustand verloren gingen, zeigte eine kleine, aber signifikante Zahl an c42-abstammenden dopaminergen Zellen ein hohes Ausmaß an Differenzierung und offensichtliche Integration in das Wirtsgewebe. Es wurden in keinem der langfristigen In-vitro- oder In-vivo-Versuche TH+-Zellen aus der c17.2-Elternlinie festgestellt.

[0136] Daher zeigt die Beobachtung, dass einige c42-Zellen TH-Expression nach Entfernung aus Typ-1-abstammenden Faktoren aufrechterhielten oder sogar verstärkten, nach dopaminergem Induktion, dass ihr Phänotyp stabil ist. Da nur eine begrenzte Anzahl an überlebenden TH+-Zellen detektiert werden konnte, sind exogen angewendete tropische Faktoren oder unterstützende Zellen für langfristiges Überleben erforderlich.

Behandlung von neurodegenerativer Erkrankung

[0137] Ein Nachweis der Fähigkeit von c17.2-abstammenden Neuronen, eine neurodegenerative Erkrankung zu behandeln, wird unter Verwendung eines In-vivo-Modells von Parkinson-Erkrankung erhalten. Die falschen Neurotransmitter 6-Hydroxydopa-

min (6-OHDA) oder MPTP werden spezifisch von Neuronen aufgenommen und führen zu oxidativem Stress und Verlust von dopaminergen und noradrenergen Neuronen.

[0138] Nurr1-c17.2-Zellen, die in dopaminerge Neuronen in vitro differenziert worden sind, werden chirurgisch entweder in die Substantia nigra oder das Striatum von mit 6-OHDA behandelten Mäusen implantiert. Die Fähigkeit dieser Zellen, sich zu integrieren und völlig zu differenzieren, wird morphologisch durch β -gal-Färbung, TH-Immunhistochemie und In-situ-Hybridisierung für Dopaminreporter und Dopaminrezeptoren evaluiert.

[0139] Die Fähigkeit von nicht-differenzierten Nurr1-c17.2-Zellen, sich spontan in vivo gegen den dopaminergen Phänotyp zu differenzieren, wird durch intrastriale oder intranigrale Transplantation solcher Zellen in 6-OHDA-behandelte Tiere beurteilt. Der dopaminerge Phänotyp wird wie oben beschrieben detektiert.

[0140] Die Fähigkeit von Nurr1-c17.2-Zellen, die in das Striatum oder die Substantia nigra transplantiert wurden, motorische Asymmetrien zu retten, die durch einseitige 6-OHDA-Behandlung induziert wurden, wird durch eine Beurteilung des Kreisverhaltens in Apomorphin- und Amphetamintests nachgewiesen [R. K. Schwartin et al., Progress in Neurobiology 50 (2-3), 275-331 (1996)].

ZUSAMMENFASSUNG

[0141] Zusammenfassend zeigen die hierin präsentierten Ergebnisse, dass die Expression von Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen ein neuronales Schicksal induziert. Weiters setzen Typ-1-Astrozyten aus dem Ventralmesenzephalon, aber nicht aus anderen Gehirnregionen einen oder mehrere lösliche Faktoren frei, die neurale Stamm- oder Vorläuferzellen induzieren, die ursprünglich aus einer nicht-dopaminergen Gehirnregion erhalten wurden, und Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, um sich in dopaminerge Neuronen des Ventralmesenzephalons zu entwickeln. Daher können dopaminerge Neuronen aus neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen durch ein Verfahren erzeugt werden, das die Expression von Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau in den Zellen und das Kontaktieren der Zellen mit einem oder mehreren Faktoren umfasst, die von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons bereitgestellt werden oder davon abstammen. Weiters lassen die Ergebnisse vermuten, dass primäre Astrozyten die Quelle der Signale sein können, die für die Induktion von regional geeigneten neuronalen Phänotypen in mehreren Gehirnstrukturen erforderlich sind.

