



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 61 444 A1** 2005.07.21

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 61 444.3**

(22) Anmeldetag: **23.12.2003**

(43) Offenlegungstag: **21.07.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 5/08**
C12N 5/06, C12Q 1/02

(71) Anmelder:
AXARON Bioscience AG, 69120 Heidelberg, DE

(74) Vertreter:
**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, 68165 Mannheim**

(72) Erfinder:
**Maurer, Martin H., Dr., 69121 Heidelberg, DE;
Feldmann jun., Robert E., Dipl.-Phys., 65193
Wiesbaden, DE; Kuschinsky, Wolfgang, Prof. Dr.,
69118 Heidelberg, DE; Schneider, Armin, Dr.,
69118 Heidelberg, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu
ziehende Druckschriften:

US 62 94 346 B1

WO 02/1 02 988 A2

WO 02/09 699 A2

WO 01/83 543 A1

WO 01/44 206 A1

WO 01/36 644 A2

BRÄNNVALL, Karin, et al.:

**Estrogen-Receptor-Dependent Regulation of
Neural**

**Stern Cell Proliferation and Differentiation. In:
Molecular and Cellular Neuroscience
21, 2002, S. 512-520;;**

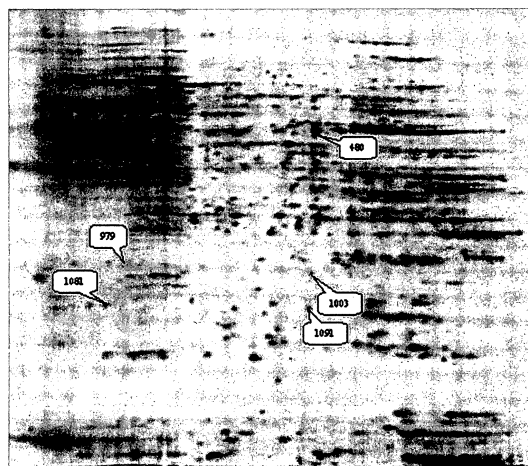
**SEN, Malini, CARSON, Dennis A.: Wnt signaling in
rheumatoid synovio- cyte activation. In:
Med. Rheumatol, 2002, S. 5-9;;**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen oder von neuronalen Stammzellen
abgeleiteter Zellen**

(57) Zusammenfassung: Das Verfahren zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stammzellen umfasst das Inkontaktbringen der Zellen mit einer Substanz, die eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibiert, und das Kultivieren dieser Zellen unter Bedingungen, die eine Vermehrung und/oder Differenzierung der Zellen ermöglichen. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens differenzieren die neuronalen Stammzellen zu gehirnzellen-ähnlichen Zellen.



Beschreibung

[0001] Adulte neuronale Stammzellen wurden bereits aus verschiedenen Regionen des Gehirns isoliert (zur Übersicht siehe (Gage FH, 2000, Science, 287, 1433–1438; Ostenfeld T and Svendsen CN, 2003, Adv Tech Stand Neurosurg, 28, 3–89)), unter anderem auch dem Hippocampus des Säugergehirns (Eriksson PS et al., 1998, Nat Med, 4, 1313–1317; Gage FH et al., 1995, Proc Natl Acad Sci USA, 92, 11879–11883; Johansson CB et al., 1999, Exp Cell Res, 253, 733–736). Diese Zellen besitzen, im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen, nicht mehr das Potenzial, zu allen Zelltypen des Körpers zu differenzieren (Totipotenz); sie können jedoch zu den verschiedenen im Gehirn vorkommenden Zelltypen differenzieren (Pluripotenz). Dabei erfahren sie wesentliche morphologische und funktionelle Veränderungen (van Praag H et al., 2002, Nature, 415, 1030–1034).

[0002] Durch die Verwendung von neuronalen Stammzellen können ethische Probleme, wie sie bei der Verwendung von embryonalen Stammzellen in der Medizin bzw. der Biotechnologie auftreten, umgangen werden (Heinemann T and Honnefelder L, 2002, Bioethics, 16, 530–543).

[0003] Andere Methoden der Differenzierung und selektiven Anreicherung neuronaler Zellen enthalten kompliziertere Differenzierungsprotokolle (Björklund A and Lindvall O, 2000, Nat Neurosci, 3, 537–544; Björklund A and Lindvall O, 2000, Nature, 405, 892–893, 895.; Cameron HA et al., 1998, J Neurobiol, 36, 287–306.; McKay R, 2000, Nature, 406, 361–364.). So müssen z.B. beim Fluorescence-Aided Cell Sorting (FACS) die Zellen spezifische Marker exprimieren, damit sie mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert und dann von den unmarkierten Zellen beim Durchlaufen einer Glaskapillare getrennt werden können. Auch können die Zellen durch diese Art der Durchflußzytometrie Schaden nehmen.

[0004] Auch führen andere selektiven Zellkulturmedien zu einer geringen Ausbeute an differenzierten Neuronen (Wachs FP, Couillard-Despres S, Engelhardt M, Wilhelm D, Ploetz S, Vroemen M, Kaesbauer J, Uyanik G, Klucken J, Karl C, Tebbing J, Svendsen C, Weidner N, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L, High efficacy of clonal growth and expansion of adult neural stem cells. Lab Invest. 2003, 83: 949–62. Das Differenzierungsmonitoring ist ebenfalls oftmals schwierig.

[0005] Die bisher beschriebenen Methoden zur Stammzelldifferenzierung, bzw. zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stammzellen oder von diesen abgeleiteten Zellen, weisen somit mindestens einen oder mehrere der folgenden Nachteile auf:

- die Verfahren sind nicht hochdurchsatz-fähig
- die Verwendung embryonaler Stammzellen bringt große ethische Probleme mit sich
- die Differenzierungsprotokolle sind kompliziert
- die Ausbeute an differenzierten Zellen ist gering
- das Monitoring der Differenzierung ist schwierig

[0006] Aufgabe der Erfindung ist es, die wesentlichen Nachteile der bekannten Verfahren zu beseitigen oder zumindest zu minimieren.

[0007] Eine Lösung der gestellten Aufgabe ist das Verfahren zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen, umfassend a) das in Kontakt bringen der Zellen mit einer Substanz, die eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibiert und b) das Kultivieren dieser Zellen unter Bedingungen, die eine Vermehrung und/oder Differenzierung der Zellen ermöglichen.

[0008] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens differenzieren die neuronalen Stammzellen, bzw. die von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen.

[0009] Einen wichtigen Signalweg für die Entwicklung und Differenzierung von Zellen stellt der Wnt-Signalweg dar (Gerhart J, 1999, Teratology, 60, 226–239.; Peifer M and Polakis P, 2000, Science, 287, 1606–1609, siehe auch [Abb. 6](#)). Er ist in der Ontogenese und Embryogenese u. a. für die posteriore Verlagerung der Neuralplatte und die Mittelhirn- und Kleinhirnentwicklung zuständig (Sokol SY, 1999, Curr Opin Genet Dev, 9, 405–410). Außerdem spielt Wnt eine wichtige Rolle in der Spezifizierung neuronaler Zelltypen (Interneurone)(Muroyama Y et al., 2002, Genes Dev, 16, 548–553) und agiert als Faktor für die Selbsterneuerung von Stammzellen (Katoh M, 2002, Int J Mol Med, 10, 683–687.; Song X and Xie T, 2002, Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 14813–14818.). In embryonalen Stammzellen führt die Inhibition des Wnt-Signalweges zur neuronalen Differenzierung dieser Zellen (Aubert J et al., 2002, Nat Biotechnol, 20, 1240–1245.). In hämatopoetischen

Stammzellen ist der Wnt-Signalweg zur Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung und Proliferation beschrieben (Reya T et al., 2003, Nature, 423, 409–414.; Lako M et al., 2001, Mech Dev, 103, 49–59.; Willert K et al., 2003, Nature, 423, 448–452.) Über Effekte der Wnt-Wirkung in Stammzellen, die aus dem adulten Gehirn isoliert werden, liegen bislang aber keine Erkenntnisse vor.

[0010] Der Wnt-Signalweg umfasst komplex regulierte Signalketten (Gerhart J, 1999, Teratology, 60, 226–239.). Durch Bindung eines Wnt-Signalmoleküls an den spezifischen Rezeptor kommt es zu einer Inhibition des Signalvermittlers Dsh (Dishevelled), das wiederum die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK-3)(Woodgett JR, 2001, Sci STKE, 2001, RE12) inhibiert. Diese phosphoryliert in Interaktion mit Axin und APC (Adenomatöses Polyposis Coli Protein) (Kielman MF et al., 2002, Nat Genet, 32, 594–605) den Transkriptionsfaktor beta-Catenin, das in unphosphoryliertem Zustand über den Transkriptionsfaktor Tcf/Lef1 die Transkription im Zellkern beeinflussen kann. Phosphoryliertes beta-Catenin dagegen wird ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut.

