

Transplantation ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen in  
durch Ko-Injektion von anti-MOG-Antikörpern und Komplement  
induzierte inflammatorische Entmarkungsherde

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Swantje Engelbrecht  
aus Dresden

2006

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. O. Brüstle  
2. Gutachter: Prof. Dr. V. Gieselmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2006

Aus dem Institut für Rekonstruktive Neurobiologie  
Medizinische Einrichtungen  
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. O. Brüstle

IN DANKBARKEIT  
MEINEN ELTERN



## INHALTSVERZEICHNIS

	<b>Inhaltsverzeichnis</b> -----	<b>5</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> -----	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> -----	<b>10</b>
1.1	Embryonale Stammzellen -----	10
1.2	Zellersatz im Zentralnervensystem-----	12
1.3	Myelinersatz und Gliazelltransplantation -----	14
1.3.1	Oligodendrozyten, Schwann-Zellen und Myelin-----	14
1.3.2	Demyelinisierende Erkrankungen -----	16
1.3.2.1	Multiple Sklerose-----	16
1.3.2.2	Tiermodelle -----	16
1.3.3	Geeignete Spenderzellen für myelinisierende Transplantate -----	19
1.4	Zielsetzung -----	25
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> -----	<b>27</b>
2.1	Tierexperimente -----	27
2.1.1	Tierstamm -----	27
2.1.2	Narkose und Perfusion-----	27
2.1.3	Operationsinstrumentarium -----	27
2.1.4	Zu applizierende Chemikalien-----	28
2.2	Zellkultur -----	28
2.2.1	ES-Zelllinie -----	28
2.2.2	Supplemente -----	28
2.2.3	Nukleoside -----	30
2.2.3.1	Nukleosid-Stammlösung -----	31
2.2.4	Puffer-----	31
2.2.5	Enzyme -----	32
2.2.6	Zellkulturmedien -----	32
2.2.7	Verbrauchsmaterialien-Zellkultur -----	34
2.2.8	Geräte -----	35
2.3	Immunhistochemie/ <i>in situ</i> Hybridisierung -----	35
2.3.1	Primäre Antikörper-----	35

2.3.2	Sekundäre Antikörper und Fluoreszenzsubstrate-----	36
2.3.3	Chemikalien Immunhistochemie und <i>in situ</i> Hybridisierung-----	36
2.3.4	Lösungen - Immunhistochemie-----	37
2.3.5	<i>in situ</i> Hybridisierung-----	38
2.3.5.1	Puffer und Lösungen-----	38
2.3.6	Verbrauchsmaterialien-Immunhistochemie-----	39
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> -----	<b>41</b>
3.1	ES-Zellkultur-----	41
3.1.1	Differenzierungsprotokoll-----	41
3.1.2	Immuncytochemische Darstellung der Zellen <i>in vitro</i> -----	47
3.1.3	Präparation der Zellen zur Transplantation-----	47
3.2	Demyelinisierung-----	48
3.3	Transplantation ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen in den anti-MOG/Komplement-induzierten Entmarkungsherd-----	51
3.4.	Histopathologische Analyse-----	51
3.4.1	Gewebeaufarbeitung für die Analyse des Demyelinisierungsherdes und der transplantierten Zellen-----	51
3.4.2	Immunhistochemie der Gewebeschnitte des Demyelinisierungsherdes-----	52
3.4.3	Immunhistochemie der transplantierten Präparate-----	52
3.4.4	DNA <i>in situ</i> Hybridisierung der transplantierten Präparate-----	53
3.4.5	Histologische Färbung (HE-Färbung)-----	54
3.4.6	Qualitative Analyse der Zellen im Gewebeschnitt nach Transplantation-----	55
3.5	Quantifizierung und Statistische Analyse-----	55
3.5.1	Quantifizierung der Ausdehnung der Demyelinisierung-----	55
3.5.2	Quantifizierung der <i>in vitro</i> Differenzierung der Spenderzellen-----	56
3.5.3	Quantitative Analyse der Zellen nach Transplantation in einen anti-MOG/Komplement-induzierten Entmarkungsherd-----	56
3.5.4	Statistische Analyse-----	58
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> -----	<b>59</b>
4.1	Etablierung eines anti-MOG/Komplement-induzierten lokalisierten Entmarkungsmodells-----	59
4.1.1	Pilotexperiment zur Optimierung des Systems-----	59

4.1.2	Ausdehnung und Demyelinisierung-----	61
4.1.3	Spontane Remyelinisierung und Axonerhalt -----	65
4.2	Gewinnung oligodendroglialer und astrozytärer Vorläuferzellen aus ES-Zellen -----	68
4.3	Überlebensfähigkeit ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in einen inflammatorischen Entmarkungsherd-----	71
4.4	Differenzierungspotential ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in einen inflammatorischen Entmarkungsherd-----	76
<b>5</b>	<b>DISKUSSION -----</b>	<b>79</b>
5.1	Anti-MOG/Komplement-induzierte lokalisierte Entmarkung - Ein Modell zur Untersuchung myelinisierender Transplantate-----	79
5.1.1	Demyelinisierungsmodelle im Vergleich -----	80
5.1.2	Verhalten des anti-MOG/Komplement-induzierten Entmarkungsherdes im Zeitverlauf-----	81
5.1.3	Grenzen des anti-MOG/Komplement-induzierten Entmarkungsmodells -----	83
5.2	ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen überleben und differenzieren in einem inflammatorischen Demyelinisierungsherd-----	84
5.2.1	Überleben ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in anti-MOG/Komplement-induzierte Entmarkungsherde-----	84
5.2.2	Differenzierung ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in anti-MOG/Komplement-induzierte Entmarkungsherde ----	85
5.2.3	Grenzen des Transplantationsexperimentes-----	86
5.3	ES-Zellen - eine geeignete Spenderquelle für remyelinisierende Transplantate? -----	87
5.3.1	Gewinnung hoch aufgereinigter, bipotenter oligoastrozytärer Vorläuferzellen aus murinen ES-Zellen -----	87
5.3.2	Grenzen von Zellersatzstrategien bei demyelinierenden Erkrankungen -----	89
5.4	Perspektiven und Risiken -----	90
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG -----</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS -----</b>	<b>93</b>
	<b>Danksagung -----</b>	<b>112</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AKV	Antikörperverdünnung
AP	alkalische Phosphatase
CNP	2',3'-zyklische Nukleotid 3'Phosphodiesterase
Cx 32	Connexin 32
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
EBr	Ethidiumbromid
EBs	Embryoidkörper
EGF	epidermal growth factor
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF2	fibroblast growth factor
FKS	Fetales Kälberserum
GalC	Galaktozerebrosid
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GFP	green fluorescent protein
HBSS	Hanks balanced salt solution
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
LIF	leukemia inhibitory factor
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	myelin basic protein
md	myelindefizient
mES-Zellen	murine ES-Zellen
MOBP	myelinassoziiertes basisches Oligodendrozytenprotein
MOG	Myelin/Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
NGS	normal goat serum
NRS	normal rat serum
OECs	olfactory ensheathing cells



p.a.	post applicationem
PDGF	platelet derived growth factor
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
p.i.	post injectionem
PLP	Proteolipid-Protein
PNS	peripheres Nervensystem
PO	Polyornithin
p.t.	post transplantationem
RT	Raumtemperatur
SSC	Standard Saline Citrate
Vgl.	Vergleich
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 EINLEITUNG

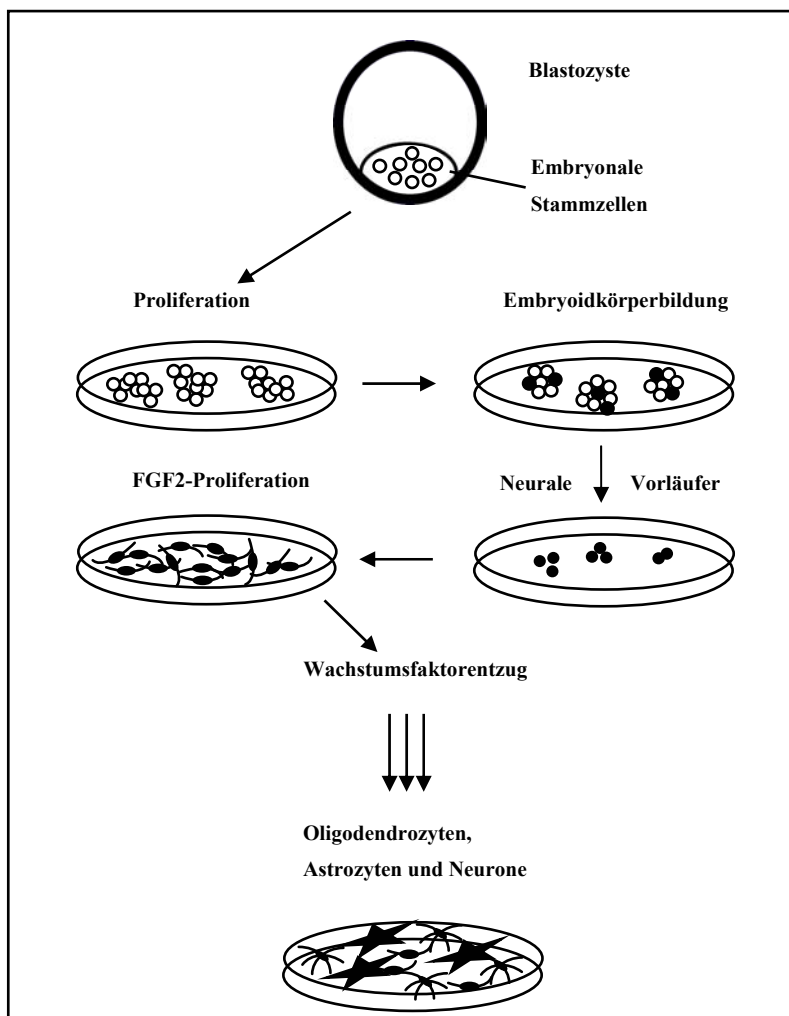
## 1.1 Embryonale Stammzellen

Unter einer Stammzelle versteht man jede undifferenzierte Zelle eines Organismus, die sich über längere Zeiträume vermehren und reife Tochterzellen bilden kann. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste jenseits des Acht-Zell-Stadiums eines Embryos gewonnen. Sie wurden erstmals 1981 in der Maus beschrieben und etabliert (Evans et al. 1981; Martin 1981). Einer US-amerikanischen Gruppe ist es 1998 gelungen, ES-Zellen aus menschlichen Blastozysten zu isolieren (Thomson et al. 1998).

ES-Zellen besitzen einzigartige Eigenschaften. Zum einen sind sie pluripotent, das heißt sie können noch in alle Zell- und Gewebetypen eines Organismus ausreifen. Nach Transplantation von ES-Zellen in eine andere Blastozyste nehmen sie an der Bildung aller Gewebe des sich entwickelnden Embryos - einschließlich der Keimbahnpopulation - teil und bilden so genannte chimäre Tiere (Bradley et al. 1984). Hubner et al. (2003) konnten zeigen, dass Maus-ES-Zellen in Zellkultur sogar Oozyten bilden können, die in die Meiose eintreten, benachbarte Zellen zur Bildung einer Follikel-ähnlichen Struktur rekrutieren und sich parthenogenetisch zu einer Blastozyste weiterentwickeln können. Zum anderen lassen sich Maus-ES-Zellen in der Anwesenheit so genannter *feeder*-Zellen und/ oder *leukemia inhibitory factor (LIF)* in nahezu uneingeschränkten Zellmengen vermehren, ohne dabei ihr pluripotentes Entwicklungspotential zu verlieren (Smith et al. 1988). Obwohl gewisse Unterschiede in Bezug auf die Wirkung einzelner Wachstumsfaktoren auf die Expression von Differenzierungsmarkern verzeichnet wurden, entsprechen die Eigenschaften humaner weitgehend denen muriner ES-Zellen. Ein anderer Weg zur Gewinnung von humanen pluripotenten Stammzelllinien stellt die Überführung primordiale Keimzellen in *embryonic germ cells* (EG-Zellen) aus früh abortierten Feten dar (Shamblott et al. 1998). Diese so genannten EG-Zellen weisen Eigenschaften auf, die denen humaner ES-Zellen ähneln.

Das pluripotente Differenzierungspotential von ES-Zellen lässt sich auch *in vitro* nachweisen. In differenzierenden ES-Zellkulturen wurden unter anderem hämatopoetische Zelltypen (Wiles et al. 1997), Kardiomyozyten (Klug et al. 1996; Kumar et al. 2005), Insulin-sezernierende Zellen (Soria et al. 2000), Endothelzellen (Levenberg et al. 2002) und Zellen des Nervensystems beschrieben (Zhang et al. 2001). In Zusammenhang mit der nahezu unbegrenzten Vermehrbarkeit stellen diese

Zellen eine interessante Perspektive für die Erzeugung von Spenderzellen für Zellersatzstrategien dar. Die neurale Differenzierung von ES-Zellen wurde vielfach durch Zugabe von Retinsäure induziert. Dabei ergaben sich bisher oft gemischte Zellpopulationen, in denen neurale Elemente nur einen Teil der Gesamtpopulation ausmachten (Bain et al. 1995; Finley et al. 1996; Fraichard et al. 1995; Strübing et al. 1995). Erst kürzlich konnte eine nahezu homogene Zellpopulation radiärer Gliazellen und Oligodendrozyten unter Verwendung eines Retinsäure-haltigen Protokolles gewonnen werden (Bibel et al. 2004). Andere Gruppen generierten neurale Vorläuferzellen in definierten serumfreien Medien ohne Zugabe von Retinsäure. (Billon et al. 2002; Brüstle et al. 1999a; Okabe et al. 1996). Inzwischen konnten mit dopaminergen Neuronen und Motorneuronen angereicherte neuronale Kulturen erzeugt werden (Chung et al. 2002, Wichterle et al. 2002). Nach Wachstumsfaktorentzug reifen ES-Zell-abgeleitete Vorläuferzellen typischerweise in alle drei wesentlichen Zelltypen des Nervensystems - Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten - aus. Ein Beispiel eines solchen Verfahrens zeigt Abbildung 1.



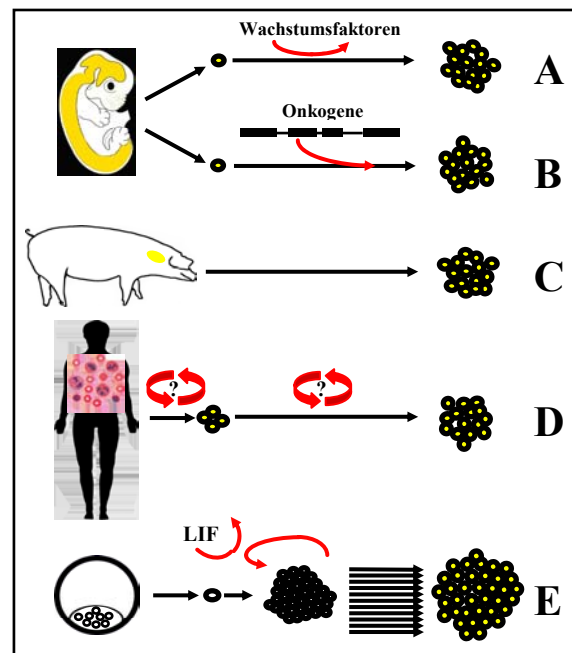
**Abb. 1: Schematische Darstellung der Gewinnung von neuronalen Vorläuferzellen aus murinen embryonalen Stammzellen.**

Die der inneren Zellmasse von Blastozysten entnommenen ES-Zellen werden nach einer initialen Proliferationsphase zu so genannten Embryoidkörpern aggregiert. Diese frei im Zellkulturmedium schwimmenden Sphäroide werden nach wenigen Tagen plattiert und in ein serumfreies Medium überführt, welches das Überleben neuraler Vorläuferzellen begünstigt. Diese werden in Anwesenheit von FGF2 weiter vermehrt. Nach Wachstumsfaktorentzug differenzieren diese Zellen in Neurone und gliale Zellen- Astrozyten und Oligodendrozyten.

## 1.2 Zellersatz im Zentralnervensystem

Die im Laufe der Evolution stetig zunehmende Komplexizität von Gehirn und Rückenmark hat ihren Preis: Kaum ein anderes Organsystem weist ein so limitiertes Regenerationspotential auf wie das Zentralnervensystem (ZNS). Zugrunde gegangene Nervenzellen regenerieren bis auf wenige Ausnahmen nicht und daraus entstehende neurologische Defizite sind auch durch Einsatz modernster medizinischer Methoden nicht zu beheben. Aus heutiger Sicht ist die Transplantation neuraler Vorläuferzellen eine der attraktivsten Perspektiven für die Reparatur zellulärer Defekte im ZNS. Die Transplantation von Zellen ins Zentralnervensystem wird seit langem experimentell eingesetzt, um die Überlebensfähigkeit von neuralem Spendergewebe, die Stimulation axonaler Regeneration und funktionelle Effekte zu studieren (Björklund 1991). Dennoch stellt der Zellersatz im ZNS auch für die gegenwärtige Wissenschaft eine große Herausforderung dar. Im Vergleich zu anderen Organsystemen ist eine Transplantation ganzer Abschnitte des ZNS aufgrund des komplizierten Netzwerkes nicht praktikierbar. Vielmehr müssen bei einer Transplantation ins Nervengewebe unreife Vorläuferzellen in die bestehende Architektur inkorporiert und dort zur Ausreifung gebracht werden. Da neurale Vorläufer in nennenswertem Umfang nur während der Entwicklung des Nervensystems vorkommen, erfordern derartige Transplantate embryonales Donorgewebe (Abb. 2A). In der Tat ist dieser Ansatz bereits klinisch erprobt worden. Dabei hat im Wesentlichen der Einsatz neuronaler Transplantate das Feld dominiert. In Tiermodellen mit experimentell induzierter Parkinsonerkrankung konnte nach Transplantation dopaminergener Neurone oder neuraler Vorläuferzellen ein Rückgang der Symptomatik beobachtet werden (Ben-Hur et al. 2004; Nishimura et al. 2003). Auch bei Parkinson-Patienten konnte nach Transplantation dopaminergener Neurone oder neuraler Vorläuferzellen eine Reduktion der Symptome erreicht werden (Lindvall et al. 1994a; Kordower et al. 1995). Derzeit werden diese Transplantationsstrategien auf andere humane degenerative Erkrankungen des Nervensystems, wie zum Beispiel Chorea Huntington ausgeweitet (Bachoud-Levi et al. 2000; Philpott et al. 1997). Einer der wesentlichen Nachteile dieser Verfahren ist die limitierte Verfügbarkeit von Spenderzellen. In den klinischen Studien zur Behandlung von humanen Parkinson-Patienten wurden für die Transplantation eines Erkrankten Zellen aus dem ventralen Mesenzephalon von bis zu sieben menschlichen Feten verwendet (Kordower et al. 1995). Diese Strategie ist weder aus ethischer noch aus logistischer Sicht für eine größere Zahl von Patienten anwendbar. Zahlreiche Versuche sind unternommen worden, die limitierte

Verfügbarkeit embryonalen Spendergewebes zu umgehen. In der Tat haben Studien gezeigt, dass multipotente neurale Vorläuferzellen aus verschiedenen Regionen des embryonalen und auch des adulten Zentralnervensystems unter Einfluss von Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (FGF2) und/oder epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) proliferieren (Cattaneo et al. 1990; Davis et al. 1994; Gritti et al. 1996; Johe et al. 1996; Reynolds et al. 1992a) (Abb. 2A). Der Nachteil dieser Methode besteht jedoch im geringen Expansionspotential. Eine andere Möglichkeit ist die Onkogen-vermittelte Immortalisierung (Abb. 2B) von fetalem Gewebe (Cepko 1988; Lendahl et al. 1990b). Die anfängliche Euphorie ist durch die Tatsache, dass Onkogen-vermittelte immortalisierte Spenderzellen potentiell tumorigen sind, gedämpft worden. Ein weiterer Weg besteht in der Verwendung tierischen Spendergewebes (Abb. 2C). Hierbei ist kein humanes Gewebe erforderlich. Ein wesentlicher Nachteil von Xenotransplantationen liegt in der potentiellen Übertragbarkeit tierischer Pathogene auf den Menschen. Mit der Gewinnung neuraler Vorläuferzellen aus somatischen Stammzellen könnten Spenderzellen im Prinzip vom selben Patienten gewonnen werden (Abb. 2D). Die gezielte Umprogrammierung in Zellkultur und die Expansionsfähigkeit vor und nach Transdifferenzierung stellen derzeit noch eine große Herausforderungen dar.