[0142] Die hierin beschriebenen Verfahren, welche die mehreren möglichen Leistungsfähigkeiten von neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen, Selektorgenen, wie z.B. Nurr1, und primären Astrozyten nutzen, stellen die Produktion von Neuronen eines gewünschten neurochemischen Phänotyps als Quellenmaterial für neuronale Transplantation in der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen bereit. Die Induktion von dopaminergen Mittelhirnneuronen kann in einer Zellersatzstrategie verwendet werden, um Parkinson-Erkrankung zu behandeln.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von dopaminergen Neuronen durch das Induzieren eines dopaminergen neuronalen Schicksals in einer neuronalen Stammzelle oder neuronalen Vorläuferzelle, wobei das Verfahren Folgendes umfasst:

Expimieren von Nurr1 in einem größeren Ausmaß als das Grundniveau in der Zelle und Kontaktieren der Zelle mit einem oder mehreren Faktoren, die von einem Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons erhältlich sind, wodurch dopaminerge Neuronen hergestellt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend das Kontaktieren der Zelle mit FGF8.

3. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend die Transformation einer neuronalen Stammzelle oder einer neuronalen Vorläuferzelle mit Nurr1.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, umfassend die gemeinsame Kultivierung der neuronalen Stammzelle oder neuronalen Vorläuferzelle mit einem Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei der Typ-1-Astrozyt sich unbegrenzt vermehrt oder von einer Astrozytenzelllinie stammt.

6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei es sich bei der Zelle um eine mitotische Zelle handelt, wenn sie mit einem oder mehreren Faktoren kontaktiert wird.

7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Zelle zusätzlich mit einem oder mehreren Mitteln kontaktiert wird, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die Folgendes umfasst: basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), einen Aktivator des Retinoid-X-Rezeptors (RXR) und 9-cis-Retinol.

8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Zelle zusätzlich mit einem Element der FGF-Familie der Wachstumsfaktoren kontaktiert wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Zelle mit bFGF oder EGF und SR11237 kontaktiert wird.

10. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die neurale Stammzelle oder neurale Vorläuferzelle mit bFGF und/oder EGF vor dem Kontaktieren der Zelle mit einem oder mehreren Faktoren, die aus einem Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons erhältlich sind, vorbehandelt wird.

11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, das weiters die Formulierung des dopaminergen Neurons in einer Zusammensetzung umfasst, die eine oder mehrere zusätzliche Komponenten umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Zusammensetzung einen pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten umfasst.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, das weiters die Verwendung der dopaminergen Neuronen zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung eines Individuums umfasst.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Medikament zur Implantation in das Gehirn des Individuums vorgesehen ist.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Individuum an der Parkinson-Krankheit leidet.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, das weiters folgende Schritte umfasst:

- (i) Behandlung eines dopaminergen Neurons mit einem Toxin für das dopaminerge Neuron;
- (ii) Trennen des dopaminergen Neurons von dem Toxin;
- (iii) Kontaktieren des behandelten dopaminergen Neurons mit einem Testmittel oder Testmitteln;
- (iv) Bestimmung der Fähigkeit des dopaminergen Neurons, sich von dem Toxin zu erholen;
- (v) Vergleich der Fähigkeit des dopaminergen Neurons, sich von dem Toxin zu erholen, mit der Fähigkeit eines dopaminergen Neurons, sich ohne Kontakt mit dem Testmittel/den Testmitteln von dem Toxin zu erholen.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, das weiters folgende Schritte umfasst:

- (i) Behandlung eines dopaminergen Neurons mit einem Toxin für das dopaminerge Neuron in Gegenwart eines Testmittels oder von Testmitteln;
- (ii) Bestimmung der Fähigkeit des dopaminergen Neurons, das Toxin zu tolerieren;
- (iii) Vergleich der Fähigkeit des dopaminergen Neurons, das Toxin zu tolerieren, mit der Fähigkeit eines dopaminergen Neurons, das Toxin ohne Kontakt mit dem Testmittel/den Testmitteln zu tolerieren.

18. Screening-Verfahren für einen Rezeptor oder Rezeptoren für den Faktor oder die Faktoren, die von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons erhältlich sind und ein dopaminerges Schicksal in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, induzieren, wobei das Verfahren den Vergleich von neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau in den neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen exprimieren oder nicht exprimieren, zur Identifizierung des Rezeptors oder der Rezeptoren umfasst.