[0011] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Inhibition einer Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges durch eine Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase-3. Dies kann durch den Inhibitor Genistein geschehen.

[0012] Optional kann eine Konzentrationsbestimmung von β -Catenin, einem Protein des Wnt-Signaltransduktionsweges, und (im phosphorylierten Zustand) Produkt der Glykogen-Synthase-Kinase-3, erfolgen. Die Konzentration kann dann mit der entsprechenden Konzentration des Proteins in einer unbehandelten Vergleichszelle verglichen werden.

[0013] Weitere Ausführungsformen der Erfindung betreffen Zellen, erhältlich nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren, einen neurologischen Gewebeersatz, der diese Zellen aufweist, sowie pharmazeutische Mittel (Medikamente), welche diese Zellen enthalten.

[0014] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung Screeningverfahren zur Identifizierung von Substanzen, die den Wnt-Signaltransduktionsweg hemmen und so zur Differenzierung von neuronalen Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen geeignet sind, sowie Medikamente, die diese Substanzen enthalten.

[0015] Alle erfindungsgemäßen Medikamente können zur Behandlung einer Vielzahl von Erkrankungen verwendet werden, welche durch die Modulation der Aktivität oder Menge eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionsweges positiv beeinflusst werden können. Vor allem zählen zu diesen Krankheiten Erkrankungen, bei denen, direkt oder indirekt, Gehirnzellen absterben.

[0016] Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von neuronalen Stammzellen, welche entweder ein Protein exprimieren, das eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges inhibieren kann, oder welche ein Protein dieses Stoffwechselweges nicht, inaktiv oder vermindert exprimieren, zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen.

[0017] Weiterhin betrifft die Erfindung Kits zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen.

[0018] Der Begriff „Differenzierung“ bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung den, im Vergleich mit der Ausgangszelle, zunehmenden Erwerb oder Besitz von einer oder mehreren Charakteristika oder Funktionen.

[0019] Der Ausdruck „Stammzelle“ charakterisiert eine Zelle, die proliferiert, sich selbst erneuert und die Fähigkeit zur Differenzierung beibehält. Umfasst sind hierbei auch Progenitorzellen. Der Begriff "neuronale Stammzelle" wird für eine aus dem Zentralnervensystem isolierte Zelle verwendet, die zu Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung unter Hervorbringung von Gehirnzellphänotypen fähig ist. Eine „von neuronalen Stammzellen abgeleitete Zelle“ ist dann eine gehirnzellenähnliche Zelle, die trotzdem noch das Potential zur Differenzierung besitzt, und aus einer (hypothetischen) neuronalen Stammzelle hervorgegangen ist.

[0020] Die neuronalen Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen sind dabei bevorzugt Säugerzellen, wobei der Begriff auch Affen, Schweine, Schafe, Ratten, Mäuse, Kühe, Hunde etc. umfasst. Bevorzugt ist das Säugetier ein Mensch. Die verwendeten Zellen können frisch oder zuvor gefroren worden sein, bzw. einen früheren Kultur entstammen.

[0021] Die Zellen werden in einem geeigneten Medium kultiviert. Diverse Medien sind kommerziell erhältlich, einschließlich Neurobasal-Medium, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Ex vivo Serum freies Medium, Iscove's Medium, etc.. Geeignete Antibiotika (z.B. Penicillin und Streptomycin) zur Verhinderung von bakteriellem Wachstum bzw. andere Zusätze wie Heparin, Glutamin, B27, EGF, FGF2 oder fetales Kälberserum können hinzugefügt werden.

[0022] Nach dem Animpfen des Mediums werden die Kulturen unter Standardbedingungen, meist bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Frisches Medium kann in geeigneter Weise zugeführt werden, zum Teil durch Entfernen eines Teils des Mediums und Ersatz durch frisches Medium. Verschiedenste handelsübliche Systeme wurden zur Beseitigung von nachteiligen Stoffwechselprodukten bei der Kultivierung von Säugerzellen entwickelt. Durch Einsatz dieser Systeme kann das Medium als kontinuierliches Medium aufrechterhalten werden, so dass die Konzentration diverser Inhaltsstoffe relativ konstant oder innerhalb eines vorgegebenen Bereichs bleibt.

[0023] Der Wnt-Signaltransduktionsweg ist dem Fachmann bekannt (Gerhart J, 1999, Teratology, 60, 226–239.; Peifer M and Polakis P, 2000, Science, 287, 1606–1609, siehe auch [Fig. 6](#)). Weitere Reaktionsschritte des Wnt-Signaltransduktionsweges, weitere den Signaltransduktionsweg beeinflussende Rezeptoren bzw. neue, an den bereits bekannten Reaktionsschritten beteiligte Proteine sind ebenfalls als Bestandteil des Wnt-Signaltransduktionsweges im Sinne dieser Erfindung anzusehen.

[0024] „Inhibieren“ oder „Inhibition“ ist im Zusammenhang mit der Modulation einer Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges weit auszulegen, und umfasst die teilweise, im Wesentlichen vollständige oder vollständige, auf unterschiedlichste zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung einer Reaktion des Signaltransduktionsweges. Dabei ist mit statistischer Wahrscheinlichkeit ein signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Reaktion einer unbehandelten Vergleichszelle erkennbar.

[0025] Dem Fachmann sind verschiedenste Strategien geläufig, um die genannten Reaktionen in gewünschter Weise zu beeinflussen. Eine erfindungsgemäß bevorzugte Strategie besteht in der Verwendung einer Substanz, welche ein Protein des Wnt-Signaltransduktionsweges selber inhibiert oder gezielt eine wesentliche Eigenschaft desselben vermindert. Entsprechende Substanzen sind dem Fachmann bekannt, beispielsweise Substrat-Analoga, welche mit dem ursprünglichen Substrat konkurrieren, aber nur geringfügig bzw. nicht umgesetzt werden und so dass jeweilige Enzym blockieren. Weiterhin könnte es sich bei einer solchen Substanz auch um einen Antikörper handeln. Eine andere erfindungsgemäße Vorgehensweise umfasst die Verwendung einer „antisense“-Nukleinsäure, welche ganz oder teilweise zu zumindest einem Teil eines „sense“-Stranges einer für ein Protein des Wnt-Signaltransduktionsweges codierenden Nukleinsäure komplementär ist. Die Herstellung derartiger „antisense“-Nukleinsäuren auf biologische oder enzymatisch/chemische Weise ist dem Fachmann geläufig. In einer weiteren Ausführungsform kann eine entsprechende Inhibition auch über eine Beeinflussung von regulativen Elementen, z.B. durch spezifische DNA-bindende Faktoren, erfolgen, welche die Expression des Zielgens modulieren. Regulative Elemente sind beispielsweise Promotoren, Enhancer, „locus control regions“, Silencer oder jeweils Teile davon. Bevorzugt kann auch durch „RNA interference“ (RNAi) mittels doppelsträngiger RNA eine Regulierung hervorgerufen werden.

[0026] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens differenzieren die neuronalen Stammzellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen. „Gehirnzellenähnliche Zellen“ sind dabei dadurch charakterisiert, dass sie wesentliche morphologische bzw. funktionale Merkmale von Gehirnzellen aufweisen. Eine solche Zelle exprimiert bestimmte Markerproteine, beispielsweise exprimiert eine neuronähnliche Zelle mindestens eines der Markerproteine β_3 -Tubulin, MAP2a oder MAP2b. Eine astrocytenähnliche Zelle exprimiert GFAP, während eine oligodendrocytäre Zelle OCT und/oder O4 exprimiert. Weiterhin weist eine gehirnzellenähnliche Zelle eine typische Form auf und ähnelt in ihrer Morphologie dabei einer Gehirnzelle, z.B. durch die typischen Fortsätze. Neuronenähnliche Zellen können außerdem Aktionspotentiale bilden und besitzen ein Membranpotential.

[0027] Die Erfindung betrifft außerdem eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, bei der gegebenenfalls als weiterer Schritt eine Bestimmung der Konzentration eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionsweges erfolgt. Dazu wird die Menge des Proteins quantifiziert und mit der Menge desselben Proteins in einer unbehandelten Vergleichszelle, bei der keine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges inhibiert wurde, verglichen.