**Abb. 2: Potentielle Spenderquellen für klinische Zellersatzstrategien.**

(+) und (-) kennzeichnen die wichtigsten Vor- und Nachteile. (A) Wachstumsfaktor-vermittelte Expansion fetaler Spenderzellen: (+) Rechtlich zulässige Quelle für menschliche Spenderzellen (-) Erfordert fetales Hirngewebe, begrenzte Expansionsfähigkeit. (B) Onkogen-vermittelte Immortalisierung: (+) Uneingeschränkte Vermehrbarkeit. (-) Potentielle Tumorinduktion durch das eingefügte Onkogen. (C) Xenotransplantation: (+) Kein menschliches Gewebe erforderlich. (-) Potentielle Übertragung tierischer Pathogene. (D) Gewinnung neuraler Vorläuferzellen aus somatischen Stammzellen: (+) Spenderzellen könnten vom selben Patienten gewonnen werden. (-) Bisher nicht gezielt in der Zellkultur durchführbar, Expansionsfähigkeit vor und nach Transdifferenzierung unklar. (E) Gewinnung neuraler Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen. (+) Nahezu uneingeschränkte Vermehrbarkeit, über Kernreprogrammierungs-Strategien auch autolog durchführbar, gezielte Elimination krankheitsassoziiierter Gene möglich. (-) Als Ausgangspunkt werden humane Blastozysten benötigt. *Aus Wernig et al. 2003.*

Die *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen zu neuronalen Vorläufern dagegen bietet eine echte Alternative als Spenderquelle für neuronalen Zellersatz (Abb. 2E). In zunächst noch undifferenziertem Zellstadium können sie in nahezu uneingeschränkter Menge vermehrt und

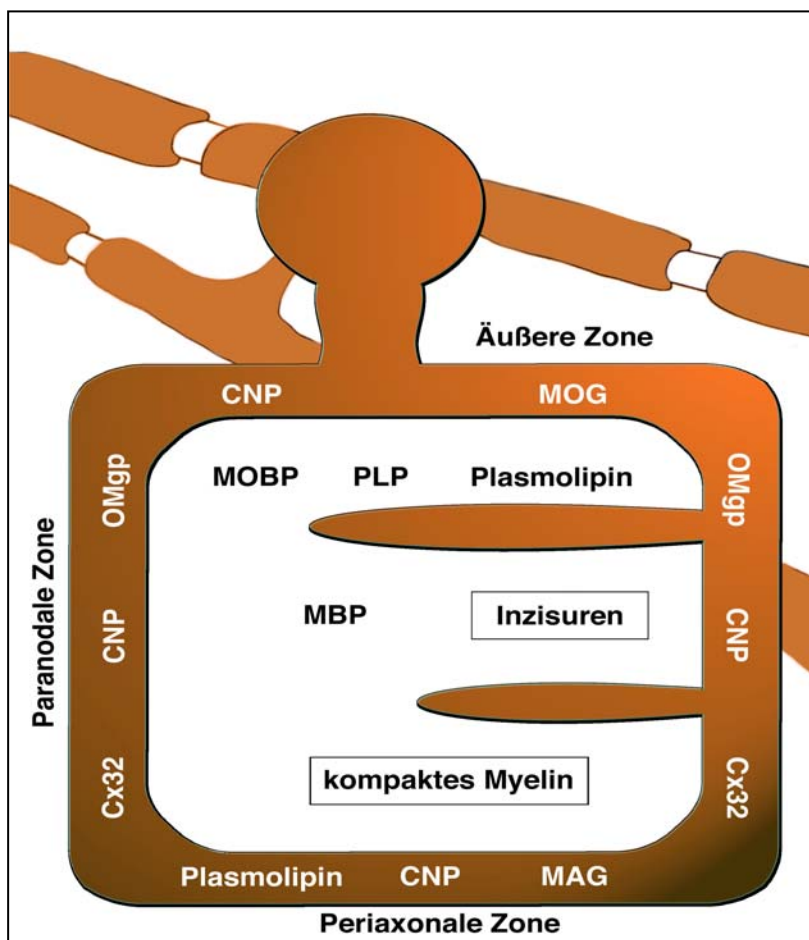
gezielt zu Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen differenziert werden. Ihre Pluripotenz und ihre nahezu uneingeschränkte Vermehrbarkeit machen embryonale Stammzellen zu einer viel versprechenden Donorquelle für Transplantationsstrategien. Ein weiterer entscheidender Vorteil von ES-Zellen ist die Möglichkeit, an ihnen auch komplexe genetische Veränderungen durchzuführen.

### **1.3 Myelinersatz und Gliazelltransplantation**

#### ***1.3.1 Oligodendrozyten, Schwann-Zellen und Myelin***

Oligodendrozyten gehören zu den Gliazellen des Nervensystems. Sie haben ihren Ursprung in der Subventrikularzone des Gehirns. Verteilung und Migration finden während der prä-, peri- und frühen postnatalen Entwicklung statt (Compston et al. 1997; Levison et al. 1993; LeVine et al. 1988). Ihre Hauptaufgabe besteht in der Markscheidenbildung. Axonale Fortsätze einer Nervenzelle sind von einer mehrschichtigen Hülle aus Gliazellmembranen, der so genannten Myelinscheide, umgeben. Myelinscheiden sind spezielle Membranausstülpungen der Oligodendrozyten, die sich konzentrisch um Axone wickeln. Die Anzahl der Wicklungen bestimmt schließlich die Myelinscheidendicke. Die Myelinscheide bewirkt eine elektrische Isolierung der Axone und ist essentiell für die schnelle, saltatorische Übertragung von Aktionspotentialen. Im peripheren Nervensystem (PNS) sind Schwann-Zellen, im ZNS vorwiegend Oligodendrozyten für die Bildung der Myelinscheiden verantwortlich. Wenn sich auch die Markscheidenbildung im zentralen und peripheren Nervensystem nach ähnlichen Prinzipien vollzieht, gibt es doch eine Reihe von Unterschieden. Während in der Peripherie eine Schwann-Zelle nur einem Axon zugeordnet ist, versieht eine einzige Oligodendrogliazelle mehrere benachbarte Axone mit separaten Myelinscheiden. Außerdem unterscheiden sich peripheres und zentrales Myelin in Gehalt und Zusammensetzung ihrer Proteine und Lipide. So kommt zum Beispiel P0, ein spezielles basisches Myelinprotein, nur in peripheren Markscheiden vor. Mit seiner kompakten periodischen Struktur und seinem großen Anteil an Lipiden isoliert Myelin die Axone untereinander und von der äußeren Umgebung. Myelinmembranen besitzen biochemisch verschiedene Domänen. Das basische Myelinprotein (MBP) (Brunner et al. 1989), das myelinassoziierte basische Oligodendrozytenprotein (MOBP, Holz et al. 1997) und das Proteolipid-Protein (PLP, Campagnoni 1988) sind im so genannten „kompakten Myelin“

lokalisiert (Holz und Schwab 1997; Sternberger et al. 1978; Trapp, 1990). Im Gegensatz dazu sind die 2',3'- zyklische Nukleotid 3'Phosphodiesterase (CNP, Braun et al. 1988), das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG, Bachoud-Levi et al. 2000), das Myelin/Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG, Adelman et al. 1995), das Oligodendrozyten/Myelin-Glykoprotein (OMgp) und Connexin32 (Cx32) im nicht kompakten Myelin, den zytoplasmahaltigen *myelin loops*, zu finden (Adelman et al. 1995; Braun et al. 1988; Brunner et al. 1989; Gardinier et al. 1992; Trapp et al. 1987) (Abb. 3). Den Hauptanteil an den Myelinproteinen des ZNS bildet CNP mit ca. 40% gefolgt von MBP mit ca. 30%. Die ordnungsgemäße Myelinisierung im ZNS hängt entscheidend von der Fähigkeit der oligodendroglialen Vorläuferzellen ab, sich im entwickelnden Gehirn regelhaft zu verteilen, zu differenzieren und spezifische Gene für die Myelinsynthese zu exprimieren (Campagnoni 1988; Mikoshiba et al. 1991). Jüngste Studien beschreiben einen wesentlichen Einfluß der Verfügbarkeit von Cholesterol auf die Bildung von Myelinscheiden während der Hirnreifung (Saher et al. 2005). Fehlende Bildung oder der Verlust von Myelinscheiden durch angeborene oder erworbene Erkrankungen führen zu Versagen der Nervenleitung, Untergang der Axone und nachfolgend zu neurologischen Ausfällen.



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänen in Myelinscheiden**

Myelinscheiden bestehen aus zahlreichen Domänen. Dazu gehören kompaktes Myelin, welches von Schmidt-Lantermannschen Inzisuren unterbrochen wird und zytoplasmahaltige *myelin loops*. *Loops* können weiter unterteilt werden in periaxonale, paranodale und äußere Zonen. Myelinproteine sind in den Domänen und Zonen asymmetrisch lokalisiert. MBP, MOBP, Plasmolipin, und PLP sind im kompakten Myelin, CNP, Cx32, MAG, MOG und OMgp in den Myelinschleifen lokalisiert.

Aus Kim et al. 1999

## 1.3.2 Demyelinisierende Erkrankungen

### 1.3.2.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische, schubförmig verlaufende Erkrankung des ZNS, die durch multizentrische Entzündungsherde und Destruktion von Myelin gekennzeichnet ist. Sie hat unter den demyelinisierenden Erkrankungen die höchste Inzidenz. Sie wird in Mitteleuropa mit drei bis sieben Erkrankten, die Prävalenz mit 60-100 pro 100 000 Einwohner angegeben. Frauen sind häufiger betroffen als Männer (1,5:1). Das Prädilektionsalter für die Manifestation der MS liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Sie ist häufigster Grund einer neurologisch bedingten Behinderung von jungen Erwachsenen.

Die Ursache der MS ist unklar. Umwelteinflüsse (Weinshenker 1996) und genetische Faktoren (Ebers et al. 1996; Haines et al. 1996; Sawcer et al. 1996) scheinen für die Prädisposition relevant. Das erste Auftreten klinischer Symptome ist assoziiert mit dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, was durch MR-Untersuchungen sichtbar gemacht werden kann (McFarland et al. 1992; Rudick et al. 1996). Inflammatorische Demyelinisierung und im weiteren Verlauf eintretende axonale Schäden sind dabei primär ursächlich für das Auftreten der Symptome. Intensität und Stärke des Prozesses sowie das Ausmaß der endogenen Remyelinisierung determinieren die Schwere und Dauer der klinischen Symptome und den Grad der Erholung nach jedem Schub. Dabei wird für die Inflammation eine zentrale Rolle im Krankheitsprozess angenommen. In mehr als 50% der Patienten entwickeln sich nach 10-15 Jahren Krankheitsdauer und wiederholten Schüben bleibende neurologische Ausfälle. Histopathologisch finden sich chronische Entmarkungsherde (Plaques), die durch entzündliche Infiltrate, Demyelinisierung, Verlust von Axonen und gliotische Narben gekennzeichnet sind. In fortgeschrittenen Stadien ist die Fähigkeit zur Wiederherstellung meist erschöpft, und die Demyelinisierung sowie die axonalen Schäden bestehen permanent.

### 1.3.2.2 Tiermodelle

Ganz entscheidenden Anteil am gegenwärtigen Verständnis der Pathogenese und der Entwicklung möglicher Therapiestrategien von Entmarkungskrankheiten hat die Schaffung geeigneter Tiermodelle mit Defekten in der Myelinisierung. Zwar ähnelt keines der



verschiedenen Tiermodelle der MS in jeder Hinsicht, doch erlaubt die Untersuchung der Parallelen zwischen Verlaufsformen der MS und bestimmten Aspekten im Tiermodell wertvolle Schlussfolgerungen zur Pathogenese und Entwicklung möglicher Therapiestrategien.

### Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis

Ein repräsentatives Modell für entzündliche Entmarkungskrankheiten wie die MS ist die experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE). Hierbei werden durch Immunisierung mit Myelinproteinen sowohl akute als auch chronisch-schubförmig verlaufende Krankheitsbilder induziert. Verschiedene Modelle der EAE sind erfolgreich zum Studium der vielfältigen Aspekte der Pathogenese der MS eingesetzt worden (Wekerle et al. 1994; Storch et al. 1998). Die akute EAE kann entweder durch aktive Immunisierung mit aufgereinigten Antigenen gegen Myelinproteine oder durch passiven Transfer aktivierter Myelinprotein-spezifischer T-Zellen induziert werden. Enzephalitogene T-Zellen erzeugen jedoch nur entzündliche Veränderungen im ZNS - ohne extensive Demyelinisierung. Der Untergang von Myelin und Oligodendrozyten erfordert zusätzliche Mechanismen. Als ein besonders interessantes Paradigma zur Induktion einer EAE hat sich die Immunisierung von Ratten mit dem Myelinprotein MOG erwiesen. Während eine T-Zell-vermittelte Autoimmunantwort die Induktion der entzündlichen Komponente und die Rekrutierung der aktivierten Effektorzellen hervorruft, sind anti-MOG-Antikörper unabdingbar für die Erzeugung der Demyelinisierung (Linington et al. 1988; Storch et al. 1998; Vass et al. 1992). Durch geeignete Wahl des Immunisierungsprotokolls und des genetischen Hintergrundes der Versuchstiere ist es möglich, den Krankheitsverlauf und die Lokalisation der Läsionen gezielt zu modifizieren und damit Krankheitsformen zu induzieren, die histomorphologisch große Ähnlichkeit zu den beim Menschen beschriebenen Varianten der MS aufweisen (Storch et al. 1998). Die genaue Lokalisation der Entmarkungsherde lässt sich jedoch - wie bei der MS - nicht vorhersagen. Daher sind der gezielten Implantation myelinbildender Zellen in definierte Entmarkungsherde ohne hochauflösende bildgebende Verfahren Grenzen gesetzt.

### Hereditär myelindefiziente Tiere

Für Transplantationsstudien werden seit ehemals natürliche „Myelinmutanten“, die durch einen angeborenen Defekt keine funktionsfähigen Myelinscheiden bilden können, eingesetzt. Dazu zählen die *shiverer* Maus, die *jimpy* Maus, die myelindefiziente (*md*) Ratte und die bei Hunden

beschriebene Mutante *shaking pup*. Jedes dieser Modelle besitzt eine generalisierte Fehlfunktion in der Myelinisierung (Duncan et al. 1997a). Vielfach sind durch die begrenzte Überlebensdauer der Versuchstiere Langzeitstudien an diesen Modellen nicht realisierbar. Die meisten durchgeführten Studien sind an neonatalen oder unreifen Empfängertieren vorgenommen worden, die wiederum Aussagen zum Verhalten im adulten Gewebe nicht zulassen. Dafür bieten diese Mutanten den Vorteil, dass der Mangel an endogenen myelinspezifischen Proteinen ausgenutzt werden kann, um myelinisierende Spenderzellen im Empfänger zu detektieren. Mit der Charakterisierung langlebiger myelindefizienter Tierstämme wurden jedoch neue Perspektiven eröffnet, Langzeituntersuchungen und Beobachtungen an adulten Empfängertieren durchzuführen. Die *taiep* Ratte mit einer Überlebenszeit von bis zu 20 Monaten ist nur ein Beispiel dafür (Duncan et al. 1992a).

#### Chemisch-physikalisch induzierte Myelindefekte

Demyelinisierungsherde können auch durch Injektion von myelintoxischen Chemikalien in die weiße Substanz induziert werden. Eine Vielzahl von Gliotoxinen wurde hierzu bisher eingesetzt, wie z.B. Diphtherietoxin (Murray et al. 1985), Kain-Säure (Dusart et al. 1989), Lysolecithin (ein membranlyisierendes Agens mit besonderer Toxizität für myelinisierende Zellen) (Gout et al. 1993; Jeffery et al. 1995; Gensert et al. 1997; Woodruff et al. 1999a), Ethidiumbromid (EBr, ein mit DNA interagierendes Toxin) (Woodruff und Franklin 1999a) und Kalzium-Ionophoren (Smith et al. 1994). Ebenfalls wurde die Injektion von so genannten Gliotoxinen in Kombination mit Bestrahlung (Groves et al. 1993; Keirstead et al. 1997; Trotter et al. 1993) zur Induktion eines Entmarkungsherdes angewandt. Die kombinierte Behandlung mit myelintoxischen Substanzen und Bestrahlung schafft ein Milieu, in dem eine große Anzahl von Gewebekomponenten mechanisch oder radiogen zerstört bzw. beschädigt werden. So führt insbesondere die Bestrahlung zur Hemmung der endogenen Vorläuferzellproliferation, wie sie für die Reparatur von Myelindefekten als wesentlich diskutiert wird (Gensert und Goldman 1997). Modelle, bei denen eine Demyelinisierung durch Applikation von Gliotoxinen induziert wurde, bieten dem Experimentator die Möglichkeit zur gezielten Steuerung von Versuchsgrößen wie anatomische Lokalisation, Charakter und Größe des demyelinisierten Areals. Eine Untersuchung an adulten Tieren ist möglich. Die limitierte räumliche Ausdehnung mit nur geringen partiellen neurologischen Ausfällen bildet eine gute Basis zur Observation einer erfolgreichen Wiederherstellung nach Transplantation. Mit dem Einsatz hereditär myelindefizienter Tiere und

der Erzeugung lokaler Entmarkungsherde durch chemisch-physikalische Methoden können einzelne Aspekte der Demyelinisierung, der endogenen Remyelinisierung und der Reparatur nach Transplantation untersucht werden (Duncan et al. 1995). Die entstehenden Defekte unterscheiden sich jedoch pathogenetisch und histomorphologisch grundsätzlich von Läsionen wie sie bei entzündlichen Entmarkungserkrankungen des Menschen beobachtet werden (Adelmann et al. 1995). Insbesondere ist die chronisch-inflammatorische Komponente geringer ausgeprägt.