19. Screening-Verfahren für einen Faktor oder Faktoren, die, entweder einzeln oder in Kombination, ein dopaminerges Schicksal in einer neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, induzieren, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- (a) Kontaktieren von Typ-1-Astrozytenmolekülen mit einer neuronalen Stammzelle oder neuronalen Vorläuferzelle, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, wobei der Kontakt eine Wechselwirkung zwischen den Typ-1-Astrozytenmolekülen und der neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle hervorrufen kann; und
- (b) Bestimmung der Wechselwirkung zwischen den Typ-1-Astrozytenmolekülen und der neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle.

20. Verfahren nach Anspruch 19, das den Vergleich der Typ-1-Astrozytenmoleküle des Ventralmesenzephalons mit den Molekülen der neuronalen Zellen umfasst, die nicht in der Lage sind, ein dopaminerges Schicksal in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen zu induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren.

21. Screening-Verfahren für einen Faktor oder Faktoren, die, entweder einzeln oder in Kombination, ein dopaminerges Schicksal in einer neuronalen Stamm- oder Vorläuferzelle induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, wobei das Verfahren das Kultivieren einer neuronalen Stammzelle oder neuronalen Vorläuferzelle, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimiert, in Gegenwart eines Typ-1-Astrozytenmoleküls und die Analyse der Zelle in Bezug auf die Differenzierung zu einem dopaminergen Phänotyp umfasst.

22. Verfahren nach Anspruch 21, das den Vergleich von Typ-1-Astrozyten des Ventralmesenzephalons mit neuronalen Zellen umfasst, die nicht in der Lage sind, ein dopaminerges Schicksal in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen zu induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren.

23. Verfahren nach Anspruch 21, das ein differentielles Expressions-Screening umfasst.

24. Screening-Verfahren für eine Substanz, die die Fähigkeit von Typ-1-Astrozyten des Ventral-mesenzephalons oder eines Moleküls oder von Molekülen der Astrozyten moduliert, ein dopaminerges Schicksal in neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen zu induzieren, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, wobei das Verfahren folgende Schritte umfasst:

- (i) gemeinsames Kultivieren von Typ-1-Astrozyten mit neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, in Gegenwart einer oder mehrerer Testsubstanzen; oder
- (ii) Kontaktieren von neuronalen Stamm- oder Vorläuferzellen, die Nurr1 in einem Ausmaß über dem Grundniveau exprimieren, mit einem oder mehreren Molekülen von Typ-1-Astrozyten, die in der Lage sind, einen dopaminergen Phänotyp in diesen Zellen zu induzieren, wobei der Kontakt in Gegenwart einer oder mehrerer Testsubstanzen erfolgt; und
- (iii) Analyse des Anteils der Stamm- oder Vorläuferzellen, die ein dopaminerges Schicksal annehmen;
- (iv) Vergleich des Anteils der Stamm- oder Vorläuferzellen, die ein dopaminerges Schicksal annehmen, mit der Anzahl der Stamm- oder Vorläuferzellen, die in einem vergleichbaren Reaktionsmedium und unter vergleichbaren Bedingungen in Abwesenheit der Testsubstanz(en) ein dopaminerges Schicksal annehmen.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