[0028] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei dem Protein, dessen Konzentration bestimmt wird, um β -Catenin. β -Catenin wird im Zuge des Wnt-Signaltransdukt-

weges phosphoryliert, phosphoryliertes β -Catenin wird ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut. Die Anwesenheit einer größeren Menge des Proteins (verglichen mit einer unbehandelten Vergleichsprobe) zeigt also eine Inhibierung des Wnt-Signaltransduktionsweges an.

[0029] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bestimmung der Protein-, insbesondere der β -Catenin-Konzentration durch einen Antikörper. Ein β -Cateninspezifischer Antikörper ist kommerziell erhältlich (Chemicon International, Temecula, USA).

[0030] Der Begriff „Antikörper“ wird im Bezug auf diese Erfindung im weitesten Sinne verstanden, und schließt monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, humane oder humanisierte Antikörper, rekombinante Antikörper, single chain Antikörper, synthetische Antikörper sowie Antikörperfragmente (z. B. Fab, F(ab)₂ und F_v) ein, solange sie die gewünschte biologische Aktivität aufweisen. Die Antikörper oder Fragmente können allein oder in Mischungen verwendet werden. Die Herstellung dieser Antikörper ist dem Fachmann geläufig. Zum Zwecke der Detektion wird ein solcher Antikörper bevorzugt mit einer detektierbaren Verbindung markiert sein.

[0031] Bevorzugt erfolgt die Inhibierung der Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs durch eine Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3.

[0032] Inhibierung bedeutet auch in diesem Zusammenhang eine teilweise, im Wesentlichen vollständige oder vollständige, auf unterschiedlichste zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung einer Reaktion des Signaltransduktionsweges, und ist weit auszulegen.

[0033] Ein(er) oder mehrere Inhibitor(en) zur Inhibierung der Glykogen-Synthase-Kinase-3 kann/können bevorzugt ausgewählt sein aus der Gruppe der Kinase-Inhibitoren, Estrogen-Analoga, Phytoestrogene, Corticoide oder Salze, insbesondere 4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiazolidine-3,5-dion, 2-Thio(3-iodobenzyl)-5-(1-pyridyl)-[1,3,4]-oxadiazol, 3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dion, 3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dion, Lithiumsalze und der Berylliumsalze. Außerdem können auch Alkali- bzw. Erdalkalimetalle als Inhibitoren fungieren. Ferner können modifizierte Formen der oben genannten Inhibitoren verwendet werden,

[0034] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als entsprechender Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase-3 Genistein eingesetzt.

[0035] Dabei wird Genistein in einer zur Inhibition geeigneten Konzentration verwendet, bevorzugt in einer Konzentration von 10–250 $\mu\text{mol/l}$, besonders bevorzugt in einer Konzentration von 40–60 $\mu\text{mol/l}$. Weniger bevorzugt ist eine Konzentration von 250 μmol bis 1 mmol.

[0036] Bevorzugt kann die Inhibierung der Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs auch durch mindestens einen Antagonisten des Rezeptors „Frizzled“ erfolgen.

[0037] Gemäß der vorliegenden Erfindung bezieht sich „Antagonist“ auf eine Substanz, die wirksame physiologische Transmitter bzw. deren Analoga von einem Rezeptor verdrängen kann, jedoch nicht zur Auslösung einer physiologischen Reaktion und Signalweitergabe befähigt ist, und somit den Rezeptor blockiert.

[0038] Ein alternativer Weg zur Entwicklung von den erfindungsgemäßen Antagonisten besteht im rationalen Drug Design (Böhm, Klebe, Kubinyi, 1996, Wirkstoffdesign, Spektrum-Verlag, Heidelberg). Hierbei wird die Struktur oder eine Teilstruktur des Rezeptors benutzt, um mittels Molecular Modelling Programmen Strukturen zu finden, für die sich eine hohe Affinität an den Rezeptor vorhersagen lässt. Diese Substanzen werden synthetisiert und dann auf ihre Wirkung getestet.

[0039] Bevorzugt kann der mindestens eine Antagonist des Rezeptors „Frizzled“ ausgewählt sein aus der Gruppe der Secreted Frizzle related Proteins (sFRP), Dickkopf (Dkk), Wnt, Fzd, Frat, Nkd, VANG1/STB2, ARHU/WRCH1, ARHV/WRCH2, GIPC2, GIPC3, betaTRCP2/FBXW1B, SOX17, TCF-3, WIF-1, Cerberus, Sizzled, Crescent, Coco, Soggy, Kremen und low-density-lipoprotein-receptor-related proteins (LRP).

[0040] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen, die als „Ausgangspunkt“ der Verfahren verwendet werden, um Zellen ausgewählt aus der Gruppe der Neuroblastom-Zellen, PC12-Zellen, Zellen neuronaler Primärkulturen und 293-Zellen.

[0041] Ferner betrifft die Erfindung Zellen, die nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren behandelt wurden (erhältlich sind) sowie einen neurologischen Gewebeersatz, der solche Zellen enthält. Von einem Patienten durch Biopsie isolierte Zellen werden dazu nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren gezüchtet und dann in diesen oder einen anderen Patienten reimplantiert. Es ist auch möglich, Zellen anderer Säugetiere als Menschen für diesen Zweck zu nehmen, etwa Zellen von Affen, Schweinen, Schafen, Ratten, Mäusen, Kühen, Hunden etc.. Die Transplantation von in vitro differenzierten embryonalen Zellen ist ein etabliertes Verfahren. Auch undifferenzierte neuronale Progenitoren wurden bereits transplantiert. Zusätzlich ist eine Beeinflussung des Wachstumsverhaltens adulter neuronaler Stammzellen in vivo durch die erfindungsgemäßen Medikamente in den beschriebenen Anwendungsformen möglich.

[0042] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft (Screening-) Verfahren zum Auffinden und zur Identifizierung von Substanzen, die den Wnt-Signalweg hemmen und zur Differenzierung von neuronalen Stammzellen, bzw. von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen, geeignet sind. Ein solches Verfahren kann folgende Schritte umfassen:

- c) das in Kontakt bringen der Zellen mit der Substanz,
- d) das Bestimmen der β -Catenin-Konzentration in den Zellen,
- e) das Vergleichen mit einer geeigneten Vergleichszelle, und
- f) das Nachweisen der Differenzierung der Zellen.

[0043] Zum Zweck der Auffindung dieser Substanzen können auch direkte oder indirekte Detektionsverfahren verwendet werden, wie Sie dem Fachmann zur Auffindung von Interaktionspartnern geläufig sind. Diese Verfahren umfassen beispielsweise

- Antikörperselektionstechniken
- eine Reihe von Verfahren, die unter dem Begriff „Yeast-N-Hybrid“ Systeme zusammengefasst werden, z. B. das Yeast-2-Hybrid-System
- Phagen-Display-Systeme
- Immunopräzipitationen
- Imuno-Assays wie ELISA oder Western-Blot
- Reporter-Testsysteme
- Durchmustern von Bibliotheken niedermolekularer Verbindungen
- „Molecular modelling“ unter Verwendung von struktur-Informationen der Wnt-Signaltransduktionsproteine
- Microarray
- Proteinarray
- Antikörperarray
- Massenspektrometrie- bzw. HPLC-basierte Screeningsysteme.

[0044] Die in diesen Verfahren gefundenen Interaktionspartner werden anschließend auf ihre Fähigkeit hin untersucht, den Wnt-Signalweg zu hemmen und zur Differenzierung von neuronalen Stammzellen zu führen.

[0045] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung von Medikamenten zur Behandlung oder zur Prophylaxe von Krankheiten, die durch Modulation der Aktivität oder Menge eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionswegs positiv beeinflusst werden können. Insbesondere zählen zu diesen Krankheiten Erkrankungen oder Beschwerden, die direkt oder indirekt den Tod von Gehirnzellen zur Folge haben.

[0046] Die erfindungsgemäßen Medikamente können dabei entweder nach einem der erfindungsgemäßen Verfahren behandelte Zellen, und/oder Substanzen, die eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibieren, insbesondere Inhibitoren der Glykogen-Synthase-Kinase-3 und/oder Antagonisten des Rezeptors Frizzled und/oder Antikörper gegen Proteine des Wnt-Signaltransduktionswegs enthalten.

[0047] Die Wirkstoffe werden in einer therapeutisch wirksamen Menge verabreicht, welche sich routinemäßig, gemäß Techniken zur Ermittlung des Dosierungsbereiches, von einem Fachmann auf dem relevanten Arbeitsgebiet bestimmen lässt.