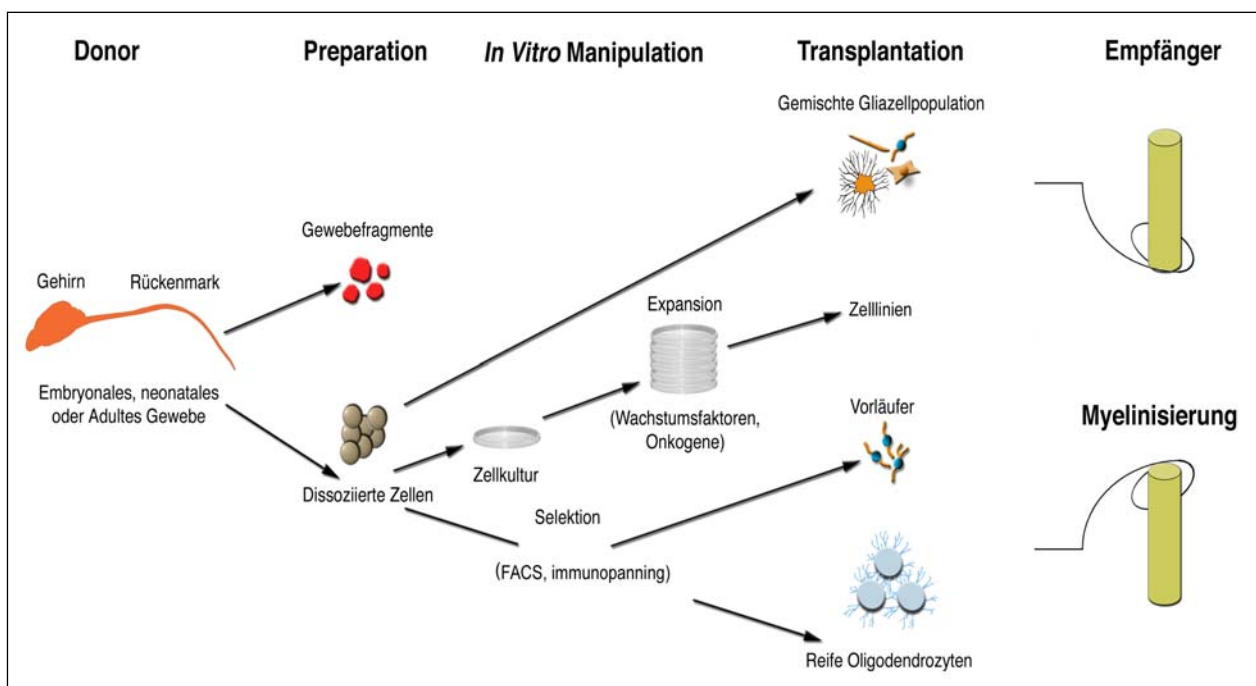
#### Antikörper/Komplement-vermittelte Demyelinisierung

Ein reduktionistisches Modell einer inflammatorischen demyelinisierenden Erkrankung kann durch lokale Injektion von Antikörper und Komplement geschaffen werden. In der Vergangenheit ist die Injektion eines Cocktails von Antikörpern gegen Myelinbestandteile und Serum-Komplement-Proteinen zur Induktion umschriebener entzündlicher Demyelinisierungsherde in Gehirn und Rückenmark erfolgreich eingesetzt worden (Keirstead et al. 1997; Woodruff und Franklin 1999a). Durch die definierte Lokalisation der Demyelinisierungsherde und das Fehlen einer persistierenden systemischen Immunreaktion bietet dieses Modell entscheidende Vorteile gegenüber dem wesentlich komplexeren EAE-Modell. Ein besonderer Vorteil besteht darin, dass sehr selektiv eine Demyelinisierung induziert wird, ohne signifikante Schäden an Axonen, Astrozyten oder Vorläuferzellen zu bewirken. Ähnlich der Situation bei akuten Demyelinisierungsherden im menschlichen Nervensystem kommt es im Verlauf mehrerer Wochen sogar teilweise zu einer spontanen Remyelinisierung.

#### **1.3.3 Geeignete Spenderzellen für myelinisierende Transplantate**

Zur Gewinnung von Spenderzellen für myelinisierende Transplantate existieren verschiedene Methoden. In früheren Studien wurden myelinisierende Zellen aus Gewebefragmenten, die aus embryonalen oder neonatalen Gehirnen gewonnen wurden, eingesetzt (Gumpel et al. 1983; Lachapelle et al. 1983; Gansmüller et al. 1986). Das fortschreitende Verständnis zur Entwicklung von Oligodendrozyten mit Charakterisierung einer Vielzahl stadienspezifischer Marker der Oligodendrozytenlinie (Raff et al. 1983) ermöglichte die gezielte Isolierung von definierten Zellpopulationen. Im Wesentlichen gibt es zwei Wege für die Herstellung hoch aufgereinigter Zellpopulationen. Die gerichtete Differenzierung und die Lineage-Selektion. Bei der gerichteten Differenzierung wird die Gesamtheit der undifferenzierten Zellen durch Wahl geeigneter

Zellkulturmedien und extrinsisch applizierter Faktoren in einen bestimmten Zelltyp überführt (Louis et al. 1992). Die Lineage-Selektion beruht auf einer zunächst wenig gerichteten, spontanen Differenzierung in verschiedene Zelltypen. Über Selektionsverfahren können Zellen mit dem gewünschten Phänotyp gewonnen werden. Exprimiert die zu isolierende Zellpopulation einen spezifischen Oberflächen-Marker, können diese Zellen über immunologische Methoden wie z. B. Immunopanning (Ben-Hur et al. 1998) oder über *fluorescence activated cell sorting* (FACS) (Duncan et al. 1992b) angereichert werden. Oft werden die gerichtete Differenzierung und die Lineage-Selektion kombiniert angewandt. (Abb. 4).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Gewinnung potentieller Spenderzellen für myelinisierende Transplantate aus Primärzellen**

Zell- und Gewebefragmente können aus embryonalem, neonatalem oder adultem Gewebe gewonnen werden. Nach Zelldissoziation können gemischte, multipotente Gliazellpopulation gewonnen und transplantiert werden. Eine Möglichkeit bietet die gerichtete Differenzierung. Durch Zugabe von definierten Medien und extrinsischen Faktoren wird die gesamte Zellpopulation in Richtung eines bestimmten Phänotyps differenziert. Eine weitere Möglichkeit ist die Lineage-Selektion. Dabei wird aus einem Pool an weitgehend ungerichtet differenzierten Zellen über ein Selektionsverfahren (FACS, Immunopanning) der gewünschte Zelltyp isoliert. Myelinisierung nach Transplantation ins Empfängertier konnte bei allen Verfahren beobachtet werden.

Aus Duncan und Milward 1995.

Grundvoraussetzung für eine detaillierte Untersuchung des Migrations- und Differenzierungsverhaltens transplantierte neuraler Vorläuferzellen sind Markierungsmethoden, die eine zuverlässige Identifikation der Spenderzellen im Wirtsgewebe ermöglichen. In Versuchstieren mit einem hereditären Myelindekt können Antikörper gegen spezifische Myelinproteine, die das Empfängertier nicht exprimieren kann, wie MBP in der *shiverer* Maus (Gumpel et al. 1989) oder PLP in der *md* Ratte (Duncan et al. 1988), zum Nachweis genutzt werden. Eine andere Möglichkeit bieten die Markierung der Spenderzellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Baron-Van Evercooren et al. 1991; Gansmüller et al. 1991), die Transfektion von Spenderzellen mit Markergenen (Franklin et al. 1995; Groves et al. 1993) oder die Gewinnung der Spenderzellen aus transgenen Mäusen, die ein Markergen unter Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors exprimieren (Chandross et al. 1999). Daneben ermöglichen bei Xeno- oder allogener Transplantation die Markierung speziesspezifischer DNA-Sequenzen (Brüstle et al. 1995; Brüstle et al. 1998) oder der Geschlechtschromosomen (O'Leary et al. 1997b; Shields et al. 2000) den Nachweis der Spenderzellen.

### Schwann-Zellen

Auch Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems kommen als potentielle Spenderquelle für therapeutische Transplantationen ins ZNS in Betracht. Die Möglichkeit, große Mengen von Schwann-Zellen aus peripheren Nervenbiopsien zu gewinnen, qualifiziert sie als Kandidaten für Zelltransplantationen in humane demyelinisierende Erkrankungen. Sowohl im Tiermodell (Duncan et al. 1997b; Dusart et al. 1989) als auch in MS Patienten (Itoyama et al. 1985; Yamamoto et al. 1991) mit frischen demyelinisierenden Läsionen konnten Areale mit beachtlichem Anteil von Schwann-Zellen und peripherem Myelin nachgewiesen werden. Die Fähigkeit von transplantierten Schwann-Zellen zur Remyelinisierung von demyelinisierten Axonen im Rückenmark wurde umfassend untersucht (Baron-Van Evercooren et al. 1992b; Blakemore 1977; Blakemore et al. 1985). Untersuchungen zum Verhalten von transplantierten Schwann-Zellen in durch EBr und Bestrahlung induzierten fokalen, demyelinisierten Läsionen im adulten Rattengehirn haben ergeben, dass die Fähigkeit zur Remyelinisierung auf astrozytendefiziente Areale beschränkt ist. Es erfolgte keine Migration von Schwann-Zellen außerhalb der Läsionen und somit auch keine Teilnahme an der Reparatur entfernter liegender Defekte im Gehirn (Shields et al. 2000). Transplantierte Schwann-Zellen scheinen Astrozyten oder die extrazelluläre Matrix anderer Zellen zu benötigen, um migrieren zu können. Auf der

anderen Seite wird ihre Auswanderung durch Astrozyten, welche die Glia limitans bilden, verhindert. Trotz der komplexen Beziehungen zwischen transplantierten Schwann-Zellen und Empfängerastrozyten besteht jedoch kein Zweifel, dass sie prinzipiell für die Reparatur von demyelinisierenden Erkrankungen eingesetzt werden könnten.

### Olfactory Ensheathing Cells (OECs)

*Olfactory ensheathing cells* wurden erstmalig am Ende des 19. Jahrhunderts beschrieben (Blanes 1898). OECs sind Teil des olfaktorischen Systems und entlang des Nervus olfactorius bis zur äußeren Nervenfaserschicht des Bulbus olfactorius lokalisiert (Farbmann 1990). Schwann-Zell-Eigenschaften (Barber et al. 1982) wurden ebenso beschrieben wie astrozytenähnliche Charakteristika (Barber et al. 1987; Doucette 1991; Pixley 1992). Das führte zu der Annahme, dass OECs einen Gliazelltyp repräsentieren, welcher Eigenschaften sowohl des PNS als auch des ZNS aufweist. Nach anfänglichen Spekulationen darüber, ob OECs in der Lage sind, Axone zu myelinisieren, konnte zunächst in einem *in vitro* Modell Myelinisierung von Dorsalwurzel-Neuriten durch ko-kultivierte OECs nachgewiesen werden (Devon et al. 1992). Nachfolgende *in vivo* Studien zeigten, dass transplantierte OECs Gliotoxin- und Bestrahlungs-induzierte Demyelinisierungsherde remyelinisieren konnten (Franklin et al. 1996). In einigen Studien konnte sogar die Wiederherstellung von Leitungsgeschwindigkeiten in demyelinisierten Axonen, die durch transplantierte OECs remyelinisiert worden waren, belegt werden (Imaizumi et al. 1998, 2000). Dennoch wurden wiederholt Zweifel über das Remyelinisierungspotential von OECs geäußert (Plant et al. 2002; Takami et al. 2002).

Mit der Erkenntnis, wenn auch gegenwärtig kontrovers diskutiert, dass transplantierte OECs demyelinisierte Axone remyelinisieren können, erwuchs der Gedanke, OECs als mögliche Spenderzellen für remyelinisierende Transplantate einzusetzen.

### Oligodendrozyten

Wenn neue myelinbildende Zellen im adulten ZNS nicht generiert oder in ausreichender Menge rekrutiert werden können, führt das zum Versagen der endogenen Remyelinisierung und zu persistierenden neurologischen Ausfällen. Neben den Schwann-Zellen des PNS und OECs kommen vor allem Zellen der Oligodendrozytenlinie als potentielle Spenderquelle für remyelinisierende Transplantate in Betracht. Arbeiten vieler Gruppen haben gezeigt, dass Oligodendrozyten in allen Stadien ihrer Entwicklung nach Transplantation ins Nervensystem von

Versuchstieren mit Myelindefekten ein beachtliches Potential zum Wiederaufbau fehlender oder verloren gegangener Myelinscheiden haben. Transplantierte Oligodendrozytenvorläuferzellen aus ZNS-Fragmenten neugeborener Ratten waren in der Lage große Anteile von Gehirn und Rückenmark in myelindefizienten Tieren (*shiverer* Mäuse) zu myelinisieren (Gansmüller et al. 1986; Lachapelle et al. 1983). Spenderzellen wurden aus Gehirn- (Lachapelle 1983) oder Rückenmarksexplantaten (Hasewaga et al. 1991), gemischten Gliazellsuspensionen oder primären Zellkulturen von frisch homogenisiertem Gehirn oder Rückenmark (Duncan et al. 1988), Wachstumsfaktor-induzierten oder Onkogen-transformierten Oligodendrozyten-Zelllinien gewonnen (Barnett et al. 1993; Trotter et al. 1993). Oligodendrozytenvorläuferzellen besitzen dabei ein deutlich höheres Myelinisierungspotential als reifere Stadien (Warrington et al. 1993). Auch in einer Studie an *shaking pups* wurde gezeigt, dass fetale gliale Zellen über eine weitere Distanz migrierten und myelinisierten als eine ähnliche Zellpopulation, die aus neonatalen Tieren gewonnen wurde (Archer et al. 1997). Eine wachstumsfaktorabhängige Zelllinie von Oligodendrozytenvorläuferzellen der Ratte, so genannte CG4-Zellen, zeigten nach Transplantation in das Rückenmark neugeborener *md* Ratten eine Migrationskapazität von bis zu 12 mm entlang der Hinterstränge. Zwei Wochen nach Implantation konnte eine Myelinisierung zahlreicher Axone nachgewiesen werden (Tontsch et al. 1994). Arbeiten von Zhang et al. 1998 haben demonstriert, dass Zellen die aus primären Oligosphären gewonnen und in das Rückenmark von *md* Ratten eingebracht wurden ein größeres Volumen myelinisierten, als Zellen, die aus Neurosphären generiert wurden. Remyelinisierung konnte ebenso durch A2B5-positive Oligodendrozytenvorläuferzellen, die mittels FACS-Sorting aus fetalem und adultem humanen Hirngewebe gewonnen wurden, nach Transplantation in das Gehirn von *shiverer* Mäusen gezeigt werden. Paradoxerweise remyelinisierten die aus adultem Gewebe gewonnenen Vorläuferzellen *shiverer*-Axone stärker als die aus fetalem Hirngewebe gewonnenen Zellen (Windrem et al. 2004). Auch in chemisch induzierten Läsionen konnte Remyelinisierung nach Transplantation oligodendroglialer Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Groves et al. 1993; Franklin et al. 1997a). Im Gegensatz dazu zeigten die aus ZNS-Fragmenten neugeborener Ratten gewonnenen transplantierten Oligodendrozytenvorläuferzellen im normalen adulten Zentralnervensystem ein deutlich geringeres Überlebens- und Migrationspotential (O'Leary et al. 1997a). Ebenso haben Untersuchungen an einem EAE-Modell ergeben, dass entzündliche Reaktionen und Demyelinisierung im ZNS das Überleben und die Migration von transplantierten CG4-Zellen förderten (Barres et al. 1992a; Ben-Hur et al. 2003; Tourbah et al. 1997).

Die begrenzte Migrationskapazität selektierter myelinbildender Vorläuferzellen im Hirnparenchym nach lokaler Transplantation erfordert für die Therapie multifokaler Läsionen jedoch andere Strategien. Nach intravenöser oder intrathekaler Injektion multipotenter neuraler Vorläuferzellen in EAE-Mäuse konnte Migration, Differenzierung und Remyelinisierung nachgewiesen werden (Pluchino et al. 2003). Die Effizienz der Myelinreparatur nach Transplantation oligodendroglialer Vorläuferzellen in Tiermodelle hat starkes Interesse an einer Anwendung als therapeutische Strategie bei humanen Myelinerkrankungen geweckt. Für die Gewinnung glialer Vorläuferzellpopulationen aus embryonalem, neonatalem oder adultem Hirngewebe ist jedoch die Verwendung von Primärgewebe erforderlich. Die begrenzte Verfügbarkeit besonders humanen Spendergewebes, die oftmals begrenzte Vermehrbarkeit und ethische Bedenken stellen limitierende Faktoren für eine mögliche klinische Anwendung dar. Mit der Gewinnung glialer Vorläuferzellen aus embryonalen Stammzellen, die *in vitro* in nahezu unbegrenzter Menge vermehrt werden können, steht eine Spenderquelle zur Verfügung, mit der ein therapeutischer Einsatz möglich werden könnte.

#### ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen

Pluripotente ES-Zellen stellen eine attraktive Spenderquelle für neurale Transplantate dar. Proliferative neurale Vorläuferzellen konnten von embryonalen Stammzellen *in vitro* abgeleitet werden (Bain et al. 1995; Okabe et al. 1996). Nach Transplantation in die Ventrikel embryonaler Ratten besiedelten diese Vorläuferzellen das Empfängerhirn und bildeten Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten (Brüstle et al. 1997). Ein ernst zu nehmendes Risiko transplanteder ES-Zell-abgeleiteter Zellen ist die Tumorbildung. Es ist seit langem bekannt, dass sowohl mit Retinsäure behandelte ES-Zellen als auch ohne Zugabe von Retinsäure, nach dem Okabe-Protokoll hergestellte Zellen, nach Transplantation Teratome bilden können (Brüstle et al. 1997; Wernig et al. 2004). Die Herstellung reiner Zellpopulationen ist für den therapeutischen Einsatz deshalb unentbehrlich. Vor einiger Zeit gelang es, ES-Zell-abgeleitete Vorläuferzellen gezielt zu Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren (Billon et al. 2002; Brüstle et al. 1999a; Liu et al. 2000). Das *in vivo* Verhalten dieser Zellkultur-abgeleiteten Vorläuferzellen wurde in der *md* Ratte untersucht. Nach Transplantation ins Rückenmark eine Woche alter Empfängertiere bildeten die Spenderzellen zahlreiche Myelinscheiden sowohl an der Stelle der Implantation als auch entlang ihres Migrationsweges im umliegenden Gewebe (Brüstle et al. 1999a). In einer jüngsten Studie konnte Remyelinisierung nach Transplantation hoch aufgereinigter ES-Zell-



abgeleiteter glialer Vorläuferzellen in akute Läsionen im Rückenmark adulter Ratten nachgewiesen werden (Perez-Bouza et al. 2005). Durch Kombination von gerichteter Differenzierung und Lineage-Selektion genetisch manipulierter muriner ES-Zellen ist es gelungen, eine homogene Zellpopulation muriner oligodendroglialer Vorläuferzellen zu generieren. Die murinen ES-Zellen enthielten ein Neomycin-Resistenz-Gen unter Kontrolle des Maus-Oligodendrozyten-spezifischen CNP Promotors I und II (CNP- $\beta$ geo). Nach Transplantation dieser homogenen Zellpopulation ins Rückenmark postnataler *md* Ratten konnte die Ausreifung in myelinisierende Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Glaser et al. 2005). Die Gewinnung humaner Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen in einem hohen Reinheitsgrad aus genetisch nicht manipulierten humanen ES-Zellen und die Myelinisierung nach Transplantation in das Rückenmark von *shi* Mäusen konnte erst kürzlich nachgewiesen werden (Nistor et al. 2005). Diese Beobachtungen zeigen, dass transplantierte ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen in einem nicht-entzündlichen myelindefizienten Tiermodell in myelinisierende Oligodendrozyten und Astrozyten differenzieren können, was darauf hinweist, dass ES-Zell-abgeleitete neurale Vorläuferzellen als Spenderquelle für Zelltransplantate im ZNS dienen könnten.