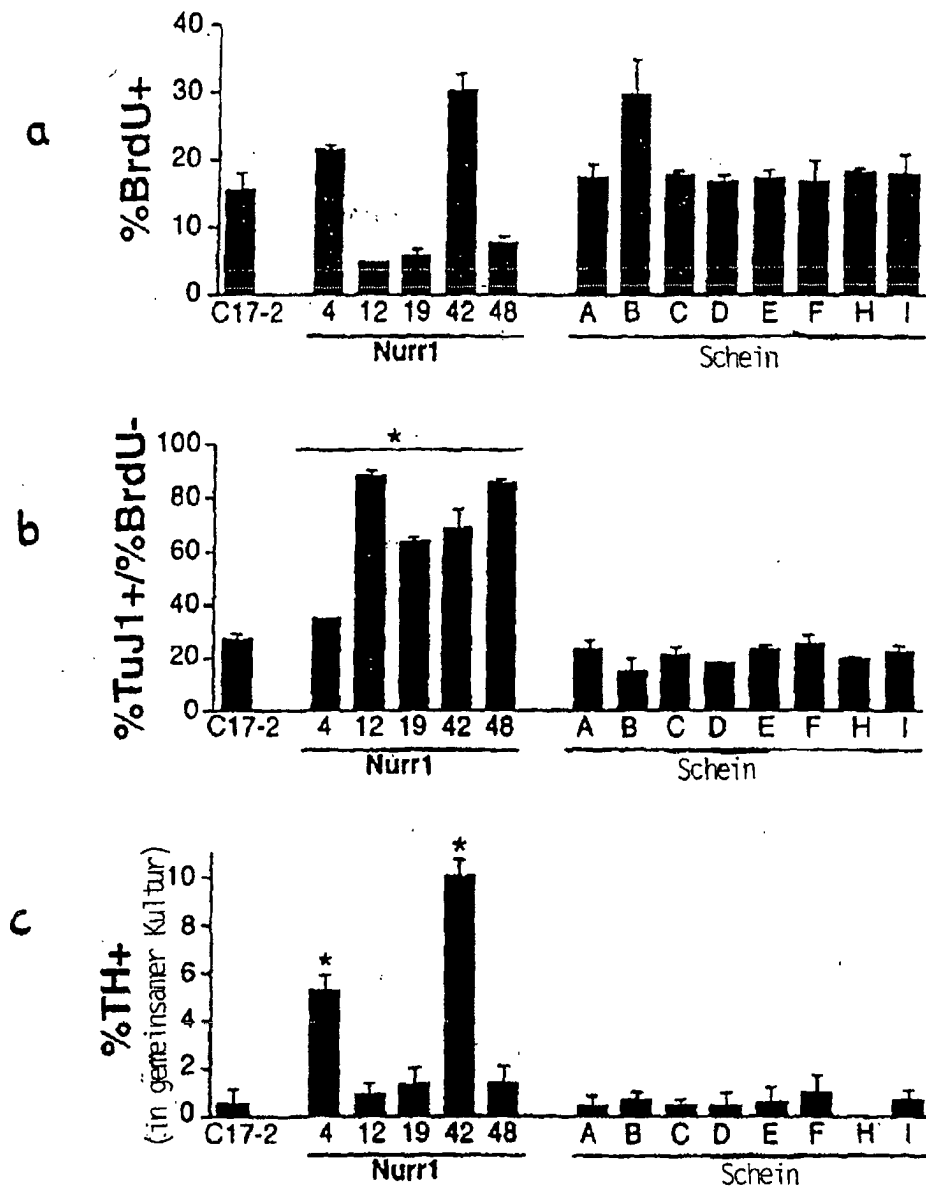
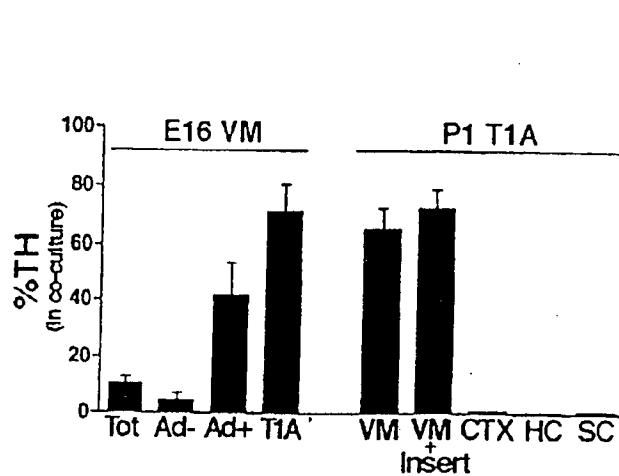
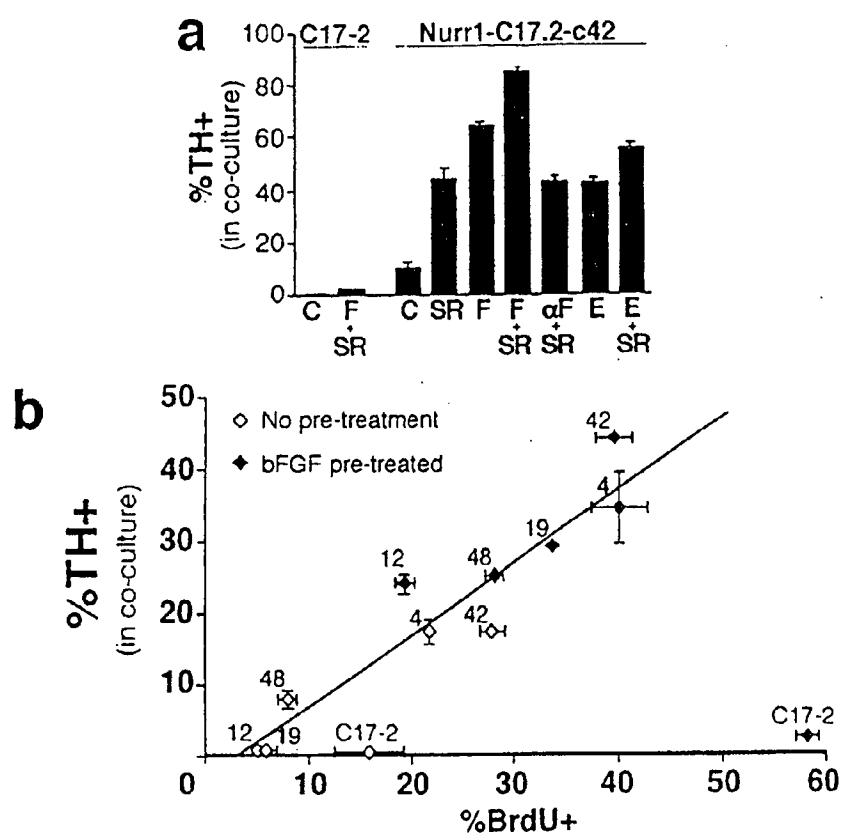
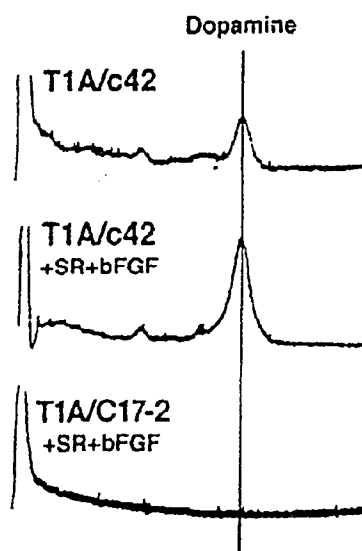
Fig. 1