[0048] Bei den Krankheiten kann es sich beispielsweise um zerebrale Fehlbildungen und zerebrale Entwicklungsstörungen wie infantile Zerebralparesen, Fehlbildungen des kraniozervikalen Übergangs oder dysraphische Syndrome handeln. Außerdem zählen zu diesen Krankheiten degenerative und atrophische Prozesse des Gehirns und des Rückenmarks, wie senile und präsenile Hirnatropien, beispielweise Morbus Alzheimer, Morbus Binswanger oder Morbus Pick. Auch Stammganglienerkrankungen wie Morbus Huntington und HDL2, Chorea, Athesose und Dystonie gehören zu den Erkrankungen, welche mittels der erfindungsgemäßen Medikamente behandelt werden können. Weiterhin seien spongioformen Enzephalopathien genannt, sowie Pyra-

midenbahn- und Vorderhorndegenerationen, beispielsweise Amyotrophe Lateralsklerose, spinale Muskelatrophie und progressive Bulbärparalyse genannt. Ebenfalls kann es sich um degenerative Ataxien, wie Morbus Friedreich, Morbus Refsum oder spinocerebelläre Ataxien Typ 1-25 handeln. Ferner sind metabolischen und toxischen Prozesse des Gehirns und des Rückenmarks, wie hereditäre Stoffwechselerkrankungen des Aminosäuren-, Lipid-, Kohlenhydrat- und Metallionen-Stoffwechsels insbesondere Morbus Wilson durch die erfindungsgemäßen Medikamente behandelbar. Weiterhin seien Multiple Sklerose und andere Entmarkungskrankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems, Gehirn und Rückenmarkstumore und traumatische Schädigungen des Nervensystems aufgezählt. Auch Durchblutungsstörungen des Gehirns und des Rückenmarks, insbesondere Hirninfarkte und andere Formen des Schlaganfalls sowie Muskelerkrankungen, die auf eine Schädigung des Nervensystems beruhen insbesondere posttraumatischen Muskelatrophien sind durch die erfindungsgemäßen Medikamente behandelbar.

[0049] Weiterhin bevorzugt sind Modifikationen oder Formulierungen der erfindungsgemäßen Medikamente, durch die die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, erhöht wird, bzw. sich der Verteilungskoeffizient zum Hirngewebe hin verschiebt. Beispiele für solche Modifikationen sind die Addition einer Proteintransduktionsdomäne (ptd) oder von tat-Sequenzen. Außerdem können Kernlokalisationssequenzen (NLS) bzw. Kerntranslokationssequenzen (NTS) verwendet werden.

[0050] Ebenso bevorzugt ist die Zugabe aller Substanzen zu den erfindungsgemäßen Medikamenten, durch die ihre therapeutische Wirkung unterstützt wird. Dieser Effekt kann dabei kumulativ, oder überadditiv sein. Für diesen Zweck geeignet sind z.B. Substanzen mit neuroprotektiven Eigenschaften, wie Erythropoietin, BDNF, VEGF, CTNF, GCSF und GMCSF und Entzündungsbeeinflussende Medikamente.

[0051] Die erfindungsgemäßen Medikamente lassen sich gemäß den im Fachgebiet verfügbaren Standardverfahren formulieren. So kann beispielsweise ein pharmazeutisch unbedenklicher Trägerstoff (oder Hilfsstoff) zugegeben werden. Geeignete Träger- bzw. Hilfsstoffe sind dem Fachmann geläufig. Bei dem Träger- oder Hilfsstoff kann es sich um ein festes, halbfestes oder flüssiges Material handeln, das als Vehikel oder Medium für den wirksamen Bestandteil dient. Dem Fachmann mit Normalwissen auf dem Gebiet der Herstellung von Zusammensetzungen ist es leicht möglich, die geeignete Verabreichungsform und -art je nach dem jeweiligen Eigenschaften des ausgewählten Wirkstoffes, der zu behandelnden Erkrankung bzw. des zu behandelnden Krankheitszustands, dem Stadium der Erkrankung sowie anderen relevanten Umständen auszuwählen (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (1990)). Der Anteil und die Beschaffenheit des pharmazeutisch unbedenklichen Träger- oder Hilfsstoffs werden durch Löslichkeit und die chemischen Eigenschaften des ausgewählten Wirkstoffes festgelegt.

[0052] Die Medikamente werden besonders bevorzugt durch direkte interzerebrale Injektion in das Gehirn oder als intraventrikuläre Injektion verabreicht. Vorzugsweise können sie auch intravenös, als Tablette oder als Nasenspray verabreicht werden. Auch ein Gentransfer durch modifizierte Adenoviren ist ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung.

[0053] Ferner betrifft die Erfindung auch ein Verfahren zum Auffinden und zur Identifizierung von Substanzen (Screeningverfahren) zum Nachweis von gehirnzellenähnlichen Zellen und Gehirnzellen, umfassend die Verfahrensschritte

- i) das Bestimmen der Konzentration von β -Catenin, und
- ii) das Vergleichen der bestimmten Konzentration aus i) mit der β -Catenin-Konzentration einer geeigneten Vergleichszelle.

[0054] Als Vergleichszelle kann hier ebenfalls wieder eine nicht mit der entsprechenden Substanz behandelte Zelle herangezogen werden. Bei einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Bestimmung der Konzentration von β -Catenin durch einen Antikörper.

[0055] Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von β -Catenin als diagnostischem Marker zur Identifizierung von gehirnzellenähnlichen Zellen und Gehirnzellen. Der Nachweis kann auch, unter anderem, durch einen Antikörper erfolgen.

[0056] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine rekombinante, neuronale Stammzelle bzw. eine von einer neuronalen Stammzelle abgeleitete Zelle. Diese Zellen enthalten ein Nukleinsäurekonstrukt, das für ein Polypeptid codiert, welches zur Inhibierung einer Reaktion des Wnt-Signaltransduktionsweges führt. Die Zellen werden zur in vitro Differenzierung der Stammzellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen eingesetzt.

[0057] Das Nukleinsäurekonstrukt beinhaltet dabei eine für ein inhibitorisch wirkendes Protein codierende Nukleinsäure unter der Kontrolle eines Promotors. Der Promotor kann hierbei jeder bekannte Promotor sein, der in der Wirtszelle, in die das Nukleinsäurekonstrukt eingebracht werden soll, aktiv ist, d.h. in dieser Wirtszelle die Transkription des nachgeschalteten Proteins aktiviert. Der Promotor kann hierbei ein konstitutiver Promotor sein, welcher das nachgeschaltete Protein ständig exprimiert, oder ein nicht-konstitutiver Promotor, der nur zu definierten Zeitpunkten im Laufe der Entwicklung oder unter bestimmten Umständen exprimiert.

[0058] Das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt kann gegebenenfalls weitere Kontrollsequenzen enthalten. Unter einer Kontrollsequenz wird eine beliebige Nukleotidsequenz verstanden, die die Expression des inhibitorischen Polypeptides beeinflusst, wie insbesondere der Promotor, eine Operatorsequenz, d.h. die DNA-Bindungsstelle für einen Transkriptionsaktivator oder einen Transkriptionsrepressor, eine Terminator-Sequenz, eine Polyadenylierungssequenz oder eine Ribosomenbindungsstelle.

[0059] Außerdem kann das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt eine Nukleinsäuresequenz enthalten, durch die der Vektor sich in der betreffenden Wirtszelle replizieren kann. Solche Nukleotidsequenzen werden in der Regel „origin of replication“ (deutsch: Replikationsursprung) genannt. Beispiele für solche Nukleotidsequenzen sind der SV40-Replikationsursprung, der in Säugetier-Wirtszellen zum Einsatz kommt.

[0060] Das Nukleinsäurekonstrukt kann weiterhin einen oder mehrere Selektionsmarker enthalten. Unter einem Selektionsmarker versteht man ein Gen, welches unter der Kontrolle eines Promotors steht und welches für ein Protein codiert, das einen physiologischen Defekt der Wirtszelle komplementiert. Selektionsmarker stellen insbesondere das Gen codierend für die Dihydrofolat Reduktase (DHFR) dar, oder auch ein Gen, welches die Resistenz gegen Antibiotika, wie insbesondere Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin, Blastidicin, Gentamycin, Chloramphenicol, Neomycin oder Hygromycin bewirkt.

[0061] Eine große Anzahl von rekombinanten Vektoren zur Expression eines Zielproteins in Wirtszellen ist nach dem Stand der Technik bekannt, viele von ihnen sind auch kommerziell erhältlich.