#### **1.4 Zielsetzung**

Mit dieser Arbeit sollten Grundlagen für die Anwendung von ES-Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen zur Behandlung von Entmarkungskrankheiten erarbeitet werden. Eine zentrale Frage dabei war, ob ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen in der Lage sind, in akuten Demyelinisierungsherden mit inflammatorischen und reaktiven Veränderungen im adulten ZNS zu überleben und in myelinisierende Oligodendrozyten und Astrozyten auszureifen. Im ersten Schritt sollte die Induktion eines lokalisierten entzündlichen Entmarkungsherdes mit Hilfe stereotaktischer Injektion von anti-MOG-Antikörper und Komplement an umschriebener Stelle im Corpus Callosum adulter Wistar Ratten etabliert werden. Insbesondere sollten Bedingungen gefunden werden, die eine ausreichende Demyelinisierung bei minimalem axonalen Schaden erzeugen. Dabei sollte eine qualitative und quantitative Charakterisierung der Demyelinisierungsherde durchgeführt werden. Im zweiten Schritt sollten die aus murinen ES-Zellen gewonnenen glialen Vorläuferzellen in die akut induzierten Demyelinisierungsherde transplantiert werden. Danach sollte Überleben, Differenzierung und Myelinisierungspotential

untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Studie sollte eine Aussage darüber ermöglichen, ob ES-Zell-abgeleitete Oligodendrozyten prinzipiell für die Remyelinisierung entzündlicher Entmarkungsläsionen eingesetzt werden können.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Tierexperimente

#### 2.1.1 Tierstamm

Adulte Wistar Ratten

Hauseigene Zucht/Charles River®

#### 2.1.2 Narkose und Perfusion

Äther zur Narkose

Chinosol

Ethrane

Abbott

Ketanest®

Parke- Davis® GmbH Berlin

Paraformaldehyd

Sigma

Rompun 2%

Bayer

PBS

Biochrome AG

#### 2.1.3 Operationsinstrumentarium

##### Chirurgisches Instrumentarium

Stereotaktischer Rahmen

Stoelting

Rasierapparat

Braun

Skalpell

Feather

Feine Scheren

FST

Knochenbohrer

FST

Mathieu Nadelhalter

FST

Chirurgische Pinzette

FST

Atraumatische Pinzette

FST

Klemmen

FST

Nahtmaterial

Ethicon®

Sterile Kompressen

Hartmann

Spongostan®

Ferrosan

Operationsmikroskop	Zeiss
Handschuhe	Kimberly- Clark
Mundschutz	Hartmann

### Injektionsinstrumente

Glaskapillare GB 150 T 8/ (50 µm geflammte Öffnung)	Science Products GmbH
Spritze 10 µl	Hamilton
Polyethylenschlauch	INTRAMEDIC™

### Desinfektion

Cutasept®F	Bode Chemie Hamburg
Ethanol 70%	Merck (Ethanol 100%)

#### **2.1.4 Zu applizierende Chemikalien**

Monoklonaler anti-MOG-Antikörper (clone 8-18C5, 5 mg/ml)	zur Verfügung gestellt von C. Linington seinerzeit am Max- Planck Institut für Neurobiologie in Martinsried
Meerschweinchen-Komplement	Harlan Winkelmann GmbH
PBS	Biochrome AG
Ciclosporin A(Sandimmun®)	Novartis

## **2.2 Zellkultur**

### **2.2.1 ES-Zelllinie**

CJ7	Swiatek et al. 1993
-----	---------------------

### **2.2.2 Supplemente**

FGF2	R&D
------	-----

D (+) Glukose	Sigma
EDTA	Sigma
EGF	R&D
Fibronectin	Invitrogen/ life technologies
Insulin	Intergene
Laminin	Sigma
LIF	Chemicon
Mercaptoethanol	Sigma
Natrium-Selenit	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen/ life technologies
PDGF-AA	R&D
Polyornithin	Sigma
Progesteron	Sigma
Putrescin	Sigma
Pyruvat	Sigma
Transferrin	Intergene
Trypanblau	Sigma
Zell-Gefriermedium	Sigma

### **Fibronectin (Fn; 1 µg/µl)**

- 1 mg Fibronectin
- in 1 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -80°C lagern

### **Gelatine (0,1%)**

- 0,5 g Gelatine
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen, 20 min bei 120°C autoklavieren und bei +4°C lagern

### **Glutamin-Stammlösung**

- 1,46 g Glutamin
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -20°C lagern

**Insulin-Stammlösung**

- 1 g Insulin
- in 200 ml 10 mM NaOH lösen, aliquotieren und bei -80°C lagern

**Natrium-Selenit-Stammlösung (500 µM)**

- 0,0865 g Natrium-Selenit
- in 10 ml ddH<sub>2</sub>O lösen und bei -20°C lagern

**Polyornithin (PO; 1,5 mg/ml)**

- 100 mg PO
- in 67 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern (100x)

**Progesteron-Stammlösung (20 µM)**

- 0,032 g Progesteron
- in 50 ml Ethanol absolut lösen und bei -80°C lagern(100x)  
 → 30 µl auf 3 ml Ethanol absolut geben, aliquotieren und bei -80°C lagern

**Putrescin-Stammlösung (0,1 M)**

- 0,16 g Putrescin
- in 10 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, aliquotieren und bei -80°C lagern

**Transferrin-Stammlösung (10 mg/ml)**

- 1 g Transferrin
- in 100 ml ddH<sub>2</sub>O lösen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -80°C lagern

**2.2.3 Nukleoside**

Adenosin	Sigma
Cytosin	Sigma
Guanosin	Sigma
Thymidin	Sigma
Uridin	Sigma

### 2.2.3.1 Nukleosid-Stammlösung

- 40 mg Adenosin
- 36,5 mg Cytosin
- 42,5 mg Guanosin
- 12 mg Thymidin
- 36,5 mg Uridin

→ in 50 ml vorgewärmtem ddH<sub>2</sub>O lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern

### 2.2.4 Puffer

HANKS

Invitrogen/ life technologies

Hepes

Sigma

#### **HANKS 1x**

- 1,9 g Natrium-Bikarbonat

→ in 450 ml ddH<sub>2</sub>O + 50 ml 10x HBSS (Hanks balanced salt solution) lösen, pH auf 7,2 einstellen, steril filtrieren (0,2 µm),

und bei +4°C lagern

#### **HANKS 1x + Hepes**

- 1,9 g Natrium-Bikarbonat
- 1,9 g Hepes

→ in 450 ml ddH<sub>2</sub>O + 50 ml 10x HBSS lösen, pH auf 7,2 einstellen, steril filtrieren (0,2 µm),

und bei +4°C lagern

#### **HANKS/EDTA (0,04 %)**

- 200 mg EDTA

→ in 450 ml ddH<sub>2</sub>O + 50 ml 10x HBSS lösen, pH auf 7,2 einstellen, steril filtrieren (0,2 µm),

und bei +4°C lagern

**Hepespuffer (1 M)**

- 26 g Hepes Natrium Salz

→ mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 ml auffüllen, pH auf 7,4 einstellen und bei +4°C lagern

**2.2.5 Enzyme**

DNase

Cell Systems

Trypsin-EDTA

Invitrogen/ life technologies

**DNase I (1 %)**

- 100 mg DNase I

→ in 10 ml 1x HANKS lösen, steril filtrieren (0,2 µm), aliquotieren und bei -80°C lagern

**Trypsin/EDTA 1x (0,125%)**

- 1 ml 10x Trypsin/EDTA

→ in 9 ml 1x HANKS lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern

**Trypsin-Inhibitor (25 mg/ml)**

- 500 mg Trypsin-Inhibitor

→ in 20 ml PBS lösen und bei -20°C lagern (100x)

→ 1 ml 100x Trypsin-Inhibitor in 100 ml PBS geben, steril filtrieren (0,2 µm), bei -20°C lagern

**2.2.6 Zellkulturmedien**

DMEM/F12

Invitrogen/Life technologies

DMEM

Invitrogen/Life technologies

Fetales Kälberserum (FKS)

Biochrom Deutschland

**DMEM: (500 ml)**

- 2,25 g Glukose
- 0,06 g Pyruvat



→ in 18 ml DMEM lösen, steril filtrieren (0,2 µm), auf 500 ml mit DMEM auffüllen und bei +4°C lagern

**DMEM-ES: (500 ml)**

- 5 ml Nukleosid-Stammlösung
- 5 ml nicht essentielle Aminosäuren
- 13 ml 1M Hepespuffer
- 3,5 µl β-2-Mercaptoethanol

→ in 18 ml DMEM lösen, steril filtrieren (0,2 µm), auf 500 ml mit DMEM auffüllen und bei +4°C lagern

**DMEM + 10%FKS**

- 5 ml FKS

→ zu 45 ml DMEM dazugeben und bei +4°C lagern

**DMEM-ES-Prol: (50 ml)**

- 10 ml FKS
- 5 µl LIF

→ zu 40 ml DMEM-ES dazugeben und bei +4°C lagern

**DMEM-ES- Diff: (500 ml)**

- 55 ml FKS
- 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)

→ zu 500 ml DMEM-ES dazugeben und bei +4°C lagern

**DMSO-Einfriermedium 2x**

- 5 ml FKS
- 3,6 ml DMSO

→ in 22,8 ml DMEM-ES lösen, aliquotieren und bei -20°C lagern

**ITS:** (500 ml)

- DMEM/F12
- 500 µl der 5 mg/ml Insulin-Stammlösung
- 30 µl der 300 µM Na-Selenit-Stammlösung

→ in 18 ml DMEM/F12 lösen, steril filtrieren (0,2 µm), auf 500 ml mit DMEM/F12 auffüllen, 2,5 ml Transferrin-Stammlösung und 5 ml Pen/Strep dazugeben und bei +4°C lagern

**N3:** (500 ml)

- 500 ml DMEM/F12
- 2,5 ml Insulin-Stammlösung
- 30 µl Na-Selenit (500 µM)
- 500 µl Progesteron (20 µM)
- 500 µl Putrescin (0,1 M)

→ in 15 ml DMEM/F12 lösen, steril filtrieren (0,2 µm), auf 500 ml mit DMEM/F12 auffüllen, 2,5 ml Transferrin-Stammlösung und 5 ml Pen/Strep dazugeben und bei +4°C lagern

**N2:** (500 ml)

- 500 ml DMEM/F-12
- 36 mg Glutamin
- 0,77 g Glukose
- 2,5 ml Insulinstocklösung
- 30 µl Na-Selenit (500 µM)
- 500 µl Progesteron (20 µM)
- 500 µl Putrescin-Stammlösung (0,1 M)

→ in 15 ml DMEM/F12 lösen, steril filtrieren (0,2 µm), auf 500 ml mit DMEM/F12 auffüllen, 5 ml Transferrin-Stammlösung und 5 ml Pen/Strep dazu geben und bei +4°C lagern

**2.2.7 Verbrauchsmaterialien-Zellkultur**

Petrischalen

Nunc

Plastikröhrchen (Cellstar)

Greiner

Plastikpipetten	Falcon/ BD
Zellkulturschalen	Falcon/ BD
Zellsiebe	Falcon/ BD

### 2.2.8 *Geräte*

Bühler Schüttler	Johanna Otto GmbH
Heizblock UNITEK HB-130/E	Jepson Bolton & Co.
Hybridisierungsöfen OV3	Biometra
Inkubator	Heracell, Heraeus Instruments
Neubauer Zählkammer	Roth
pH-Meter CG840	Schott
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus Instruments
Waagen LA 310S, BL 610	Sartorius
Wärmeplatte OTS40	Medite
Wasserbäder 1008	GFL
Zentrifugen:	
• Megafuge 1.OR	Heraeus Instruments
• Eppendorf Zentrifuge 5415C	Eppendorf
• RC5B Plus	Sorvall, Heraeus Instruments

## 2.3 *Immunhistochemie/ in situ Hybridisierung*

### 2.3.1 *Primäre Antikörper*

MOG (monoklonal) Maus IgG	zur Verfügung gestellt von C. Linington
CNPase (monoklonal) Maus IgG	Sigma
GFAP (monoklonal) Maus IgG	ICN
GFAP (polyklonal) Kaninchen	Clontech
MBP (monoklonal) Maus IgG	Roche
Nestin (polyklonal) Kaninchen	zur Verfügung gestellt von McKay RD
NF 200 (polyklonal) Kaninchen	Sigma

O4 (monoklonal) Maus IgM Roche

### 2.3.2 *Sekundäre Antikörper und Fluoreszenzsubstrate*

AP-Schaf-anti-Digoxigenin Fab (IgG)	Enzo
Biotin-Ziege-anti-Kaninchen IgG	Dako (Hamburg)
Biotin-Ziege-anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Biotin-Ziege-anti-Maus IgG	Dako (Hamburg)
Biotin-Ziege-anti-Maus IgM	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Biotin-Ziege-anti-Ratte IgG	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
FITC-anti-Digoxigenin Fab Fragmente	Enzo
FITC-Avidin D	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
FITC-Ziege-anti-Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
FITC-Ziege-anti-Maus IgG	Dia Nova
HOECHST No 35228	Sigma
Peroxidase-Ziege-anti-Kaninchen IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Peroxidase-Ziege-anti-Maus IgG	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
Rhodamin-Schaf-anti-Digoxigenin Fab (IgG)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Rhodamin-Ziege-anti-Kaninchen IgG	ICN/Cappel
Rhodamin-Ziege-anti-Maus IgG	ICN/Cappel
Texas Red Avidin D	Vektor
Tyramid-Biotin (Peroxidase Substrat)	NEN
Tyramid-FITC (Peroxidase Substrat)	NEN

### 2.3.3 *Chemikalien Immunhistochemie und in situ Hybridisierung*

Amplifikationspuffer für Tyramid	Perkin Elmer Life Science
Deionisiertes Formamid	Ambion
Ethanol	Merck
Formamid	Merck
Natrium-Azid	Merck

Normal Goat Serum (NGS)	Sigma
PBS	Biochrome AG
Normal Rat Serum (NRS)	Sigma
Streptavidin Peroxidase	Dunn
Triton X-100	Sigma
Vectashield	Vector
Wasserstoffperoxid 30%	Merck

### ***2.3.4 Lösungen - Immunhistochemie***

#### **Antikörperverdünnungslösung (AKV) für primäre Antikörper**

- 1% NGS in PBS
- 0,1% Triton X-100 (optional)

#### **Antikörperverdünnungslösung für sekundäre Antikörper**

- 1% NGS in PBS
- 0,1% Triton (optional)

#### **Lösung für Fluoreszenzsubstrate**

- Hepespuffer
- 0,1% Triton (optional)

#### **Blocklösung**

- 5% NGS in PBS
- 0,1% Triton (optional)

#### **TNT-Puffer**

- 100 mM Tris-Cl,
- 150 mM NaCl,
- 0,3% Triton

### 2.3.5 *in situ* Hybridisierung

#### 2.3.5.1 Puffer und Lösungen

##### **Hybridisierungspuffer**

- 1 ml Salmon sperm DNA (250 µg/ml)
  - 3,8 ml 20xSSC
  - 24,7 ml Formamid
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 38 ml auffüllen und pH auf 7,0 einstellen

##### **Puffer I**

- 100 ml 0,5 M Tris pH 7,5
  - 15 ml 5 M NaCl
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen und 20 min bei 120°C autoklavieren

##### **SSC Puffer (20x)**

- 175,3 g NaCl
  - 88,2 g Natriumcitrat
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 1000 ml auffüllen, pH auf 7,0 einstellen und 20 min bei 120°C autoklavieren

##### **SSC Puffer (0,5x)**

- 1,25 ml 20xSSC
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

##### **SSC Puffer (2x)**

- 5 ml 20xSSC
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

**SSC Puffer (2x) + EDTA**

- 5 ml 20xSSC
  - 0,5 ml 0,5 M EDTA
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

**Blocklösung**

- 2% NGS in Puffer I
- 0,2% Triton

**Formamidlösung I**

- 5 ml 20x SSC (Standard Saline Citrate)
- 10 ml ddH<sub>2</sub>O
- 35 ml deionisiertes Formamid

**Formamidlösung II**

- 5 ml 20xSSC
  - 10 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 25 ml Formamid
- pH auf 7,0 einstellen

**Pronase-Lösung**

- 5 ml 20xSSC
  - 0,5 ml EDTA (0,5 M)
  - 100 µl Pronase
- mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen

**2.3.6 Verbrauchsmaterialien-Immunhistochemie**

Deckgläschen	Engelbrecht
Fixogum	Marabu
Multiwellkulturschalen (24 Well)	Labomedics
Nagellack	Loreal®

Objektträger vorgereinigt

Parafilm

Plastikpipetten

Gold Seal®

Pechiney Plastic Packaging

Falcon/ BD



## 3 METHODEN

### 3.1 ES-Zellkultur

#### 3.1.1 Differenzierungsprotokoll

In allen Experimenten wurden Zellen der Zelllinie CJ7 (Passagezahl 8 und 9) verwendet (Swiatek et al. 1993).

#### Auftauen von mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten

*Für die Aufrechterhaltung des pluripotenten Stadiums der CJ7 ES-Zellen ist die Kokultur mit durch Bestrahlung mitotisch inaktivierten embryonalen Maus-Fibroblasten ( $\gamma$ EFs), so genannten „feeder cells“, notwendig.*

Im 37°C warmen Wasserbad wurde ein Kryoröhrchen mit  $\gamma$ EFs zwei Tage vor den ES-Zellen zügig aufgetaut und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 6 ml Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/10% FKS überführt. Das Kryoröhrchen wurde mit 1 ml DMEM/10% FKS Medium gespült und die Suspension ebenfalls in das Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden dann bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 6 ml DMEM/10% FKS resuspendiert. Je 3 ml dieser Suspension sind in eine 6 cm Schale überführt worden. Alle Zellen inkubierten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank.

#### Auftauen von ES-Zellen

Ein Kryoröhrchen mit ES-Zellen wurde im 37°C warmen Wasserbad zügig aufgetaut und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit 6 ml DMEM-ES-Prol überführt. Das Kryoröhrchen wurde mit 1 ml Medium gespült und die Suspension ebenfalls in das Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (1000 rpm, 5 min), der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 6 ml DMEM-ES resuspendiert und auf zwei 6 cm Schalen mit einer konfluenten Schicht  $\gamma$ EFs verteilt.

### Passage auf Gelatine

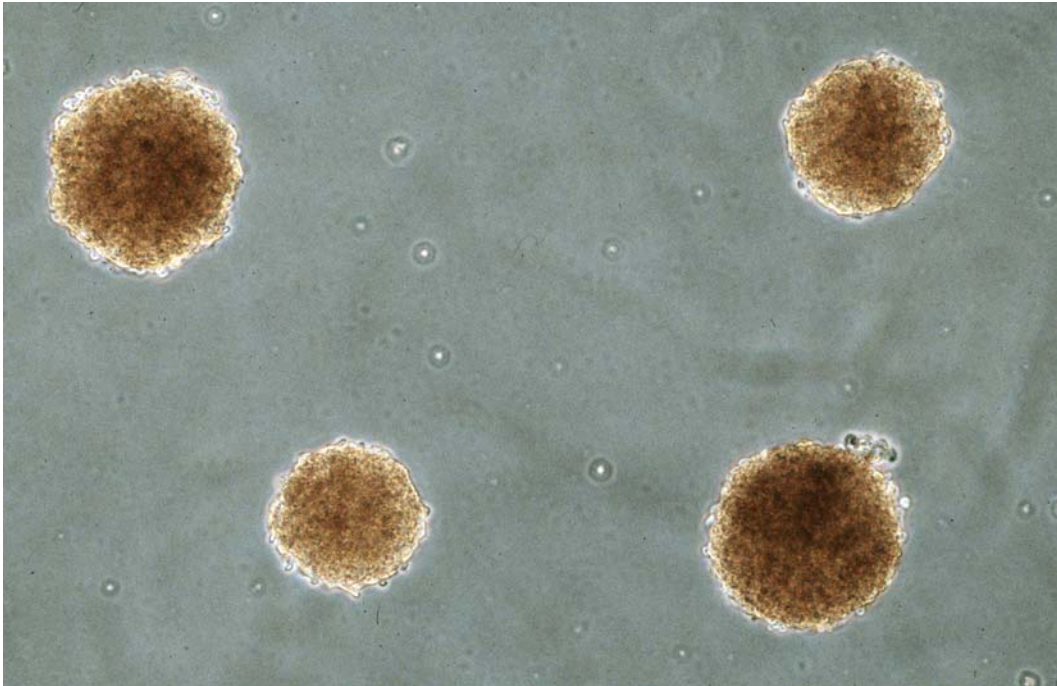
*Um die „feeder cells“ aus der Kultur zu entfernen, werden die Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte 2-3 Tage nach dem Auftauen auf Gelatine-beschichtete Zellkulturschalen überführt.*

Zunächst wurden 6 cm Zellkulturschalen für 20 min bei Raumtemperatur (RT) mit 0,1% Gelatine inkubiert. Die ES-Zellkulturen wurden mit HANKS/EDTA gespült (3x) und trypsinisiert. Sobald sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale ablösten, wurden sie mit einer geflämten Pasteurpipette vereinzelt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen mit DMEM/10% FKS überführt. Es erfolgte eine Probeentnahme und die Bestimmung der Zellzahl unter Verwendung von Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 rpm, 5 min), je 2,5 Millionen (Mio.) Zellen wurden in 3 ml DMEM-ES-Prol resuspendiert und auf einer mit Gelatine beschichteten 6 cm Schale plattiert.