Fig. 2FIG. 3FIG. 4

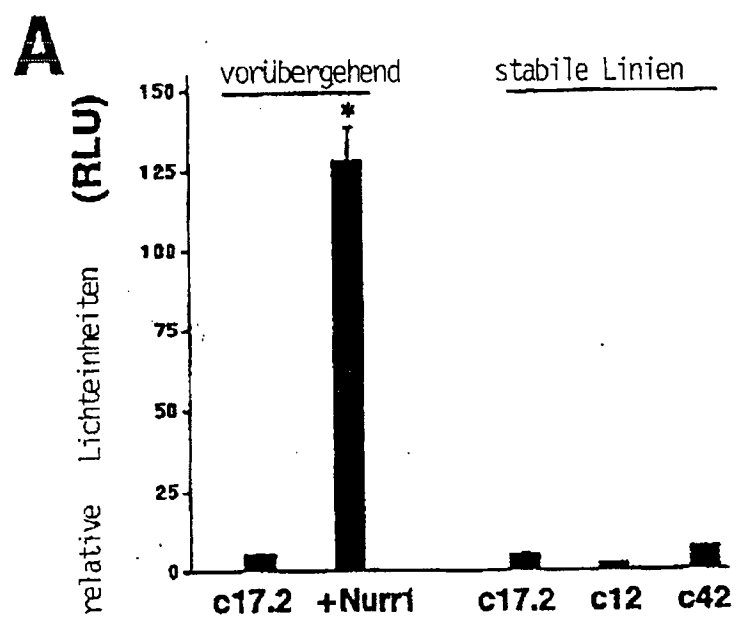


Fig. 5