[0062] Außerdem kann das inhibitorisch wirkende Protein auch als Fusionsprotein exprimiert werden. Dabei wird dem zu exprimierenden Protein eine Anzahl von Aminosäuren N- oder C-terminal angefügt. Diese können beispielsweise die Funktion haben, die Expression des rekombinanten Proteins zu steigern, seine Löslichkeit zu verbessern, dessen Aufreinigung zu erleichtern oder dessen Nachweisbarkeit zu ermöglichen.

[0063] Weiterhin kann die Zelle mit dem Nukleinsäurekonstrukt stabil oder transient transfiziert worden sein.

[0064] Transfektion oder Transformation meint jegliche Art von Verfahren, die zur Einbringung einer Nukleinsäuresequenz in einen Organismus verwendet werden kann. Für diesen Vorgang steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (siehe auch Sambrook et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual., 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989).

[0065] Unter einer transienten Transformation wird das Einbringen eines Nukleinsäurekonstruktes in eine Zelle verstanden, wobei sich das Nukleinsäurekonstrukt nicht in das Genom der transformierten Zelle integriert. Bei einer stabilen Transformation dagegen erfolgt eine Integration des Nukleinsäurekonstrukts, bzw. von Teilen des Konstruktes, in das Genom der transformierten Zelle.

[0066] Ferner betrifft die Erfindung die Differenzierung einer rekombinanten, neuronalen Stammzelle, in der mindestens ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs nicht exprimiert wird, inaktiv exprimiert wird oder, im Vergleich mit der entsprechenden Wildtyp-Stammzelle, vermindert exprimiert wird, zu gehirnzellenähnlichen Zellen.

[0067] Bevorzugterweise ist dabei mindestens ein für ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs codierendes Gen oder ein an der Expression dieses Gens beteiligter DNA-Abschnitt komplett deletiert ist, teilweise deletiert ist oder weist eine Mutation auf.

[0068] „Mutationen“ umfassen dabei Substitutionen, Additionen oder Deletionen eines oder mehrerer Nukleotide. Unter „Substitution“ ist der Austausch einer oder mehrerer Nukleotide durch ein oder mehrere Nukleotide zu verstehen. „Addition“ bezeichnet das Hinzufügen von einem oder mehreren Nukleotiden. „Deletion“ ist das Entfernen eines oder mehrerer Nukleotide.

[0069] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stamm-

zellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen, umfassend eine rekombinante, neuronale Stammzelle, die ein Nukleinsäurekonstrukt zur Expression eines Proteins umfasst, das eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibieren kann.

[0070] Die Erfindung betrifft weiterhin einen Kit zur in vitro Differenzierung von neuronalen Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen, umfassend eine rekombinante, neuronale Stammzelle, in der mindestens ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs nicht exprimiert wird, inaktiv exprimiert wird oder, im Vergleich mit der entsprechenden Wildtyp-Stammzelle, vermindert exprimiert wird.

[0071] Bei in beiden Kits enthaltenen Zellen wurden bereits zuvor ausführlich beschrieben. Ferner können die Kits weitere Gegenstände und Substanzen umfassen, wie Versuchsanordnungen, Medien, Medienzusätze, etc..

[0072] Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die Zeichnung näher erläutert:
Sie zeigt in

[0073] [Fig. 1](#) ein zweidimensionales Elektropherogramm, in dem ein Proteinextrakt aus adulten neuronalen Stamm- und Progenitorzellen nach isoelektrischem Punkt (1. Dimension) und Molekulargewicht (2. Dimension) aufgetrennt ist. Identifizierte Proteinspots des Wnt-Signalweges sind gekennzeichnet. Die Proteinspots wurden zur Identifizierung ausgestanzt und massenspektrometrisch untersucht,

[0074] [Fig. 2](#) die semiquantitativen Veränderungen der in [Abb. 1](#) dargestellten und identifizierten Proteine vor und nach dem Differenzierungsprotokoll,

[0075] [Fig. 3](#) Ergebnisse der funktionellen Analyse des Wnt-Signalweges in differenzierten und undifferenzierten adulten neuronalen Stamm- und Progenitorzellen mit Hilfe des Western Blots. Beta-Catenin wurde durch spezifische Antikörper in den Proteinextrakten aus adulten neuronalen Stamm- und Progenitorzellen sichtbar gemacht. (A) zeigt Ergebnisse für undifferenzierte Zellen, ohne Blockade des Wnt-Signalweges, (B) für undifferenzierte Zellen, mit Blockade des Wnt-Signalweges durch Genistein, (C) für die Negativkontrolle, (D) für differenzierte Zellen, ohne Blockade des Wnt-Signalweges, (E) differenzierte Zellen, mit Blockade des Wnt-Signalweges durch Genistein,

[0076] [Fig. 4](#) die semiquantitative Darstellung der Ergebnisse aus [Abb. 3](#). Die Expression von β -Catenin kann nach Gabe von Genistein etwa um Faktor 2 gesenkt werden,

[0077] [Fig. 5](#) differenzierte neuronale Stamm- und Progenitorzellen in der Zellkultur nach dem Differenzierungsprotokoll, und in

[0078] [Fig. 6](#) eine schematische Darstellung des Wnt-Signaltransduktionsweges.

Beispiel 1: Identifizierung des Wnt-Signalweges in neuronalen Stamm- und Progenitorzellen

[0079] Aus kultivierten neuronalen Stamm- und Progenitorzellen wird ein Proteinextrakt isoliert, in dem durch zwei-dimensionale Gelelektrophorese Proteine des Wnt-Signalweges identifiziert werden.

[0080] Neuronale Stammzellen werden aus Hippokampus, Bulbus olfactorius und Subventrikulärzone aus dem Gehirn 4-6 Wochen alter Ratten in einem dem Fachmann bekannten Verfahren isoliert (Gage FH et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 11879-11883; Gage FH et al., 2000, WO2000047718A1,; Ray J et al., 1993, Proc Natl Acad Sci USA, 90, 3602-3606; Reynolds BA and Weiss S, 1992, Science, 255, 1707-1710.; Weiss S et al., 1994, WO1994009119A1). Dazu werden die Gehirne entnommen und in 50 ml eiskalter Dulbeccos phosphat-gepufferter Salzlösung (DPBS) supplementiert mit 4.5 g/l Glukose (DPBS/Glc) gewaschen. Die genannten Hirnregionen aus 6 Tieren werden disseziert, in 10 ml DPBS/Glc gewaschen und für 5 min bei 1600 g und 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wird das Gewebe mechanisch zerkleinert. Die Gewebstücke werden mit DPBS/Glc-Medium für 5 min bei 800 g gewaschen und die drei Pellets in 0.01% (w/v) Papain, 0.1% (w/v) Dispase II (neutrale Protease), 0.01% (w/v) DNase I, und 12.4 mM MnSO₄ in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) resuspendiert. Das Gewebe wird mit Plastikpipettenspitzen trituriert und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Lösung alle 10 min durchmischt wird. Die Lösung wird für 5 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert und die Pellets drei Mal in 10 ml DMEM-Ham's F-12-Medium supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 IE/ml Streptomycin gewaschen. Die Pellets werden in 1 ml Neurobasal-Medium supplementiert mit B27 (Invitrogen, Karlsruhe), 2 mM L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 IE/ml Streptomycin, 20 ng/ml Endothelial Growth Factor (EGF), 20 ng/ml Fibroblast Growth Factor-2

(FGF-2) und 2 µg/ml Heparin resuspendiert. Die Zellen werden unter sterilen Bedingungen in geeigneten Kulturschalen (BD Falcon, Heidelberg) in einer Konzentration von 25,000–100,000 Zellen/ml ausgebracht. Die Kulturschalen werden bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Das Kulturmedium wird ein Mal pro Woche gewechselt, wobei etwa zwei Drittel ersetzt werden und ein Drittel als konditioniertes Medium beibehalten wird.

[0081] Für die zweidimensionale Gelelektrophorese werden die Stamm- und Progenitorzellen nach 5 Passagen von jeweils etwa 14 Tagen 3 Mal in 300 mosmol/l Tris-HCl -Saccharose, pH 7.4, gewaschen und in einem Probenpuffer bestehend aus 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) IPG buffer pH 3-10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), 100 mM DTT and 1.5 mg/mL Complete protease inhibitor (Roche, Mannheim, Germany) für 1 hour bei Raumtemperatur in einem Orbitalschüttler lysiert. Das Lysat wird dann bei 21000 x g für 30 min zentrifugiert und der Proteingehalt des Überstandes nach der Bradfordmethode bestimmt (Bradford MM, 1976, Anal Biochem, 72, 248–254).