### Erzeugung von Embryoidkörpern

*Die Differenzierung der ES-Zellen wird durch den Entzug von LIF und die Bildung von Embryoidkörpern (EBs) induziert. EBs sind durch Aggregation von ES-Zellen entstandene Sphäroide (Abb. 5), in denen die Zellen spontan in Derivate aller drei Keimblätter differenzieren. Die Differenzierung ist ungerichtet.*

Nach zwei Tagen Passage auf Gelatine wurden aus den ES-Zellen EBs gebildet. Es wurden pro ES-Zellschale jeweils 3 ml DMEM-ES-Diff in zunächst acht unbeschichtete 6 cm Bakterenschalen (Nunc) vorgelegt. Die ES-Zellen wurden mit HANKS/EDTA gespült (3x) und mit 1,5 ml Trypsin/EDTA von der Schale gelöst. Zur Bildung der EBs durften die Zellen nicht vereinzelt werden, sondern sie mussten als Zellaggregate von der Schale gespült werden. Dazu wurden 6,5 ml DMEM-ES-Diff in eine 10 ml Pipette aufgenommen, die Zellen in einem Fluss abgespült, das Medium vorsichtig wieder aufgenommen und je 1 ml auf die acht Schalen verteilt. Um tote Zellen zu entfernen, erfolgte am folgenden Tag ein Mediumwechsel. Dazu wurden die EBs mit einer 10 ml Pipette in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, zur Sedimentation gebracht, das Medium bis auf 5 ml abgesaugt und 27 ml frisches DMEM-ES-Diff hinzugefügt. Die EBs wurden vorsichtig resuspendiert und je 4 ml in die Petrischalen zurückgegeben.



**Abb. 5: Embryoidkörper in Zellkultur**

Abgebildet sind vier freischwimmende multizelluläre Aggregate, so genannte Embryoidkörper. Lichtmikroskopische Aufnahme.

#### Plattieren der Embryoidkörper und Transfer in ITSFn-Medium

*Durch Plattieren der EBs können Zellen aus den Zellaggregaten auswandern. Es befinden sich bereits neurale Vorläuferzellen unter den Zellen. Durch die Verwendung eines speziellen serumfreien Mediums wird das Überleben der neuralen Vorläuferzellen gefördert und das Wachstum anderer Zelltypen inhibiert. Dadurch erreicht man eine Selektion neuraler Vorläuferzellen.*

Drei Tage alte EBs wurden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen, zur Sedimentation gebracht und der Überstand bis auf 5 ml abgesaugt. Vorsichtig erfolgte eine Resuspension der EBs in DMEM-ES-Diff. EBs aus acht Schalen wurden auf zwei 10 cm Zellkulturschalen gleichmäßig verteilt. Um das Serum zu entfernen, erfolgte am folgenden Tag eine Spülung der plattierten Zellen mit HANKS (3x). Die Selektion neuraler Zellen wurde durch die Überführung der Zellen in ITSFn-Medium gestartet. Alle zwei Tage erfolgte auf Grund des starken Zelltodes ein Mediumwechsel.

### Transfer in N3FL-Medium

*Die neurale Zellpopulation soll in diesem Stadium zur Proliferation angeregt werden. Dazu werden die Zellen in N3-Medium überführt und in Anwesenheit von fibroblast growth factor (FGF2) weiter kultiviert.*

Zwei Stunden vor dem Transfer wurden 10 cm Zellkulturschalen mit Polyornithin (PO) beschichtet und kurz vor Gebrauch mit HANKS gewaschen (3x). Die vier Tage in ITSFn propagierten Zellen wurden ebenfalls dreimal mit HANKS gewaschen, mit 3 ml Trypsin/EDTA enzymatisch von der Schale abgelöst und das Trypsin mit 5 ml DMEM + 10% FKS neutralisiert. Nach Spülung der Schale wurden die in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführten Zellen zentrifugiert (1000 rpm, 5 min), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 3 ml einer 0,1%igen DNase-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und vorsichtig nacheinander durch drei geflämmte Pasteurpipetten, deren Öffnungen graduell verkleinert waren, zu einer Einzelzellsuspension trituriert. Eine Kontrolle des Vereinzlungsprozesses erfolgte unter dem Mikroskop. Die Zellsuspension wurde dann durch ein 40 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und das Sieb mit 7 ml HANKS gespült. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden nun zentrifugiert (1000 rpm, 7 min) und nach Absaugen des Überstandes in N3-Medium resuspendiert. Pro PO-beschichtete 10 cm Schale wurden 4 Mio. Zellen plattiert und die Faktoren FGF2 (10 ng/ml) und Laminin (1 ng/ml) anschließend zugegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag, nachfolgend alle zwei Tage. FGF2 wurde jeden Tag hinzugegeben.

### Transfer in N3EFL-Medium

*Durch Überführung in ein FGF2/epidermal growth factor (EGF)-haltiges Medium können aus den panneuralen Vorläuferzellen gliale Vorläufer angereichert werden.*

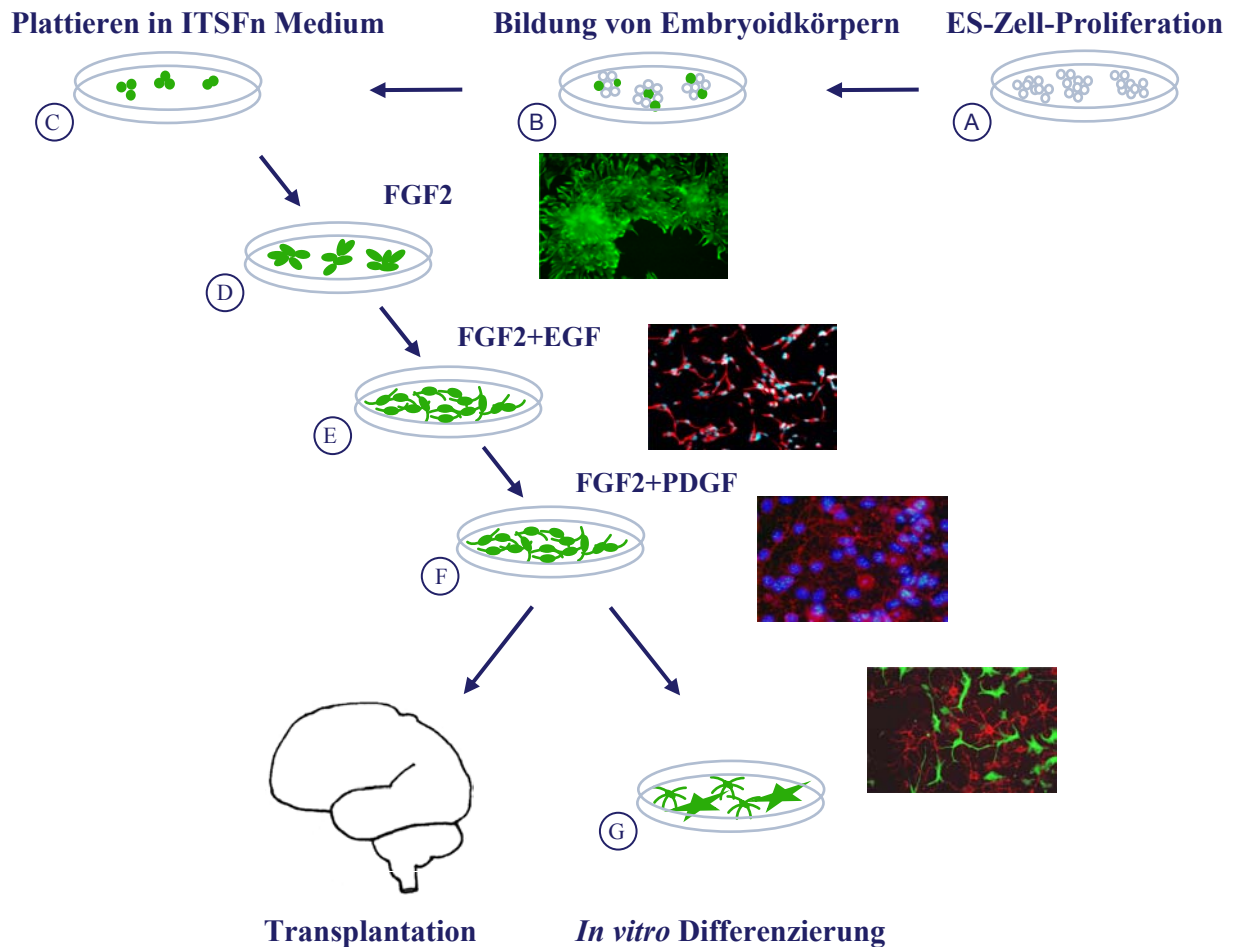
Vier Tage nach Proliferation in N3FL-Medium wurden 80-90% konfluente Kulturen mit HANKS gewaschen (3x) und mit 3 ml 0,1%iger DNase/HANKS-Lösung versehen. Mittels Zellschaber wurden die Zellen mechanisch von der Schale gelöst und mit einer geflämmten Pasteurpipette vereinzelt. Nach Filtration durch ein Zellsieb und Spülung mit 7 ml HANKS wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1000 rpm, 7 min), das Pellet in N3-Medium resuspendiert und nach FGF2-(10 ng/ml), EGF-(20 ng/ml) und Lamininzugabe (1 ng/ml) auf eine PO-beschichtete

Schale replattiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage, die FGF2- und EGF-Zugabe täglich.

#### Transfer in N2FP-Medium

*Der Transfer in N2-Medium, das die Wachstumsfaktoren FGF2 und platelet derived growth factor (PDGF) enthält, erfolgt nach ca. zwei Wochen Kultivierung in N3EFL-Medium. Dieses Stadium dient der Anreicherung oligodendroglialer Vorläuferzellen (Brüstle et al. 1999a).*

Die Zellen im N3EFL-Medium wurden 1:3 passagiert und neu ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Konvertierung in N2FP-Medium. Die Zellen wurden mit HANKS gewaschen (3x) und in N2-Medium überführt. Täglich wurden die Wachstumsfaktoren FGF2 und PDGF (je 10 ng/ml) hinzugefügt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Waren die Zellen subkonfluent bis konfluent, wurden sie 1:2 passagiert. Dazu wurden auch hier die Zellen mit HANKS gewaschen (3x) und 3 ml einer 0,1%igen DNase Lösung hinzugefügt. Mittels eines Zellschabers wurden die Zellen mechanisch von der Schale gelöst und mit einer geflämten Pasteurpipette vereinzelt. Die Zellsuspension ging durch ein Zellsieb, wurde mit 7 ml HANKS gespült und zentrifugiert (1000 rpm, 7 min). Das Pellet wurde in N2-Medium resuspendiert und unter Zugabe von FGF2 und PDGF (je 10 ng/ml) auf PO-beschichtete Schalen plattiert. Die *in vitro* Differenzierung zu reifen glialen Zellen wurde durch Wachstumsfaktorentzug eingeleitet. Eine schematische Darstellung der gezielten Differenzierung von murinen ES-Zellen (mES-Zellen) in multipotente neurale und nachfolgend gliale Vorläuferzellen ist in Abb. 6 zusammengefasst.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der Differenzierung von mES-Zellen in multipotente neurale Vorläuferzellen und anschließender Konversion in gliale Vorläuferzellen.**

(A) Initiale Proliferationsphase von mES-Zellen auf einem Rasen mitotisch inaktivierter muriner Fibroblasten. (B) Generierung von EBs durch Aggregation undifferenzierter mES-Zellen. (C) Selektion von neuronalen Vorläufern durch Plattieren der EBs in serumfreiem Medium. (D) Proliferation von Nestin-exprimierenden multipotenten neuronalen Vorläuferzellen (ESNPs) in FGF2-haltigem Medium. Nach dem Entzug von FGF2 differenzieren die Zellen in postmitotische Neurone und Gliazellen. Eine weitere Vermehrung von ESNPs unter Zugabe von FGF2 und EGF (E; anti-Nestin-Immunfluoreszenz) und nachfolgend mit FGF2 und PDGF-AA (F; anti-A2B5-Immunfluoreszenz), führt zur Anreicherung oligodendroglialer Vorläuferzellen. (G) Nach Wachstumsfaktorentzug reifen die glialen Vorläuferzellen in GFAP-positive Astrozyten (grün) und O4-positive Oligodendrozyten (rot) aus.

*Abb. zur Verfügung gestellt von Dr. rer. nat. T. Schmand aus dem Institut für Rekonstruktive Neurobiologie Bonn.*

### **3.1.2 Immuncytochemische Darstellung der Zellen in vitro**

Zur Bestimmung des Differenzierungspotentials der transplantierten Zellen wurden die fixierten Zellen immuncytochemisch auf die Expression des oligodendrozytenspezifischen O4-Antigens sowie des astrozytenspezifischen Intermediärfilaments GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), (Bignami et al. 1972) untersucht. Zellkerne wurden mit dem Kernfarbstoff HOECHST gefärbt.

Nach Einwirkung der Blocklösung ohne Triton erfolgte schrittweise die Inkubation der Zellen mit dem monoklonalen Primäantikörper gegen O4 (Maus IgM, 1:10), einem sekundären biotinylierten Antikörper (Ziege-anti-Maus IgM, 1:100) und Avidin-Texas Red (1:125 in Hepespuffer). Nach Postfixierung der gefärbten Zellen in 4 % PFA (5 min) und Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit tritonhaltiger Blocklösung wurden die Zellen mit dem polyklonalen Primäantikörper gegen GFAP (Kaninchen-anti-Maus IgG, 1:100) in tritonhaltiger Antikörperverdünnungslösung inkubiert und mit einem sekundären FITC-konjugierten Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG, 1:100) dargestellt. Im Anschluss erfolgte über 10 min eine Kernfärbung mit dem HOECHST-Farbstoff (1:500 in NaHCO<sub>3</sub>). Schließlich wurden die Zellen in Vectashield eingedeckelt. Die Inkubationszeit der Antikörper betrug jeweils 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT). Blocklösungen wirkten über 15 min bei RT ein. Zwischen jedem Teilschritt erfolgten dreimalige Waschungen mit PBS für je 5 min.

### **3.1.3 Präparation der Zellen zur Transplantation**

Zellen für die Transplantation waren mindestens sieben Tage unter N2FP-Bedingungen propagiert worden. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Subkonfluente Zellpopulationen wurden mit HANKS gewaschen (3x), durch 0,1%ige DNase in HANKS und Schaben von der Zellkulturschale gelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Nach dem Zentrifugieren (bei +4°C, 1000 rpm, 7 min) wurde der Überstand abgenommen und es erfolgte eine Resuspension der Zellen in 10 ml HANKS. Eine Zellprobe diente der Bestimmung von Zellzahl und der Vitalität. Waren Zellen in ausreichender Anzahl vorhanden, konnte ein Teil zum Plattieren entnommen werden. Erneut wurden die Zellen in einem 15 ml Röhrchen zentrifugiert (bei +4°C, 1000 rpm, 7 min) und der Überstand wurde verworfen. Nach Resuspension der Zellen in 400 µl HANKS und Überführung in ein PCR-Röhrchen erfolgte eine

dritte Zentrifugation der Zellen (bei +4°C, 1000 rpm, 7 min). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet in HANKS aufgelöst, so dass die Konzentration der Zellen 75 000 pro µl betrug. Bis zur der Transplantation lagerte die Zellpräparation auf Eis.

Zur Untersuchung der Differenzierungseffizienz wurde der zum Plattieren entnommene Teil der Zellen für vier Tage unter Wachstumsfaktorentzug propagiert, danach mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und immunhistochemischen Färbungen mit Antikörpern gegen O4 und GFAP zugeführt.

### 3.2 Demyelinisierung

In einer ausgedehnten Versuchsreihe wurden die optimalen Bedingungen etabliert, die eine spezifische, lokal umschriebene inflammatorische Demyelinisierung bei gleichzeitigem maximalen Axonerhalt durch Injektion des anti-MOG/Komplement-Gemisches im Corpus Callosum ermöglichten. Dabei wurden folgende Parameter variiert (Tab. 1).

	PARAMETER	VARIATION
A	stereotaktische Koordinaten vom Bregma nach posterior: nach lateral: von der Dura mater nach ventral:	(je 0,1 mm Schritte) 0,2 mm - 0,5 mm 2,0 mm - 2,5 mm 2,2 mm - 2,5 mm
B	injiziertes Volumen	1 µl - 3 µl
C	Verdünnung anti-MOG-Antikörper/ Meerschweinchen Komplement Stammlösung (Meerschweinchen Komplement/0,1 M PBS 1:3))	1:2 1:20 1:50 1:100
D	Beschaffenheit der Glaskapillare Definierte Öffnung von 50 µm	gebrochen mit scharfkantigem Rand oder geflamte abgerundete Öffnung
E	Zeitdauer der Injektion der Substanz	3 - 17 min

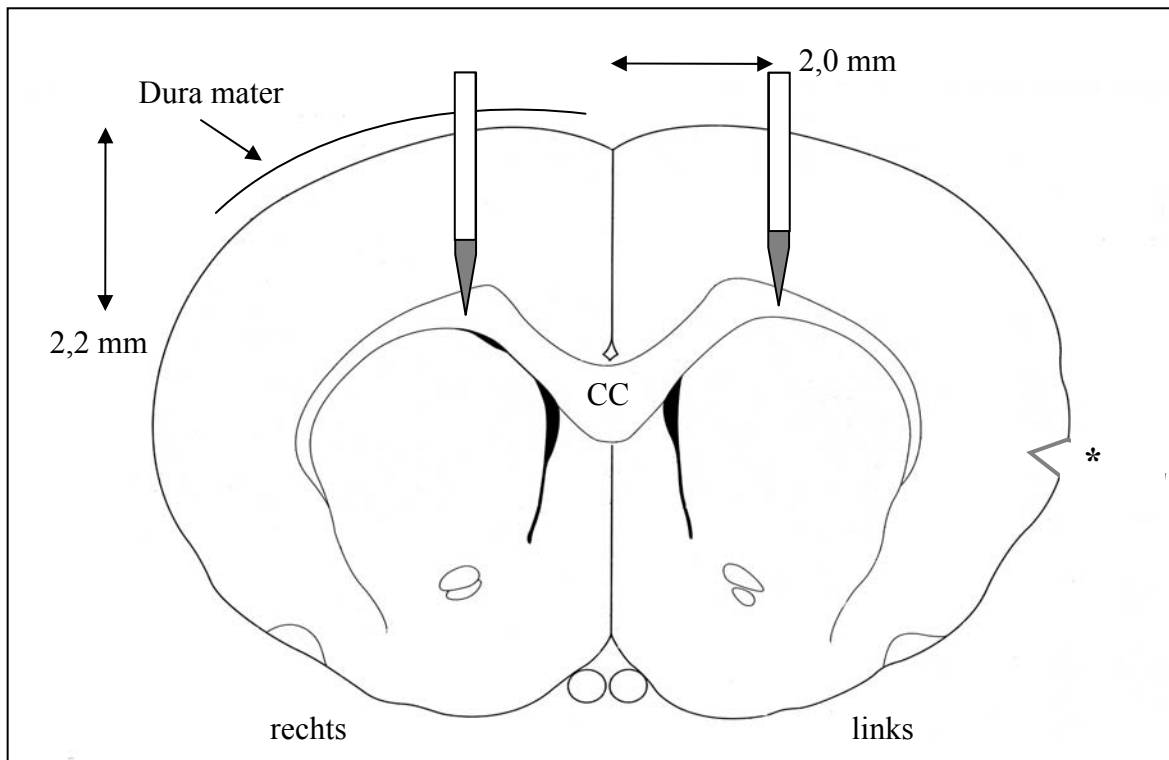
Tab. 1: Variation der Parameter für die Induktion der Demyelinisierung



Das Instrumentarium wurde vorher stets bei 180°C für 30 min autoklaviert und anschließend im Heizschrank getrocknet.

Die Versuche erfolgten an adulten weiblichen Wistar Ratten (Nullipara) mit einem Gewicht zwischen 265 g und 330 g (Charles River®). Alle Tierexperimente wurden nach Genehmigung des Tierversuchsantrages mit der Nummer: 23.203.2-BN 59, 24/00, gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes, durchgeführt.

Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 80 mg/kg/KG Ketanest und 20 mg/kg/KG Rompun2% in tiefe Narkose versetzt. Die Überprüfung der adäquaten Narkosetiefe erfolgte anhand der Auslösbarkeit des Fluchtreflexes nach Induktion eines Schmerzreizes an der Fußsohle. Danach wurde das Operationsgebiet elektrisch rasiert und die Ratte im stereotaktischen Rahmen positioniert. Das Operationsgebiet wurde desinfiziert und Bepanthensalbe zum Schutz vor Austrocknung auf die Augen aufgetragen. Mit einem Skalpell erfolgte die Inzision der Kopfhaut in der Mittellinie. Die darunter liegende Faszie und das Perikranium wurden mit einem Skalpell und einer feinen Pinzette freipräpariert. Bregma und Lambda dienten als Orientierungspunkte. Die Position des Schädels wurde adjustiert, so dass sich Bregma und Lambda auf gleicher horizontaler Ebene befanden. Nach Bestimmung der Koordinaten für die Applikation der Lösung (anti-MOG/Komplement-Gemisch oder PBS), ausgehend vom Bregma 0,2 mm nach posterior, 2,0 mm nach lateral, wurde mittels eines Feinbohrers der Schädel trepaniert und die Dura mater dargestellt. Die Lösung wurde in eine mit 70%igem Ethanol desinfizierte und anschließend mit HANKS gespülte Glaskapillare geladen. Diese besaß eine definierte Öffnung von 50 µm, welche zusätzlich durch Abflämmen abgerundet worden war. Über einen Polyethylenschlauch war die Kapillare mit einer 10 µl Hamilton Spritze verbunden. Die Glaskapillare wurde nun an der dafür vorgesehenen Halterung am stereotaktischen Rahmen befestigt, an die Injektionskoordinaten gebracht und die Höhe der Dura mater als Nullpunkt der Z-Koordinate eingestellt. Die Eröffnung der Dura mater erfolgte mit Hilfe einer Injektionskanüle kleinen Kalibers. Die Glaskapillare wurde langsam bis zum Zielpunkt, 2,2 mm unterhalb der Dura mater, vorgeschoben (Abb. 7).



**Abb. 7: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung**

CC - Corpus Callosum, ↔ zeigt die laterale Position der Injektionskapillare, ausgehend vom Bregma an, ↑ zeigt die Bestimmung des Zielpunktes in der z- Achse, ausgehend vom Niveau der Dura mater. \* Post mortem eingebrachter keilförmiger Einschnitt auf der linken Seite zur Zuordnung der Hemisphären.

Die Injektion von 1 µl des anti-MOG/Komplement-Gemisches oder 1 µl PBS (Kontrollgruppe) erfolgte über einen Zeitraum von 6 bis 13 min. Die Kapillare verblieb 3 min in Position und wurde anschließend kontinuierlich über 3 min zurückgezogen. In gleicher Weise wurde der Vorgang auf der kontralateralen Seite wiederholt. Stets begann die Applikation in der linken Hemisphäre. Das Operationsgebiet wurde nun mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung gereinigt und die Trepanationskrater mit resorbierbarem Spongostan<sup>®</sup> abgedeckt. Danach erfolgte der Verschluss der Kopfschwarte mit einer durchgehenden Naht und abschließend eine Desinfektion der Naht mit Betaisodona Lösung.

### **3.3 Transplantation ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen in den anti-MOG/Komplement-induzierten Entmarkungsherd**

Für die Versuche wurden adulte weibliche Wistar Ratten (Nullipara mit einem Gewicht zwischen 245 g und 330 g aus institutseigener Zucht) verwendet. Zwei Tage nach bilateraler Induktion eines anti-MOG/Komplement-induzierten Demyelinisierungsherdes erfolgte die Deposition von 75 000 Zellen (1  $\mu$ l) an der Läsionsstelle. Nicht demyelinisierte, mit PBS injizierte Kontrolltiere, erhielten ebenfalls 75 000 Zellen (1  $\mu$ l).

Die Vorgehensweise zur Transplantation der Zellen war annähernd identisch mit der Induktion des lokalisierten Entmarkungsherdes (3.2). Anstelle des anti-MOG/Komplement-Gemisches oder alternativ der PBS-Lösung wurde nun die Zellsuspension appliziert. Die Injektion der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 9 bis 17 min. Die Kapillare verblieb anschließend ebenfalls 3 min in Position und wurde danach kontinuierlich über 3 min zurückgezogen. Die Applikation erfolgte auch hier zuerst in die linke Hemisphäre. Beginnend am Tag der Zelltransplantation wurde allen Tieren täglich Ciclosporin (10 mg/ kg) intraperitoneal appliziert.

### **3.4 Histopathologische Analyse**

#### ***3.4.1 Gewebeaufarbeitung für die Analyse des Demyelinisierungsherdes und der transplantierten Zellen***

In tiefer Inhalationsnarkose wurden die Tiere zwei, fünf, neun, 16 und 30 Tage nach Induktion der Demyelinisierung, (entsprechend drei, sieben, 14 und 28 Tage nach Transplantation der Zellen), mit 4%igem PFA perfusionsfixiert.

Das Gehirn wurde entnommen und in 4% PFA bei +4°C auf dem Schüttler über 24 Stunden postfixiert. Anschließend wurden an einem Vibratom 40  $\mu$ m Schnitte angefertigt, diese in PBS mit 0,1% Natriumazid auf 24-well-Kulturschalen verteilt oder für histopathologische Analysen auf polylysinbeschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet.

### 3.4.2 *Immunhistochemie der Gewebeschnitte des Demyelinisierungsherd*

Zur Charakterisierung des Demyelinisierungsherd wurden immunhistochemische Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen das basische Myelinprotein (MBP, Maus IgG, 1:500) und Neurofilament (NF200, Kaninchen IgG, 1:200) durchgeführt. Die Färbungen erfolgten an frei schwimmenden Schnitten in 24-well-Kulturschalen. Zunächst wurden die Schnitte 15 min mit einer Blocklösung versehen und anschließend mit dem Primärantikörper gegen MBP über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus IgG, 1:200) zwei Stunden bei RT inkubiert und anschließend das MBP-Signal mit FITC-Avidin (1:125 in Hespuffer) dargestellt. Nach erneuter Einwirkung einer Blocklösung für 15 min wurden die Schnitte mit dem zweiten Primärantikörper gegen NF200 über Nacht inkubiert und dieser am folgenden Tag mit einem Rhodamin-konjugierten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG, 1:100) sichtbar gemacht (1 Stunde). Zwischen jedem Teilschritt erfolgten stets dreimalige Waschungen mit PBS für je 5 min. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, mit Vectashield und einem Deckglas eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

### 3.4.3 *Immunhistochemie der transplantierten Präparate*

Die Charakterisierung der transplantierten Zellen erfolgte durch Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen 2', 3'-zyklische-Nukleotid-3'-Phosphodiesterase (CNP) und GFAP und *in situ* Hybridisierung mit einer Maus-spezifischen Sonde. Eine zusätzliche Darstellung der Zellkerne erfolgte mit HOECHST-Farbstoff (1:500 in NaHCO<sub>3</sub>). Zum Teil werden Antigene durch den Verdauungsschritt bei der *in situ* Hybridisierung zerstört oder teilweise beschädigt und sollten daher vor der *in situ* Hybridisierung markiert werden. Dies erfolgte durch das TSA<sup>TM</sup> Plus Fluoreszenz System (Tyramid Signal Amplifikation). Dieses System benötigte die Anwesenheit einer Peroxidase. Die Schnitte wurden zuerst mit dem primären Antikörper (CNP, GFAP), dann mit dem sekundären Antikörper, nachfolgend mit Streptavidin-Peroxidase und anschließend mit Tyramid inkubiert. Die Enzymaktivität der Peroxidase ermöglichte die Spaltung des Substrates Tyramid, was zur Ablagerung von unlöslichen, fluoreszierenden Derivaten führte.

### Tyramidprotokoll

Frei schwimmende Schnitte wurden zunächst 30 min in einer Peroxidase-Lösung (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS) inkubiert und danach gründlich dreimal mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden 15 min geblockt, und es erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen CNP oder GFAP (monoklonal) in AKV über Nacht bei RT auf dem Schüttler. Am folgenden Tag wurde vorab der biotinylierte Sekundärantikörper in AKV mit 5% Rattenserum für 10 min präinkubiert. Die Schnitte wurden nach dreimaliger Waschung in PBS mit 0,1% Triton nun mit dem präinkubierten sekundären Antikörper zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach drei Waschungen in PBS mit 0,1% Triton wurden die Schnitte mit Streptavidin-Peroxidase für zwei Stunden inkubiert. Jetzt folgten drei Waschungen mit TNT-Puffer und im Anschluss die Inkubation mit Tyramid-Biotin (1:50 in Amplifizierungspuffer mit 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) über 10 min. Nach weiteren drei Waschungen mit TNT-Puffer wurden die Schnitte dem *in situ* Hybridisierungs-Protokoll zugeführt (3.4.4). Nach dem Abschluss der *in situ* Hybridisierung erfolgte die Darstellung der Antikörper mit Avidin Texas Red bzw. Avidin-FITC (1:125, in Hepes-Puffer) über zwei Stunden. Danach wurden die Zellkerne mit HOECHST-Farbstoff (1:500 in NaHCO<sub>3</sub>) gefärbt, die Schnitte anschließend mit Vectashield und einem Deckgläschen eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

### Anti-CNP/GFAP-Doppelmarkierung post *in situ* Hybridisierung

Die bereits auf Objektträger aufgezogenen *in situ* hybridisierten Präparate wurden nach 15 min Einwirkzeit der Blocklösung mit dem Primärantikörper gegen CNP oder GFAP (polykonal) über Nacht bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (CNP: anti-Maus IgG; GFAP: anti-Kaninchen IgG, jeweils 1:200) für zwei Stunden inkubiert und die Signale mit Avidin Texas Red (1:125 in Hepespuffer) dargestellt (1 Stunde). Zwischen jedem Teilschritt erfolgten stets dreimalige Waschungen mit PBS für je 5 min. Die Schnitte wurden nun mit Vectashield und einem Deckgläschen eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

#### **3.4.4 DNA *in situ* Hybridisierung der transplantierten Präparate**

Da es sich bei den transplantierten Zellen um Maus-Zellen handelte, die in Rattengewebe transplantiert wurden, konnten die Spenderzellen durch Fluoreszenz DNA *in situ* Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten mausspezifischen Sonde identifiziert werden (Brüstle et al.

1995). Diese Sonde erkennt hoch repetitive Tandem-Sequenzen, die im zentromerischen Heterochromatin lokalisiert sind (Hörz et al. 1981).

Zu hybridisierende Schnitte wurden auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgezogen und bei RT getrocknet. Als Positivkontrolle für die Hybridisierungserfolge wurde ein Mausgehirnschnitt mitgeführt. Alle aufgezogenen Schnitte wurden in eine Küvette mit 50 ml 2xSSC und EDTA gegeben auf dem Schüttler inkubiert (5 min bei RT). Als nächstes wurden die Schnitte in die Pronase-Lösung überführt, 30 min bei 37°C im Wasserbad verdaut und anschließend bei RT in 2xSSC auf dem Schüttler gewaschen (3x). Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) jeweils 4 min bei RT auf dem Schüttler dehydriert. Nach Lufttrocknung wurden die Schnitte für 12 min in Formamidlösung I bei 90°C in einer Küvette im Wasserbad denaturiert und in einer aufsteigenden eisgekühlten Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 100%) noch einmal dehydriert. Die Schnitte wurden sofort auf eine 37°C warme Heizplatte überführt, der Ethylalkohol abgesaugt und 40 µl Hybridisierungslösung pro Objektträger aufgetragen. Die Präparate wurden mit einem Deckgläschen versehen und mit Fixogum versiegelt. Nach erneuter Denaturierung der DNA durch Überführung der Schnitte auf eine 90°C warme Wärmeplatte für 3 min wurden sie in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht hybridisiert. Am nächsten Tag folgte eine zweimalige Inkubation für jeweils 10 min in Formamidlösung II, eine 15-minütige Waschung mit 0,5xSSC bei 37°C im Wasserbad und eine Waschung (5 min) bei RT mit Puffer I. Die Schnitte wurden danach 15 min in der Blocklösung inkubiert. Der FITC- oder Rhodamin-konjugierte anti-Dig-Antikörper wurde (1:500 in AKV), auf die Schnitte gegeben, mit einem Deckgläschen versehen und über Nacht bei RT inkubiert. Nach Waschungen in Puffer I (je 15 min) wurden die Schnitte mit Vectashield und einem Deckgläschen eingedeckelt oder weiteren immunhistochemischen Färbungen unterzogen.

#### **3.4.5 Histologische Färbung (HE-Färbung)**

Auf Objektträger aufgezogene und getrocknete Schnitte wurden in einer auf- und absteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 90%, 100%, 100%, 90%, 70%, 50%) je eine Minute entfettet, kurz in destilliertes Wasser und danach für 20 Sekunden in Mayers-Hämalaun getaucht. Nachfolgend wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser „gebläut“, anschließend 10 Sekunden in 1%igem Eosin gegengefärbt und nach Tauchen in einer aufsteigenden Alkoholreihe, Isopropanol und Xylol eingedeckelt.

### 3.4.6 *Qualitative Analyse der Zellen im Gewebeschnitt nach Transplantation*

Nach Identifikation der Spenderzellen durch Fluoreszenz DNA *in situ* Hybridisierung erfolgte die Charakterisierung dieser Zellen durch immunhistochemische Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen CNP oder GFAP. Zum Teil erfolgte eine zusätzliche Darstellung der Zellkerne mit HOECHST-Farbstoff. Die mikroskopische Analyse wurde mit Hilfe des digitalen Bildverarbeitungssystems (KS300) an einem Zeiss Axioskop Mikroskop, detaillierte Analysen einzelner Zellen an einem konfokalen Zeiss-Laserscannmikroskop (LSM-510) durchgeführt.

## 3.5 Quantifizierung und Statistische Analyse

### 3.5.1 *Quantifizierung der Ausdehnung der Demyelinisierung*

Die Versuchsgruppe zur Etablierung des Demyelinisierungsmodells bestand aus 25 Versuchstieren. Die Experimentaufstellung ist in Tab. 2 abgebildet.

<b>Untersuchungszeitpunkte nach Demyelinisierung in Tagen</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>16</b>	<b>30</b>
<b>1. anti-MOG/Komplement</b>					
Anzahl der Tiere      N =	4	4	4	4	4
<i>Anzahl der Läsionen</i> n =	8	8	8	8	8
<b>2. PBS-Kontrolle</b>					
Anzahl der Tiere      N =	1	1	1	1	1
<i>Anzahl der Läsionen</i> n =	2	2	2	2	2

**Tab. 2: Experimentaufstellung Demyelinisierungsmodell**

Zwei, fünf, neun, 16 und 30 Tage nach Induktion der Demyelinisierung wurden in der anti-MOG/Komplement-Gruppe jeweils vier Tiere und in der PBS-Kontrollgruppe jeweils ein Tier mit bilateralen Läsionen untersucht. Die Anzahl der untersuchten Läsionen pro Zeitpunkt in der

anti-MOG/Komplement-Gruppe betrug dann  $n=8$  und in der PBS-Kontrollgruppe  $n=2$ . Von der rostralen bis zur caudalen Grenze der Läsion wurde unter Wahrung der Reihenfolge jeder dritte Schnitt ausgesucht und gegen MBP und NF200 gefärbt. Der MBP-Defekt wurde mit Hilfe eines digitalen Bildverarbeitungssystems (KS300) an einem Zeiss Axioskop Mikroskop umfahren und die Fläche bestimmt. Die näherungsweise Ermittlung des Volumens der Läsion konnte nun durch Multiplikation der Fläche mit dem Abstand zwischen den Schnitten erfolgen. Durch Mittelwertbildung wurde ein Gesamtwert pro Untersuchungszeitpunkt aus jeweils acht Läsionen der anti-MOG/Komplement-Gruppe und zwei Läsionen der PBS-Kontrollgruppe gebildet.

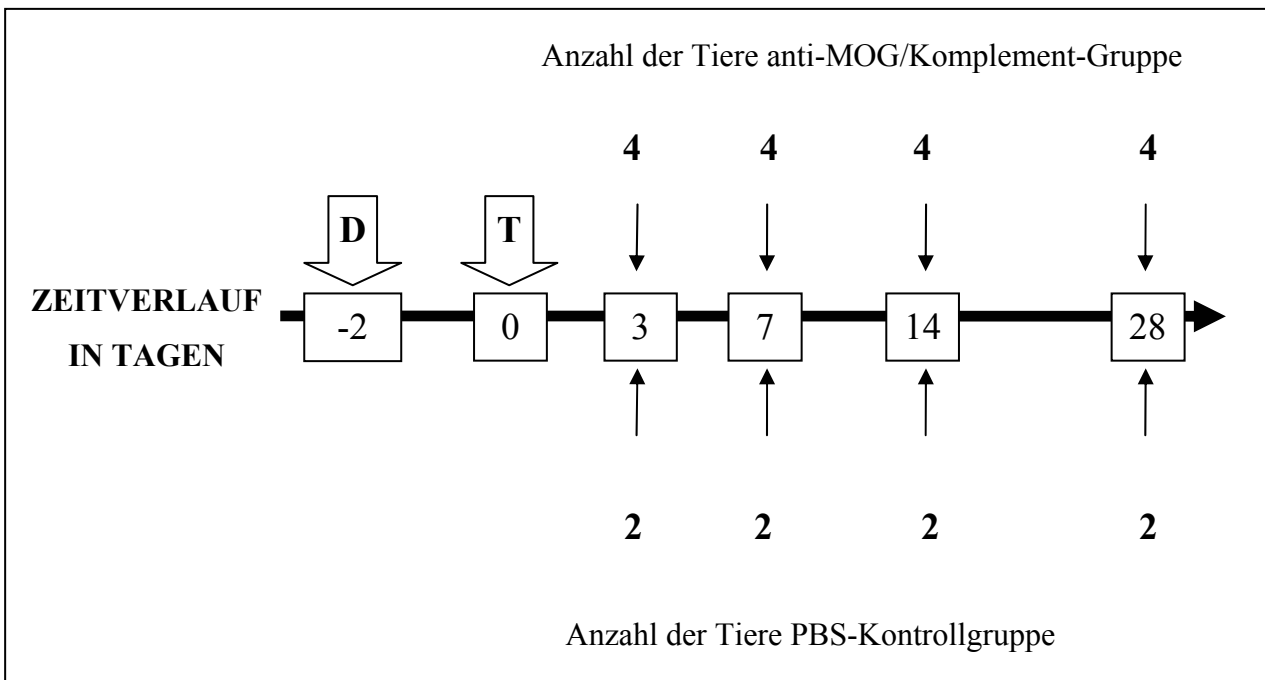
### ***3.5.2 Quantifizierung der in vitro Differenzierung der Spenderzellen***

Zur Bestimmung des oligodendroglialen und astrozytären Anteils wurden ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen durch viertägigen Wachstumsfaktorentzug differenziert. Die Kulturen wurden fixiert und immunhistochemisch auf die Expression von O4 sowie GFAP untersucht. Eine Färbung der Zellkerne erfolgte mit HOECHST-Farbstoff. Für die Quantifizierung wurden jeweils 15 Gesichtsfelder ausgezählt. Die Darstellung der aus zwei Zellkulturschalen resultierenden Daten erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (Stab.).

### ***3.5.3 Quantitative Analyse der Zellen nach Transplantation in einen anti-MOG/Komplement-induzierten Entmarkungsherd***

Die Versuchsgruppe zur Demyelinisierung und Transplantation bestand aus 24 Versuchstieren. Zwei Tage nach Induktion der Demyelinisierung wurden die Zellen transplantiert und anschließend Untersuchungen zu vier Zeitpunkten durchgeführt. Dabei wird der Zeitpunkt der Transplantation als Tag 0 definiert und entspricht Tag 2 im Demyelinisierungsexperiment. Die Experimentaufstellung Demyelinisierung und Transplantation ist in Abb. 8 dargestellt.