[0082] Die zweidimensionale Gelelektrophorese wird nach Standardprotokollen ausgeführt (Görg A et al., 2000, Electrophoresis, 21, 1037–1053). Proben von 500 µg werden zur isoelektrischen Fokussierung auf 18 cm lange, nicht-lineare pH 3-10 Gradienten-IEF-Gelstreifen aufgetragen (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany). Nach 12 h Schwellzeit bei 30 V werden 200 V für 1 h, 500 V für 1 h und 1000 V für 1 h angelegt.

[0083] Danach wird die Spannung auf 8000 V erhöht und über 12 h konstant gehalten. Daraus ergeben sich 100300 Vh auf dem IPGphor IEF System (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) für die isoelektrische Fokussierung. Die Trennung in der zweiten Dimension wird in 12.5% Polyacrylamid-Gelen in Gegenwart von 10% SDS vollzogen. An die Gele (180 × 200 × 1.5 mm³) werden 30 mA für 30 min und 100 mA für etwa 4 h in einer wassergekühlten vertikalen Elektrophoresekammer angelegt (OWL Scientific, Woburn, MA, USA). Die Gele werden nach einem modifizierten Protokoll (Blum H et al., 1987, Electrophoresis, 8, 93–99) mit Silbernitrat gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Diese Methode ist kompatibel mit einer sich anschließenden Massenspektrometrie. Die Gele werden dann eingescannt und die Bilder densitometrisch vermessen mit der speziellen Software Phoretix 2D Professional (Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle-upon-Tyne, UK). Nach einer Hintergrundkorrektur werden die Proteinpunkte des Wnt-Signalweges nach optischer Dichte und Volumen vermessen. Die Proteine werden durch Massenspektrometrie identifiziert (Proteosys AG, Mainz). ([Fig. 1](#))

Beispiel 2: Nachweis der Regulation der identifizierten Proteine in neuronalen Stamm- und Progenitorzellen durch Differenzierung in vitro

[0084] Die Differenzierung der adulten neuronalen Stammzellen wird durch Entzug der Wachstumsfaktoren EGF und bFGF aus dem Medium und Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) ausgelöst. Dazu werden die Zellen aus den Kulturschalen entnommen, in Kulturmedium für 10 min bei 800 g und 4°C zentrifugiert und drei Mal in 10 ml DPBS bei 800 g und 4°C gewaschen. Die Zellen werden enzymatisch vereinzelt und in einer neuen Kulturschale in 4 ml Neurobasal-Medium supplementiert mit B27 (Invitrogen, Karlsruhe), 2 mM L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 IE/ml Streptomycin und 2 µg/ml Heparin resuspendiert. Zusätzlich werden dem Medium 5% fetales Kälberserum zugesetzt. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in geeigneten Kulturschalen (BD Falcon, Heidelberg) in einer Konzentration von 25,000–100,000 Zellen/ml ausgebracht. Die Kulturschalen werden bei 37°C in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre für zwei Tage inkubiert.

[0085] Die in vitro differenzierten Zellen werden mittels der zwei-dimensionalen Elektrophorese (s.o., Bsp. 1) untersucht und die Ergebnisse für die optischen Dichten der Proteinpunkte mit denen für undifferenzierte Zellen mit statistischen Testverfahren verglichen. Dazu wird ein t-Test nach Student verwendet, ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ wird als statistisch signifikant angesehen. Dabei konnten die Proteine Pontin 52, Proteasom-Untereinheit alpha-1 und Proteasom-Untereinheit alpha-6 (Tabelle 1) als reguliert exprimiert identifiziert werden ([Fig. 2](#)).

GenBank annotation	Theoretical pI	Theoretical MW (Da)	Experimental MW (Da)	Mascot score	Method of identification	Regulation [% upreg. in undiff.]	Induction factor	Induction factor
RuvB-like protein 1; Pontin 52	6.02	50524	52000	176	MALDI-TOF	59.5	1.6	1.6
adenomatosis polyposis coli binding protein Ebt1	5.02	30168	31000	65	MALDI-TOF	-56.0	0.4	-2.3
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1	6.14	29784	30000	77	MALDI-TOF	47.8	1.5	1.5
expressed sequence C87222	5.12	23450	27000	129	MALDI-TOF	-0.3	1.0	-1.0
proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 6	6.35	27638	27000	97	MALDI-TOF	30.4	1.3	1.3

Beispiel 3: Nachweis der Regulation von beta-Catenin nach Differenzierung und Inhibition des Wnt-Signalweges

[0086] Für die Inhibition des Wnt-Signalweges wird der unspezifische Kinaseinhibitor Genistein in einer Konzentration von 50 µM zugesetzt, um die Wirkung der Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) zu inhibieren (Mura S et al., 2002, Neuron, 35, 91–105.).

[0087] Danach wird ein Proteinextrakt (s.o., Beispiel 1) angefertigt und das Protein beta-Catnin durch eindimensionale Gelelektrophorese und Western Blotting identifiziert ([Fig. 3](#), [Fig. 4](#)).

[0088] Die Proteinextrakte der adulten neuronalen Stammzellen werden zunächst in Lämmli-Puffer bestehend aus 2% (w/v) Natriumdodecylsulfat, 10% (v/v) Glycerol, 100 mM Dithiothreitol, 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.001% Bromphenolblau und 5% 2-Mercaptoethanol in einem 12% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch das „semi-dry blotting“-Verfahren (Kyhse-Andersen J, 1984, J Biochem Biophys Methods, 10, 203–209.) auf eine Nitrozellulosemembran (Optitrans BA-583, 0.2 µm, Schleicher & Schnell, Dassel) aufgebracht. Die Membran wird mit einem geeignet Reagenz inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu unterdrücken, für 1 h inkubiert (Seablock, Pierce, Rockford, IL, USA) und dann über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper (beta-Catenin, 1 : 5000, BD Biosciences, Heidelberg) in TBST aus 60 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 und 0.1% (v/v) Tween 20 inkubiert. Am folgenden Tag werden die Membranen 3 × 5 min in TBST gewaschen und der Zweitantikörper (ImmunoPure Rabbit Anti-Mouse IgG, (H + L), Peroxidase Conjugated, Pierce, Rockford, IL, USA) in einer Verdünnung von 1 : 20.000 in TBST, für 2 h aufgebracht. Die Antikörperbindung wird durch Chemilumineszenz-Signale nachgewiesen. Die Chemilumineszenz-Signale werden unter Verwendung eines geeigneten Substrates (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) für 30 s auf Röntgenfilmen aufgenommen. Die Röntgenfilme werden entwickelt und densitometrisch vermessen. Die Ergebnisse für undifferenzierte Zellen ohne Inhibition des Wnt-Pfades, undifferenzierte Zellen mit Inhibition des Wnt-Pfades, differenzierte Zellen ohne Inhibition des Wnt-Pfades und differenzierte Zellen mit Inhibition des Wnt-Pfades wurden verglichen ([Fig. 4](#)). Dabei findet sich eine etwa zweifache Reduktion der beta-Catenin-Expression in den Zellen mit Inhibition des Wnt-Pfades.

Patentansprüche

1. Verfahren zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen, umfassend

- a) das in Kontakt bringen der Zellen mit einer Substanz, die eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibiert, und
- b) das Kultivieren dieser Zellen unter Bedingungen, die eine Vermehrung und/oder Differenzierung der Zellen ermöglichen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen differenzieren.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass gegebenenfalls als Schritt c) eine Bestimmung der Konzentration eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionswegs erfolgt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Protein-Konzentration durch einen Antikörper erfolgt.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Protein um β-Catenin handelt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Inhibition der Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs durch eine Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase-3 erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Inhibition der Glykogen-Synthase-Kinase-3 durch mindestens einen Inhibitor erfolgt, der ausgewählt ist aus der Gruppe der Kinase-Inhibitoren, Estrogen-Analoga, Phytoestrogene, Corticoide und Salze, insbesondere 4-Benzyl-2-methyl-1,2,4-thiazolidine-3,5-dion, 2-Thio(3-iodobenzyl)-5-(1-pyridyl)-[1,3,4]-oxadiazol, 3-(2,4-Dichlorophenyl)-4-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dion, 3-[(3-Chloro-4-hydroxyphenyl)amino]-4-(2-nitrophenyl)-1H-pyrrole-2,5-dion, Lithiumsalze, Berylliumsalze.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Inhibitor Genistein ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass Genistein in einer Konzentration von 10–250 µmol/l eingesetzt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Inhibierung der Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs durch mindestens einen Antagonisten des Rezeptors Frizzled erfolgt.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine Antagonist ausgewählt ist aus der Gruppe der Secreted Frizzle related Proteins (sFRP), Dickkopf (Dkk), Wnt, Fzd, Frat, Nkd, VANG1/STB2, ARHU/WRCH1, ARHV/WRCH2, GIPC2, GIPC3, betaTRCP2/FBXW1B, SOX17, TCF-3, WIF-1, Cerberus, Sizzled, Crescent, Coco, Soggy, Kremen und low-density-lipoprotein-receptor-related proteins (LRP).