**Abb. 8: Experimentaufstellung und Zeitverlauf Demyelinisierung und Transplantation**

D-Demyelinisierung, T-Transplantation

Drei, sieben, 14 und 28 Tage nach Transplantation der Zellen in den lokalisierten inflammatorischen Entmarkungsherd wurden in der anti-MOG/Komplement-Gruppe jeweils vier Tiere und in der PBS-Kontrollgruppe jeweils zwei Tiere mit bilateraler Läsion und Transplantation untersucht. Entsprechend betrug die Anzahl der untersuchten Läsionen mit Transplantation pro Zeitpunkt in der anti-MOG/Komplement-Gruppe  $n=8$  und in der PBS-Kontrollgruppe  $n=4$ . Es wurden jeweils zwei repräsentative Schnitte pro Tier vom Zentrum der Läsion ausgewählt und die Spenderzellen mittels DNA *in situ* Hybridisierung zur Darstellung gebracht. Die Anzahl der *in situ* hybridisierten Zellen wurde an einem Zeiss Axioskop Mikroskop ermittelt. Aus den ermittelten Einzeldaten für die Überlebensintervalle erfolgte für jede Versuchsgruppe die Mittelwertbestimmung. Die Werte wurden für die einzelnen Hemisphären zunächst seitengetreunt analysiert, um den Einfluss der Versuchsgröße „Zeitpunkt der Zelltransplantation“ (stets wurde zuerst in die linke Hemisphäre transplantiert) zu untersuchen. Anschließend erfolgte die Zusammenfassung zum Gesamtwert, welcher der durchschnittlichen Zahl überlebender Zellen in einem Schnitt pro Läsion entspricht.

#### **3.5.4 Statistische Analyse**

Für den Vergleich der Ausdehnung der Demyelinisierung zwischen der anti-MOG/Komplement- und der PBS-Kontrollgruppe wurde zur statistischen Auswertung ein Mehrfachvergleich nach Bonferroni durchgeführt. Für den Vergleich der überlebenden Zellzahl zwischen der anti-MOG/Komplement- und der PBS-Kontrollgruppe wurden Varianzanalysen mit dem Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test und ein Mehrfachvergleich nach Bonferroni durchgeführt. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des statistischen Programms SPSS Version 12.0.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Etablierung eines anti-MOG/Komplement-induzierten lokalisierten Entmarkungsmodells

#### 4.1.1 Pilotexperiment zur Optimierung des Systems

Zur Durchführung des Transplantationsexperimentes musste zunächst die Induktion eines lokalisierten entzündlichen Entmarkungsherdes mittels stereotaktischer Injektion von anti-MOG-Antikörper und Komplement an umschriebener Stelle im Corpus Callosum adulter Wistar-Ratten etabliert werden. Insbesondere sollten Bedingungen gefunden werden, die eine ausreichende Demyelinisierung mit inflammatorischer Komponente bei noch suffizientem Axonerhalt bewirkten. Durch Variation a) der stereotaktischen Koordinaten, b) der Konzentration des anti-MOG/Komplement-Gemisches, c) des injizierten Volumens, d) der Beschaffenheit der Glaskapillare und e) der Zeitdauer der Injektion der Substanz, wurden in einer ausgedehnten Vorversuchsreihe die optimalen Bedingungen etabliert und damit die Voraussetzungen zur Durchführung des Transplantationsexperimentes geschaffen.

Das Corpus Callosum stellte aus mehreren Gründen eine geeignete anatomische Struktur zur Untersuchung von Demyelinisierungsprozessen im adulten ZNS dar. Zum einen ist es eine ausgedehnte Formation weißer Substanz mit zahlreichen Faserbahnen unterschiedlichen Verlaufes und Kalibers. Zum anderen handelt es sich um eine operativ leicht zugängliche Struktur. Gezielte lokalisierte Interventionen konnten damit vorgenommen und diese am gleichen Tier wiederholt werden. Dies ermöglichte einen verlässlichen Vergleich von Untersuchungen an mehreren Tieren.

#### A: Stereotaktische Koordinaten

Die Richtwerte der stereotaktischen Koordinaten für die optimale Position der Injektionskapillare entstammten dem Atlas „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Fourth Edition“ von George Paxinos. Um einen lokalisierten Entmarkungsherd im Corpus Callosum zu erzeugen, sollte die Substanz ins Genu Corporis Callosi injiziert werden. Nach Variation der ventralen Parameter, ausgehend vom Niveau der Dura mater, ergab sich ein optimaler ventraler Koordinatenpunkt bei 2,2 mm. Der Verlauf des venösen Sinus unterhalb der Schädelkalotte erforderte einen minimalen

lateralen Abstand vom Bregma von 2,0 mm. Das entsprach auch dem optimalen lateralen Koordinatenpunkt. Bei der Variation der Koordinaten vom Bregma nach posterior zeigte sich bei +0,2 mm die optimale Lokalisation.

#### B: Konzentration des anti-MOG/Komplement-Gemisches/ C: Injiziertes Volumen

Mit immunhistochemischen Doppelmarkierungen gegen MBP und NF200 wurden die Myelindestruktion und der axonale Schaden charakterisiert und quantitativ ausgewertet. Eine ausreichende Demyelinisierung mit inflammatorischer Komponente wurde bei einem Mischungsverhältnis 1:2 des MOG-Antikörpers (clone 8-18C5; 5mg/ml) und Meerschweinchen-Komplement in 0,1 M sterilem PBS (1:3) und einem Volumen von 1 µl erzeugt. Eine weitere Verdünnung des anti-MOG-Antikörpers mit 33% Meerschweinchen-Komplement auf 1:20, 1:50 oder 1:100 führte zwar ebenfalls zu einer Demyelinisierung, jedoch wies diese ein wesentlich geringeres Volumen auf. Ein Unterschied des Volumens der Demyelinisierung zwischen den Verdünnungen 1:20, 1:50 und 1:100 konnte aber nicht beobachtet werden, was auf eine primär operativ bedingte Gewebeschädigung hinweist. Die Größe des Demyelinisierungsherdes war dabei nicht ausreichend, um eine sichere Deposition der Zellen in den Demyelinisierungsherd zu gewährleisten. Die Erhöhung der Injektionsmenge und Einbringen von 2 oder 3 µl des anti-MOG/Komplement-Gemisches in das Corpus Callosum an den optimalen Koordinaten führte zu einer ausgedehnten Läsion, die im Zentrum jedoch nur noch Zelltrümmer und keine intakten Axone mehr enthielt.

#### D: Beschaffenheit der Glaskapillare

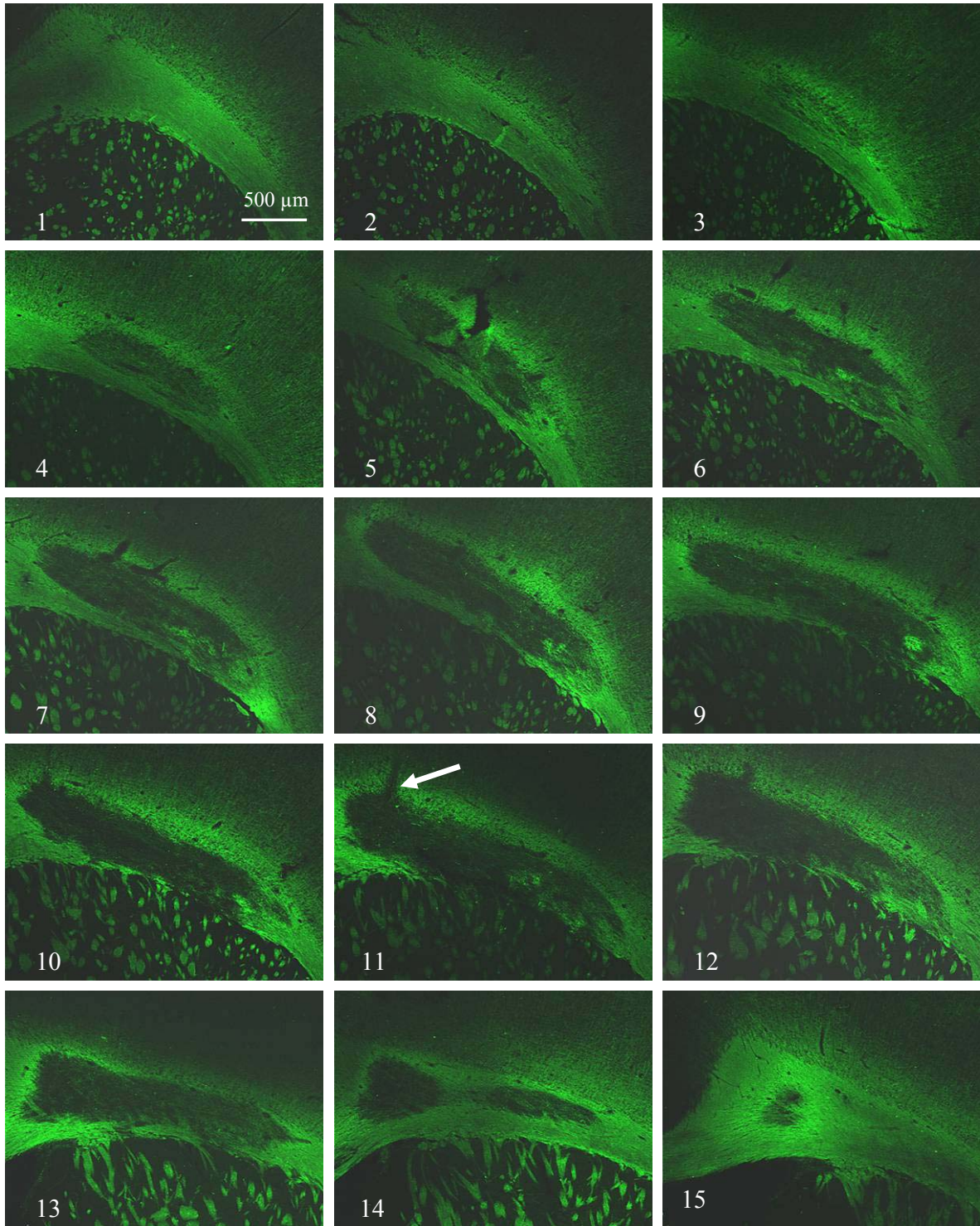
Ein wesentlicher Parameter war die Beschaffenheit der Glaskapillare. Bei Verwendung einer Kapillare mit gebrochenem, scharfkantigem Rand entstand vermutlich durch mechanische Durchtrennung der Axone ein ausgedehnter axonaler Schaden. Dieser konnte mittels immunhistochemischer Färbung über einen Verlust von NF200-positivem Signal und Darstellung von Axontorpedos nachgewiesen werden. Nach Verwendung von Kapillaren mit definiertem Lumen von 50 µm und geflammter, abgerundeter Öffnung konnte eine Verminderung der Anzahl vorhandener Axontorpedos und untergehender Axone beobachtet werden, so dass nur Kapillaren mit geflammter Öffnung eingesetzt wurden.

#### E: Zeitdauer der Applikation

Durch eine langsame Injektion über eine Zeitdauer von 10 min bis 12 min konnte der mechanisch erzeugte Schaden vermindert werden. Die Daten wurden empirisch ermittelt. Eine quantitative Analyse wurde nicht durchgeführt.

#### **4.1.2 Ausdehnung der Demyelinisierung**

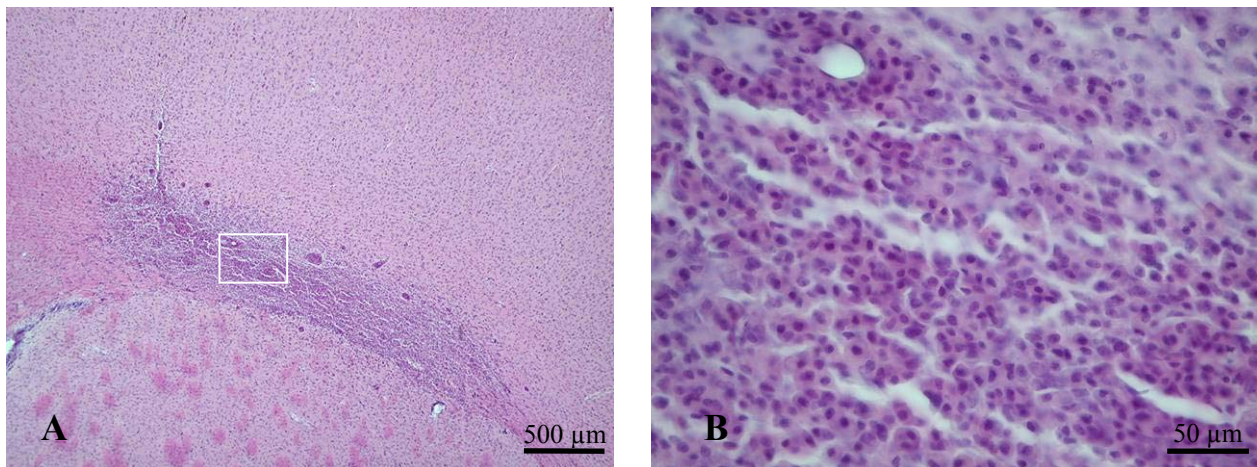
Die Ausdehnung der Läsion wurde zwischen zwei und 30 Tagen nach Induktion der Demyelinisierung untersucht. Die stereotaktische Injektion von 1 µl anti-MOG/Komplement-Gemisch in das Genu Corporis Callosi adulter weiblicher Wistar Ratten führte zu einem reproduzierbaren lokalisierten inflammatorischen Entmarkungsherd. Dabei breitete sich das Demyelinisierungsareal spindelförmig in rostro-caudaler Richtung aus. Beginnend mit einer kleinen ovalen Läsion unmittelbar caudal der Cortexgrenze des Corpus Callosum wuchs diese kegelförmig an und erfasste die gesamte Breite des Corpus Callosum. An der Injektionsstelle, erkennbar am dort verlaufenden Stichkanal, erreichte die Läsion ein Maximum. Danach verkleinerte sich mit zunehmendem Abstand vom Stichkanal die Läsion wieder sowohl in dorso-ventraler als auch in medio-lateraler Ausdehnung. Bereits zum frühesten Untersuchungszeitpunkt, zwei Tage nach Applikation des Gliotoxin-Gemisches, war eine Demyelinisierungsreaktion nachweisbar. Ihre größte Ausdehnung erreichte sie fünf Tage post injectionem (p.i.). Die immunhistochemische Darstellung mit Antikörpern gegen MBP reflektierte den Verlust von Myelinscheiden und kennzeichnete das Demyelinisierungsareal (Abb. 9).



**Abb. 9: Ausdehnung der Demyelinisierung**

Immunhistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen MBP, grün dargestellt. Typische Form und Verlauf einer Läsion am fünften Tag nach anti-MOG/Komplement induzierter Demyelinisierung, vom Beginn (1) bis zum Ende (15) in cranio-caudaler Abfolge. Gut erkennbar ist der Verlust der Immunreaktivität gegen MBP, welcher das Demyelinisierungsareal markiert. Der Abstand zwischen den Schnitten beträgt jeweils 120μm. Der weiße Pfeil weist auf den Stichkanal.

Der Verlust der MBP-Immunreaktivität war auf das Gebiet des Corpus Callosum beschränkt und ließ sich in den angrenzenden Regionen, wie dem Cortex oder dem Striatum, bis auf einzelne Ausnahmen nicht nachweisen. Die wenigen Ausnahmen zeigten eine Verminderung der immunhistochemischen Reaktion auf MBP auch im angrenzenden Cortex und zwar in unmittelbarer Nachbarschaft zum Stichkanal. Die inflammatorische Komponente war durch eine massive Zellinfiltration hauptsächlich lympho- und monozytärer Zellen gekennzeichnet. Eine weiterführende Charakterisierung der Entzündungszellen anhand von Oberflächenantigenen wurde im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt. Die Verteilung dieser Zellen im Gewebe war eng auf das Gebiet der Demyelinisierung begrenzt und konnte im umgebenden Gewebe nicht nachgewiesen werden (Abb. 10).



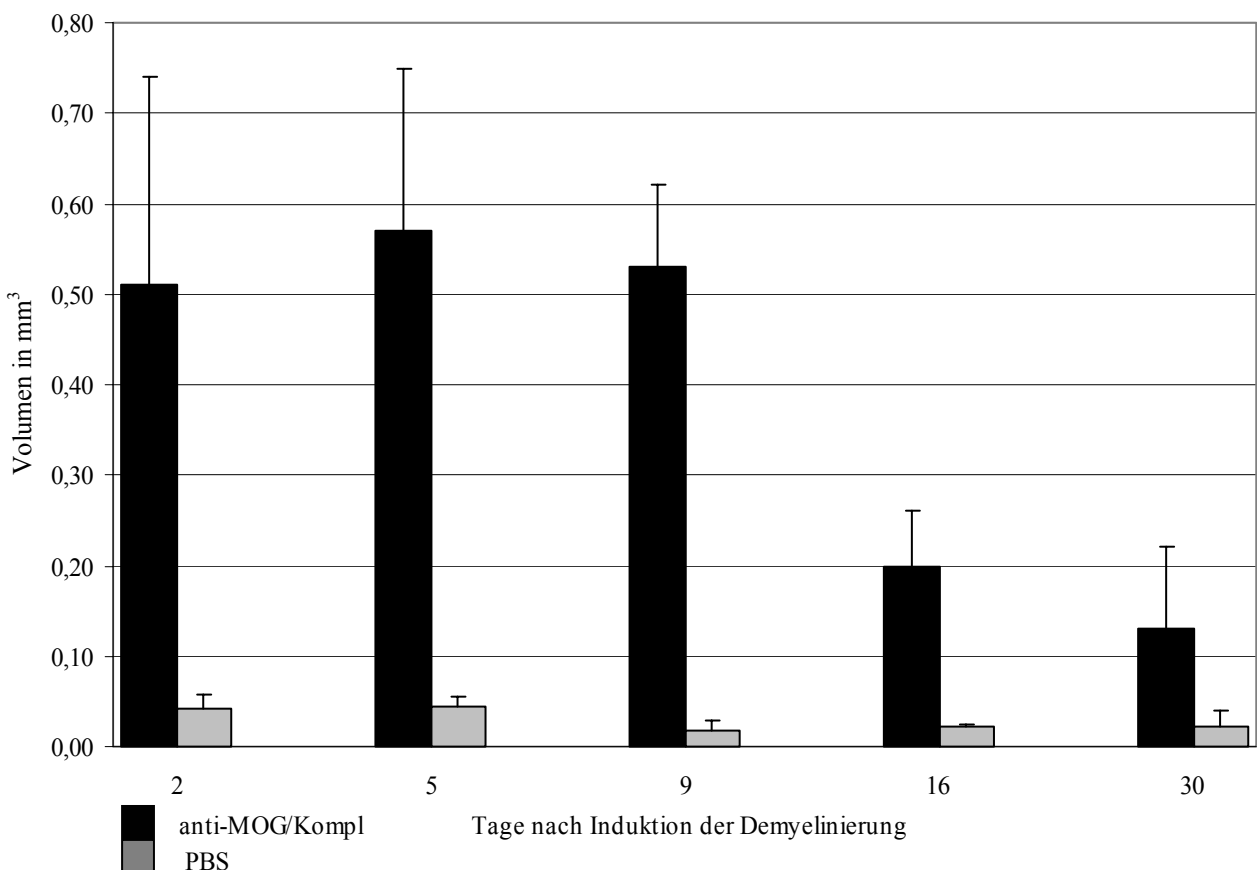
**Abb. 10: Inflammatorische Reaktion**

H.E.-Färbung; Inflammatorische Reaktion fünf Tage nach Injektion von 1 µl anti-MOG/Komplement-Gemisch.

Die Entzündungsreaktion folgt eng dem Gebiet der Demyelinisierung und das umgebende Gewebe ist weitgehend verschont. B entspricht dem Ausschnitt aus A.