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den von neuronalen Stammzellen abgeleiteten Zellen um Zellen ausgewählt aus der Gruppe der Neuroblastom-Zellen, PC12-Zellen, Zellen neuronaler Primärkulturen und 293-Zellen handelt.

13. Zelle, erhältlich nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12.

14. Neurologischer Gewebeersatz, enthaltend Zellen nach Anspruch 13.

15. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend Zellen nach Anspruch 13.

16. Screeningverfahren zur Identifizierung von Substanzen, die den Wnt-Signalweg hemmen und zur Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen geeignet sind, umfassend

- c) das in Kontakt bringen der Zellen mit der Substanz,
- d) das Bestimmen der β -Catenin-Konzentration in den Zellen,
- e) das Vergleichen mit einer geeigneten Vergleichszelle, und
- f) das Nachweisen der Differenzierung der Zellen.

17. Pharmazeutisches Mittel, enthaltend Inhibitoren der Glykogen-Synthase-Kinase-3, Antagonisten des Rezeptors Frizzled und/oder Antikörper gegen Proteine des Wnt-Signaltransduktionswegs.

18. Mittel nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase-3 um Genistein handelt.

19. Verwendung eines pharmazeutischen Mittels nach einem der Ansprüche 15, 17 und 18 zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Krankheiten, die durch Modulation der Aktivität oder Menge eines Proteins des Wnt-Signaltransduktionswegs positiv beeinflusst werden können.

20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Krankheit um eine Krankheit ausgewählt aus folgenden Gruppen handelt,
 der Gruppe der zerebralen Fehlbildungen, insbesondere der zerebralen Entwicklungsstörungen, infantilen Zerebralparesen, Fehlbildungen des kraniozervikalen Übergangs und dysrhapischen Syndrome,
 der Gruppe der degenerativen und atropischen Prozesse des Gehirns und des Rückenmarks, insbesondere der senilen und präsenilen Hirnatropien, insbesondere Morbus Alzheimer, Morbus Binswanger und Morbus Pick,
 der Gruppe der Stammganglienerkrankungen, insbesondere Morbus Huntington und HDL2, Chorea, Athesose und Dystonie, spongioformen Enzephalopathien,
 der Gruppe der Pyramidenbahn- und Vorderhorndegenerationen, insbesondere Amyotrophe Lateralsklerose, spinale Muskelatropie und progressive Bulbärparalyse,
 der Gruppe der degenerativen Ataxien, insbesondere Morbus Friedreich, Morbus Refsum und Spinocerebelläre Ataxien Typ 1-25,
 der Gruppe der metabolischen und toxischen Prozesse des Gehirns und des Rückenmarks, Morbus Wilson, Multipler Sklerose, Entmarkungskrankheiten des zentralen und peripheren Nervensystems, Gehirn und Rückenmarkstumoren, traumatische Schädigungen des Nervensystems, Durchblutungsstörungen des Gehirns und des Rückenmarks, insbesondere hereditären Stoffwechselerkrankungen des Aminosäuren-, Lipid-, Kohlenhydrat- und Metallionenstoffwechsels, insbesondere Morbus Wilson, multipler Sklerose, Hirninfarkten und

anderen Formen des Schlaganfalls, Muskelerkrankungen, die auf eine Schädigung des Nervensystems beruhen und posttraumatischen Muskelatropien.

21. Screeningverfahren zum Nachweis von gehirnzellenähnlichen Zellen und Gehirnzellen, umfassend
i) das Bestimmen der Konzentration von β -Catenin, und
ii) das Vergleichen der Konzentration aus i) mit der β -Catenin-Konzentration einer geeigneten Vergleichszelle.

22. Screeningverfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Konzentration von β -Catenin durch einen Antikörper erfolgt.

23. Verwendung von β -Catenin als diagnostischem Marker zur Identifizierung von gehirnzellenähnlichen Zellen und Gehirnzellen.

24. In vitro Differenzierung rekombinanter, neuronaler Stammzellen zu gehirnzellenähnlichen Zellen, bewirkt durch ein Nukleinsäurekonstrukt zur Expression eines Proteins, das eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibieren kann.

25. Differenzierung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Expression des Proteins unter der Kontrolle eines konstitutiven oder eines regulierbaren Promotors erfolgt.

26. Differenzierung nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Zelle mit dem Nukleinsäurekonstrukt stabil oder transient transfiziert wurde.

27. Differenzierung einer rekombinanten, neuronalen Stammzelle zu gehirnzellenähnlichen Zellen, bewirkt dadurch, dass mindestens ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs nicht exprimiert wird, inaktiv exprimiert wird oder, im Vergleich mit der entsprechenden Wildtyp-Stammzelle, vermindert exprimiert wird.

28. Differenzierung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein für ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs codierendes Gen oder ein an der Expression dieses Gens beteiligter DNA-Abschnitt komplett deletiert ist, teilweise deletiert ist oder eine Mutation aufweist.

29. Kit zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen, umfassend eine rekombinante, neuronale Stammzelle, die ein Nukleinsäurekonstrukt zur Expression eines Proteins umfasst, das eine Reaktion des Wnt-Signaltransduktionswegs inhibieren kann.

30. Kit zur in vitro Differenzierung neuronaler Stammzellen und von neuronalen Stammzellen abgeleiteter Zellen, umfassend eine rekombinante, neuronale Stammzelle, in der mindestens ein Protein des Wnt-Signaltransduktionswegs nicht exprimiert wird, inaktiv exprimiert wird oder, im Vergleich mit der entsprechenden Wildtyp-Stammzelle, vermindert exprimiert wird.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

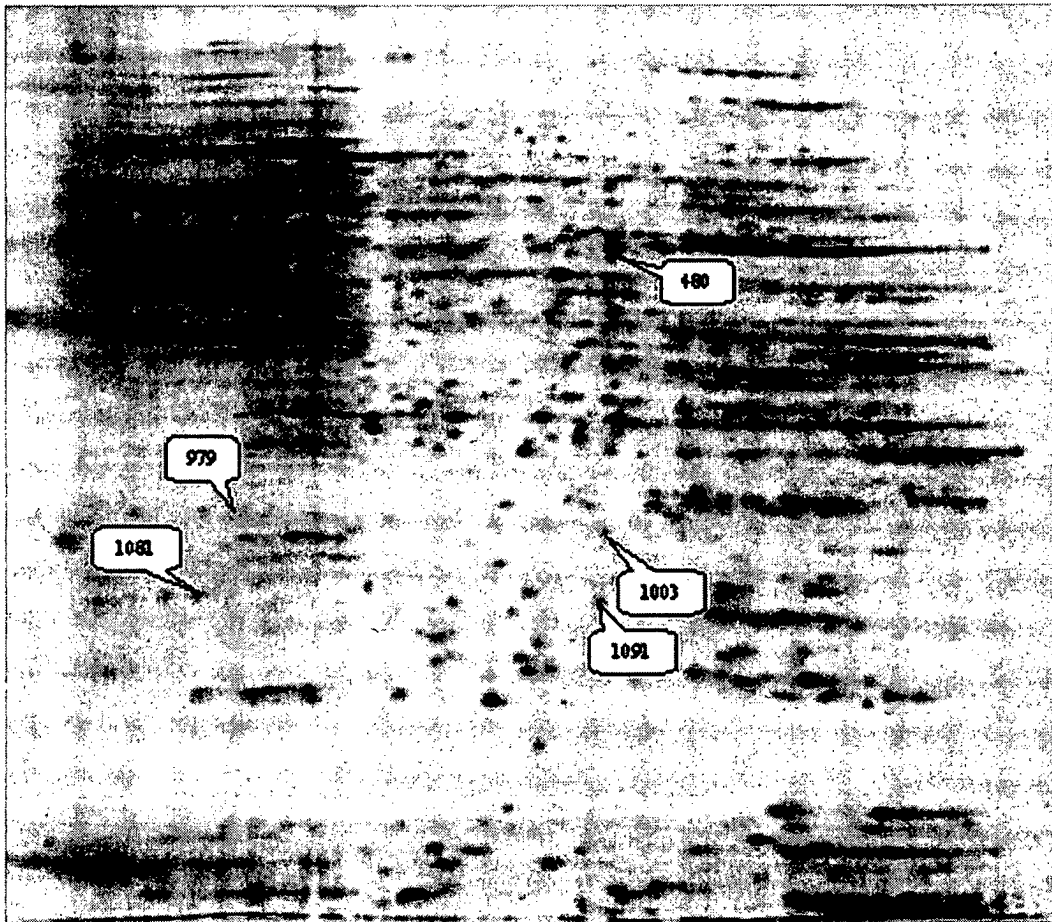


Fig. 2

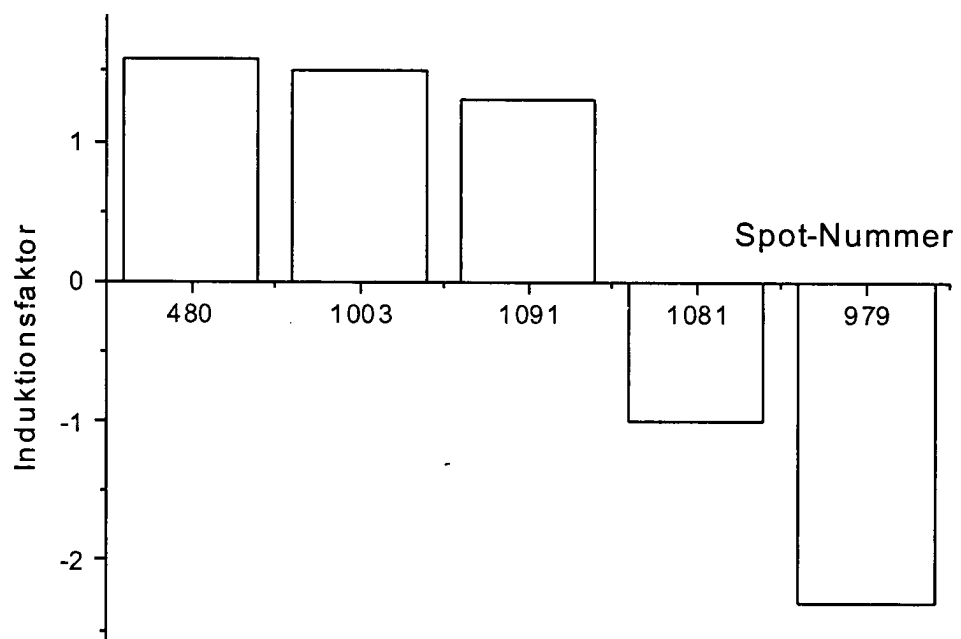


Fig. 3

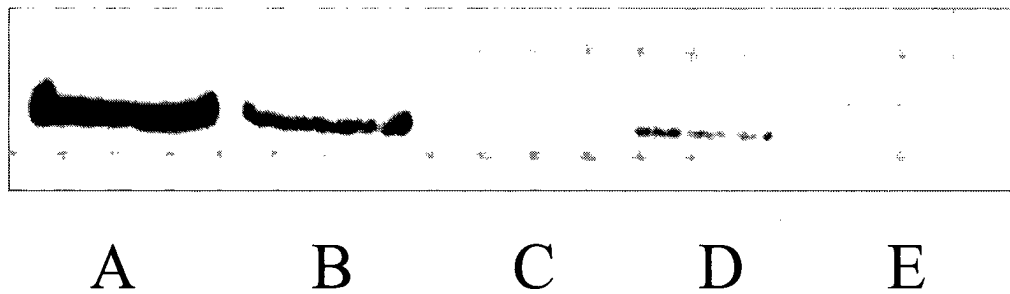


Fig. 4

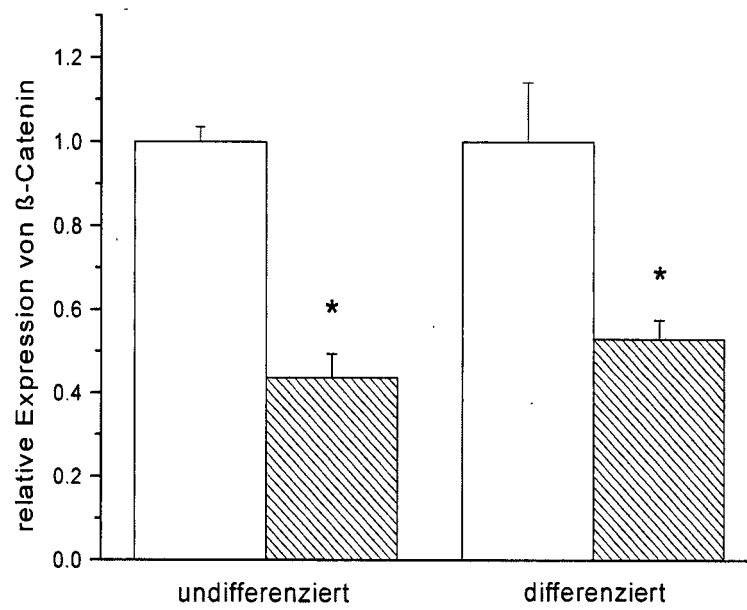


Fig. 5

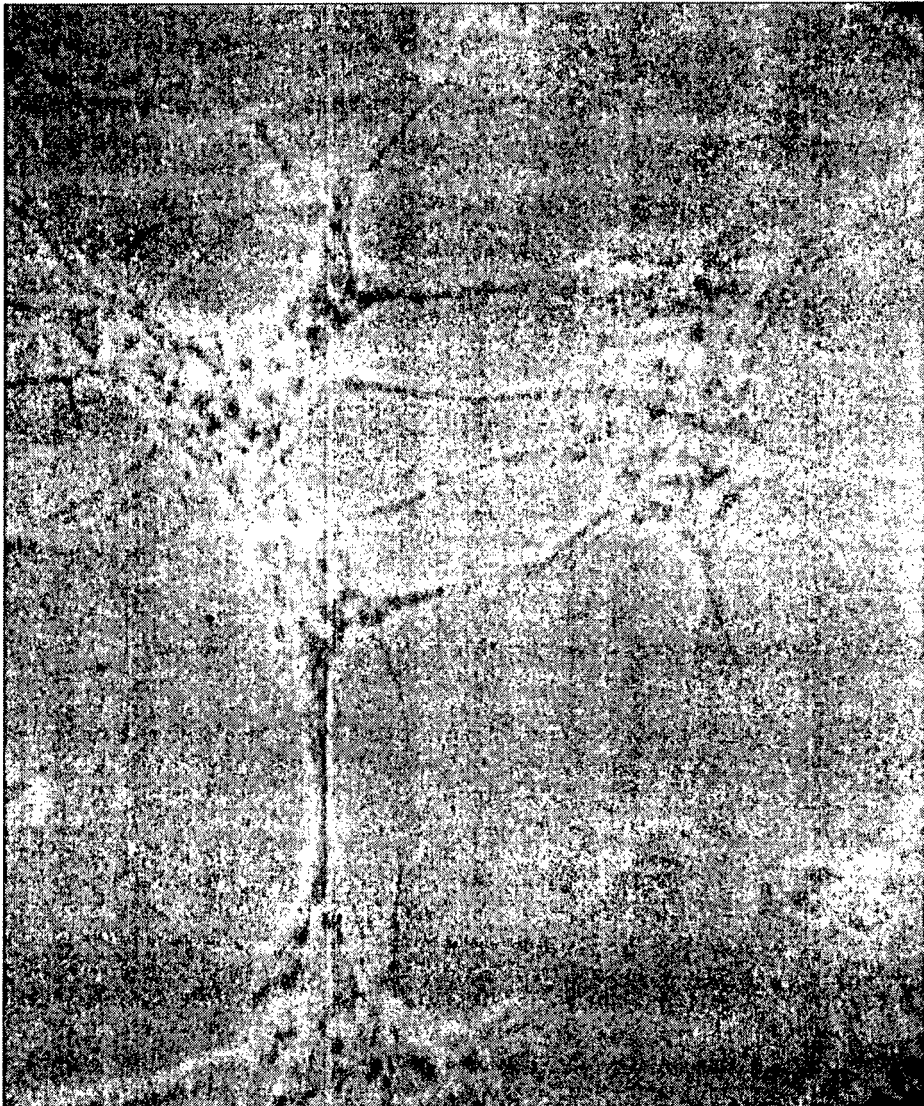


Fig. 6