Die volumetrische Quantifizierung ergab ein Maximum der Ausdehnung, mit einem Gesamtvolumen von  $0,57 \pm 0,18 \text{ mm}^3$ , fünf Tage nach Induktion des Demyelinisierungsherd. Zum ersten Untersuchungszeitpunkt, zwei Tage p.i., betrug die Läsion  $0,51 \pm 0,23 \text{ mm}^3$ , wuchs innerhalb von fünf Tagen p.i. auf das Maximum an und wurde dann kontinuierlich kleiner. Neun Tage p.i. zeigte sich ein Volumen von  $0,53 \pm 0,09 \text{ mm}^3$  und 16 Tage p.i.  $0,20 \pm 0,06 \text{ mm}^3$ . Zum letzten Untersuchungszeitpunkt, 30 Tage nach Induktion der Demyelinisierung, betrug das Volumen  $0,13 \pm 0,09 \text{ mm}^3$ . Das Volumen des demyelinisierten Areals 16 Tage und 30 Tage p.i.

war signifikant kleiner als das Volumen zum Zeitpunkt des Maximums fünf Tage p.i. ( $p < 0,05$  Tag 16;  $p < 0,005$  Tag 30; Mehrfachvergleich nach Bonferroni). Zur Verifizierung, ob es sich dabei tatsächlich um eine spezifische, inflammatorische Demyelinisierungsreaktion auf das injizierte Antikörper-Komplement-Gemisch handelte wurde einer Kontrollgruppe 1  $\mu\text{l}$  PBS in gleicher Vorgehensweise injiziert. Diese Behandlung führte nur zu einer umschriebenen, stempel- bis tränenförmigen Läsion um die Injektionsstelle. Die Ausdehnung war um ein zehnfaches und damit signifikant kleiner als die der anti-MOG/Komplement-Gruppe. Das Volumen der Läsion in der Kontrollgruppe betrug zwei Tage p.i. nur  $0,042 \pm 0,015 \text{ mm}^3$  und fünf Tage p.i.  $0,044 \pm 0,012 \text{ mm}^3$ . Im weiteren Zeitverlauf verminderte sich der Defekt auf  $0,018 \pm 0,010 \text{ mm}^3$  neun Tage p.i. und blieb dann mit  $0,022 \pm 0,003 \text{ mm}^3$  16 Tage p.i. und  $0,021 \pm 0,019 \text{ mm}^3$  30 Tage p.i. annähernd konstant. Eine vollständige Defektheilung fand nicht statt (Abb. 11).



**Abb. 11: Graphische Darstellung des Volumens der Demyelinisierung im Zeitverlauf**

Dargestellt ist das Volumen der Demyelinisierung im Zeitverlauf. Die Werte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von  $n = 8$  Läsionen pro Zeitpunkt in der anti-MOG/Komplement-Gruppe und  $n = 2$  Läsionen pro Zeitpunkt in der PBS-Kontrollgruppe.



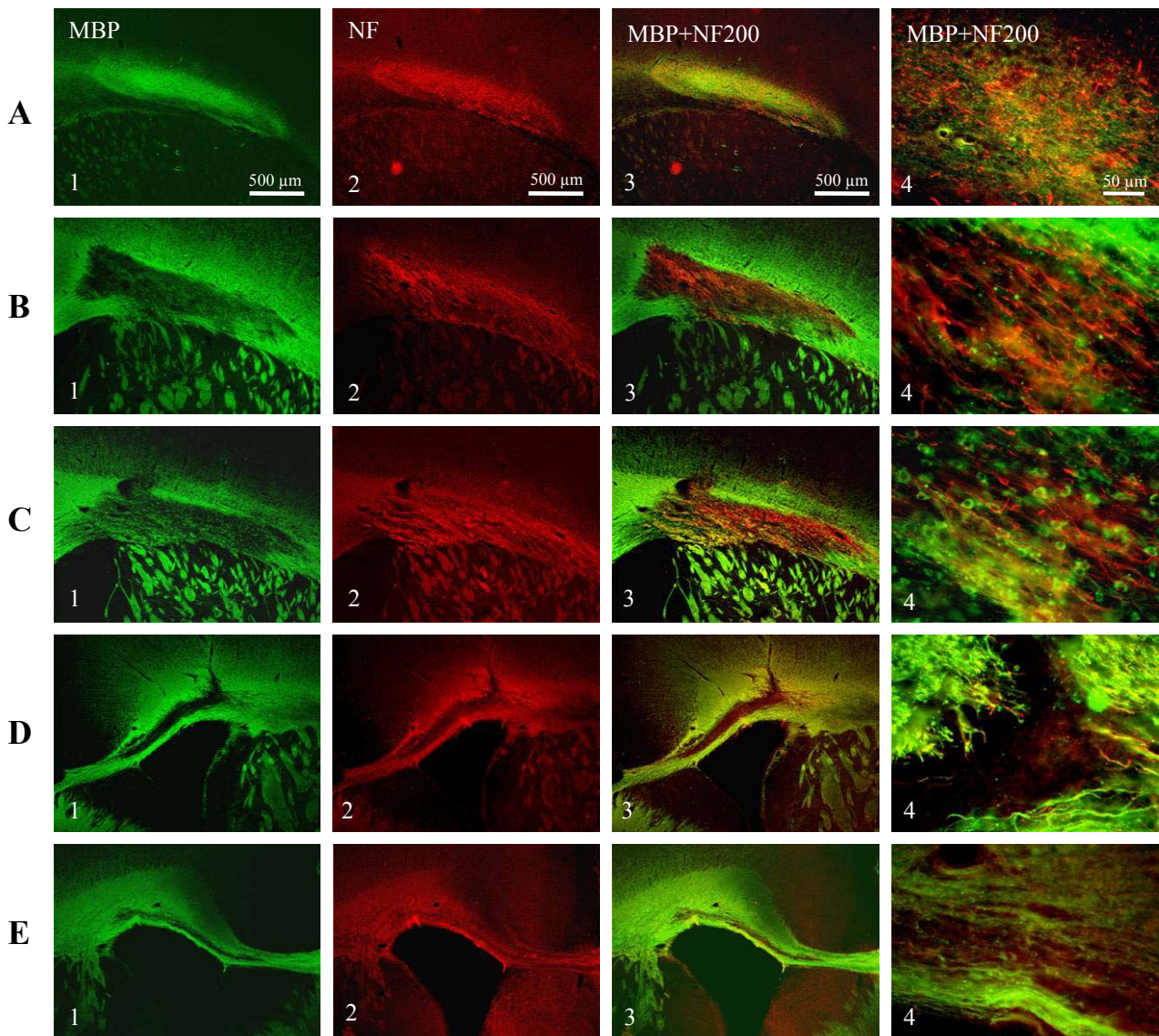
Die Demyelinisierung hatte keinen nachweisbaren Langzeiteffekt auf die Versuchstiere. 24 Stunden nach der stereotaktischen Injektion des anti-MOG/Komplement-Gemisches oder der PBS-Lösung hatten sich die Tiere vollständig vom operativen Eingriff erholt. Über den gesamten Beobachtungszeitraum von 30 Tagen zeigte keines der Tiere neurologische Ausfälle. Eines der Tiere verstarb 28 Tage p.i. an einer Pneumonie, die vermutlich auf Grund der Immunsuppression durch Ciclosporin aufgetreten war.

#### ***4.1.3 Spontane Remyelinisierung und Axonerhalt***

Die kontinuierliche Verminderung des Volumens des Entmarkungsherdens in der anti-MOG/Komplement-Gruppe nach dem Erreichen des Maximums, fünf Tage nach Induktion der inflammatorischen Demyelinisierung, wurde ausführlich im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Diese kann als Ergebnis einer spontanen endogenen Remyelinisierung gewertet werden, wie sie im frühen Stadium der MS auch beim Menschen nachzuweisen ist. Im Verlauf des Experimentes erfolgte eine Änderung nicht nur des Volumens der Läsion, sondern auch der Form. Zwei Tage nach Induktion der inflammatorischen Demyelinisierung spiegelte eine irreguläre diskontinuierliche immunhistochemische Darstellung von MBP die beginnende Demyelinisierung wieder. Dabei war eine Auflockerung des Gewebeverbandes mit intensiver Farbreaktion gegen MBP im Vergleich des sonst dicht verlaufenden und gering reaktiven Fasernetzwerkes im Corpus Callosum zu beobachten. Die Läsion hatte eine ovale, abgerundete, unscharf begrenzte Form, die sich auf den lateralen Anteil des Corpus Callosum beschränkte und noch nicht die gesamte Breite erfasste (Abb. 12-A). Fünf Tage p.i. war die Demyelinisierung durch einen scharf umrandeten, wie ausgestanzt wirkenden Verlust spezifischer MBP-Markierung gekennzeichnet, der die gesamte dorso-ventrale Ausdehnung des Corpus Callosum einnahm. Umgeben von reichlich Myelindebris waren im Zentrum der Läsion ganz vereinzelt Myelinscheiden zu erkennen. Der Läsionsrand wies eine starke MBP-Reaktivität als Zeichen eines aktiven Demyelinisierungsprozesses auf (Abb. 12-B). Im weiteren Verlauf zeigte sich neun Tage p.i. ein wieder unschärfer werdender MBP-Defekt, der sich ebenfalls über die gesamte Breite ausdehnte und nur noch einen geringen Anteil Myelindebris enthielt (Abb. 12-C). Auffällig waren MBP-positive Oligodendrozyten die nun über die gesamte Läsion nachweisbar waren (Abb. 12-C<sub>4</sub>). Sechzehn und 30 Tage nach Applikation des Gliotoxins stellte sich ein strichförmig ausgezogener über die Mittellinie nach medial hinausgehender MBP-Defekt dar. Im

Vergleich zu den frühen Untersuchungszeitpunkten konnte eine wesentliche Reduktion insbesondere der dorso-ventralen Ausdehnung beobachtet werden (Abb. 12-D, E).

Die Darstellung der Axone erfolgte mit einer immunhistochemischen Färbung gegen Neurofilament. Reaktion und Verhalten des NF200-Färbesignals im inflammatorischen Entmarkungsherd wurde im Zeitverlauf untersucht. Zum frühesten Untersuchungszeitpunkt, zwei Tage p.i., ließen sich im Bereich der beginnenden Demyelinisierung NF200-positive Axonabschnitte nachweisen. Sie waren dicht gepackt und erschienen in der lichtmikroskopischen Untersuchung intakt (Abb. 12-B). Zum Zeitpunkt der maximalen Demyelinisierung fünf Tage p.i., sowie neun Tage p.i., ließen sich Axone über weite Abschnitte ihres Verlaufes darstellen, da durch den Verlust der Myelinscheiden die Bindung des Antikörpers an die Antigene nun ungehindert erfolgen konnte (Abb. 12-B, C). Ödembildung und Vorhandensein von Myelindebris im akuten Demyelinisierungsherd ließen die Axone stark voneinander separiert erscheinen. Bis auf wenige Axontorpedos und Kalibersprünge, die durch entzündliche Schwellung bedingt waren, wiesen die Axone keine pathologischen Veränderungen auf. Dreißig Tage p.i. waren sowohl am Rand als auch im Zentrum der Läsion vermehrt Axone dargestellt, die in ihrem Verlauf von zarten MBP-positiven putativen Myelinscheiden umgeben waren (Abb. 12-E).



**Abb. 12: Demyelinisierung und Axonerhalt über den Zeitverlauf der Untersuchung**

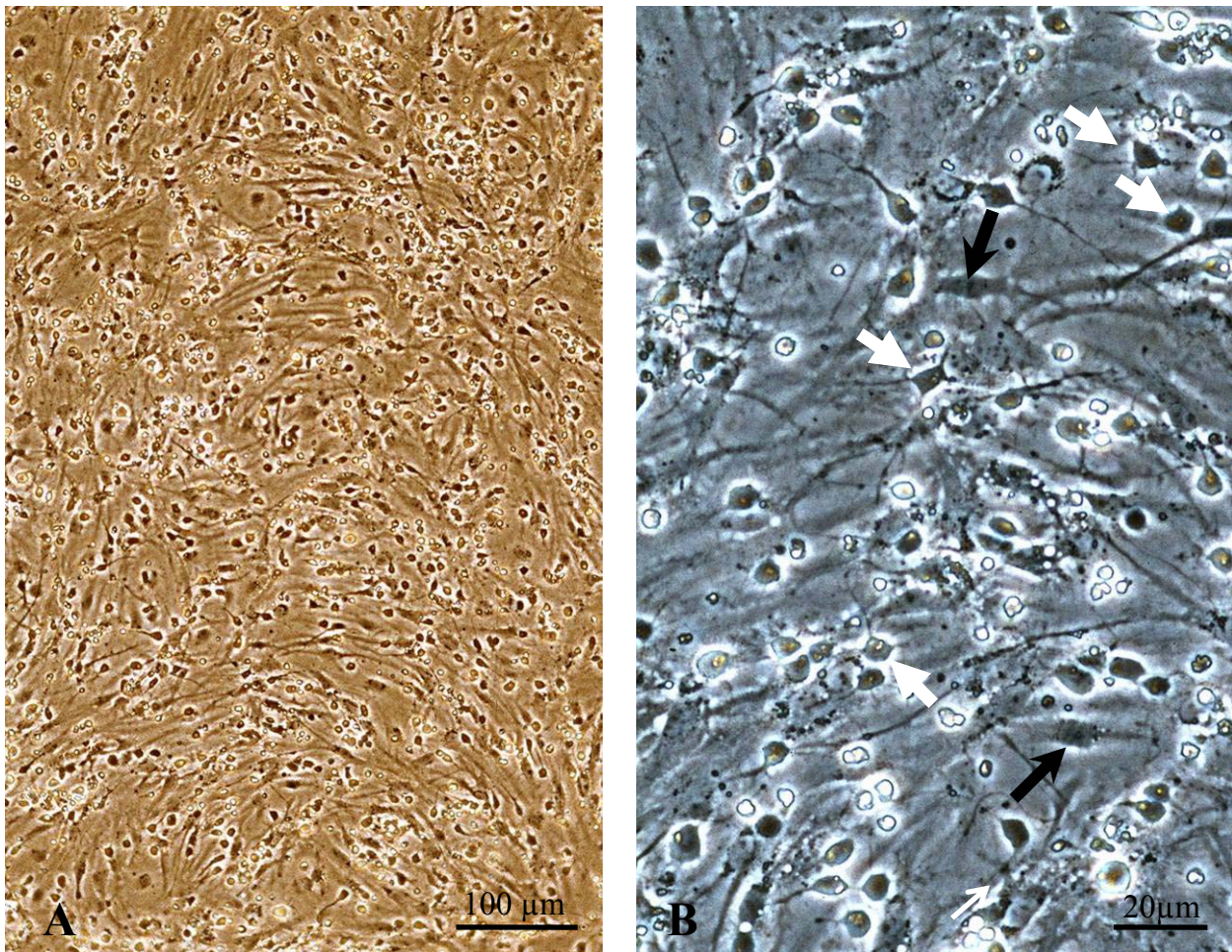
Repräsentative Schnitte der Läsionsherde, aufgenommen zwei (A), fünf (B), neun (C), 16 (D) und 30 (E) Tage nach anti-MOG/Komplement-induzierter Demyelinisierung. 1-3 zeigen Übersichtsaufnahmen eines repräsentativen Schnittes zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. 1 - MBP-Färbung (grün), 2 - NF200-Färbung (rot), 3 und 4 - Überlagerung der beiden Färbungen. 4 zeigt dabei eine Ausschnittsvergrößerung aus 3. Der Verlust des MBP-positiven Signals markiert das Gebiet der Demyelinisierung. NF200-positive Axone sind zu allen Zeitpunkten vorhanden. Bereits neun Tage, sowie 16 Tage p.i. Kontaktierung von Axonen durch MBP-positive Fortsätze als Zeichen einer einsetzenden Myelinisierung (C4, D4).

Diese Daten zeigen, dass die stereotaktische Injektion von 1  $\mu$ l eines anti-MOG/Komplement-Gemisches in das Corpus Callosum adulter weiblicher Wistar Ratten zur Induktion eines reproduzierbaren lokalisierten Entmarkungsherdes führte. Die akute inflammatorische

Komponente und die Zerstörung von Myelinscheiden, bei weitgehendem Axonerhalt, bieten histomorphologisch Ähnlichkeit zu den MS Patienten auftretenden akuten Demyelinisierungsherden. Das verwendete Modell eignet sich daher in besonderer Weise für die Untersuchung der Überlebensfähigkeit und des Differenzierungspotentials ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in eine akute entzündliche Läsion.

#### **4.2 Gewinnung oligodendroglialer und astrozytärer Vorläuferzellen aus ES-Zellen**

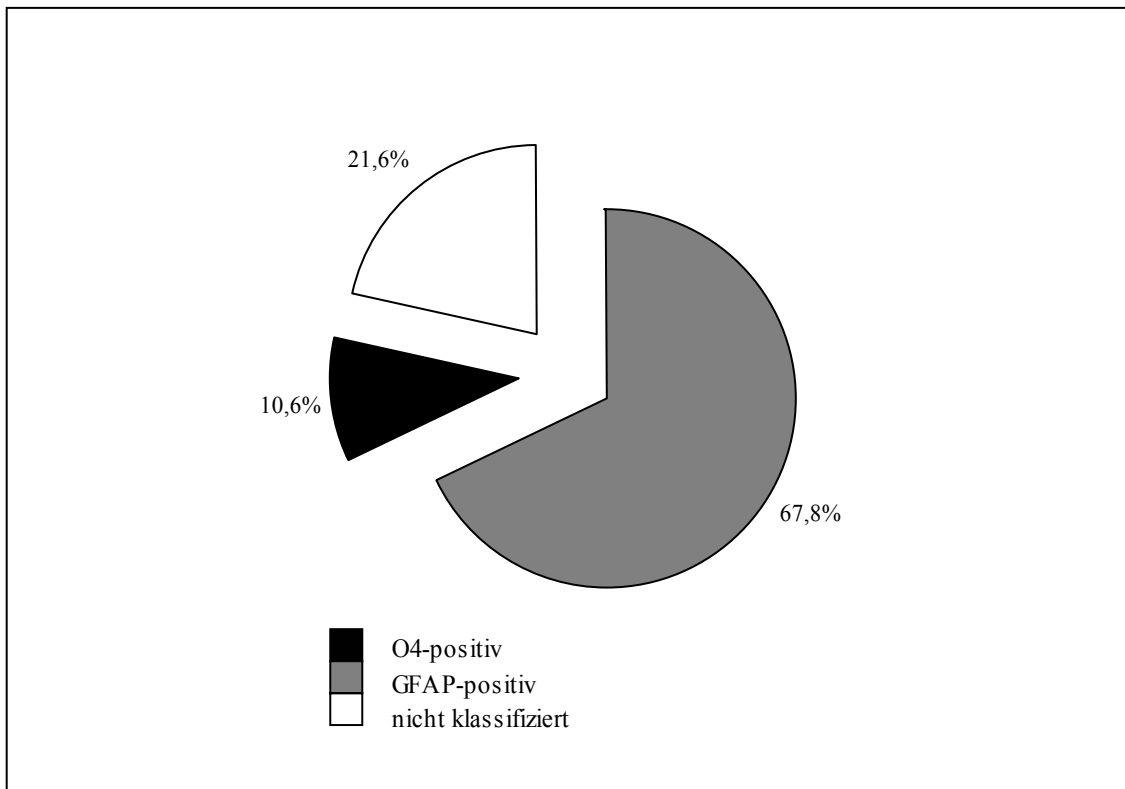
In dieser Arbeit wurden bipotente ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen in einem hohen Reinheitsgrad nach einem etablierten Protokoll gewonnen (Brüstle et al. 1999a). Hierzu wurden die noch undifferenzierten Zellen der ES-Zelllinie CJ7 auf einem Zellrasen mitotisch inhibierter embryonaler Fibroblasten und danach auf Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen unter Einfluss von LIF kultiviert. Um die Differenzierung in multipotente Vorläuferzellen einzuleiten, wurden die Zellen in Zellkulturschalen mit nicht-adhäsivem Substrat überführt, in denen sie freischwimmende multizelluläre Aggregate bildeten - die Embryoidkörper. Danach wurden die Embryoidkörper plattiert und in einem serumfreien Medium propagiert, welches das Überleben neuraler Vorläuferzellen begünstigte (Okabe et al. 1996). Diese Vorläuferzellen wurden nun passagiert und durch eine Kaskade definierter serumfreier Medien mit den Wachstumsfaktoren EGF, FGF2 und PDGF propagiert. Unter diesen Bedingungen konnte eine isomorphe Population bipotenter glialer Vorläuferzellen in großer Reinheit gewonnen werden (Abb. 13).



**Abb. 13: ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen *in vitro***

ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen wurden in serumfreiem Medium unter Anwesenheit von FGF2 und PDGF kultiviert. Die Abbildung zeigt die Zellpopulation *in vitro* unmittelbar vor Präparation der Zellen zur Transplantation. B zeigt eine Ausschnittsvergrößerung aus A. Die Zellen weisen eine typische bipolare Morphologie auf. Weiße Pfeile markieren oligodendrogliale, schwarze Pfeile astrogliale Vorläuferzellen.

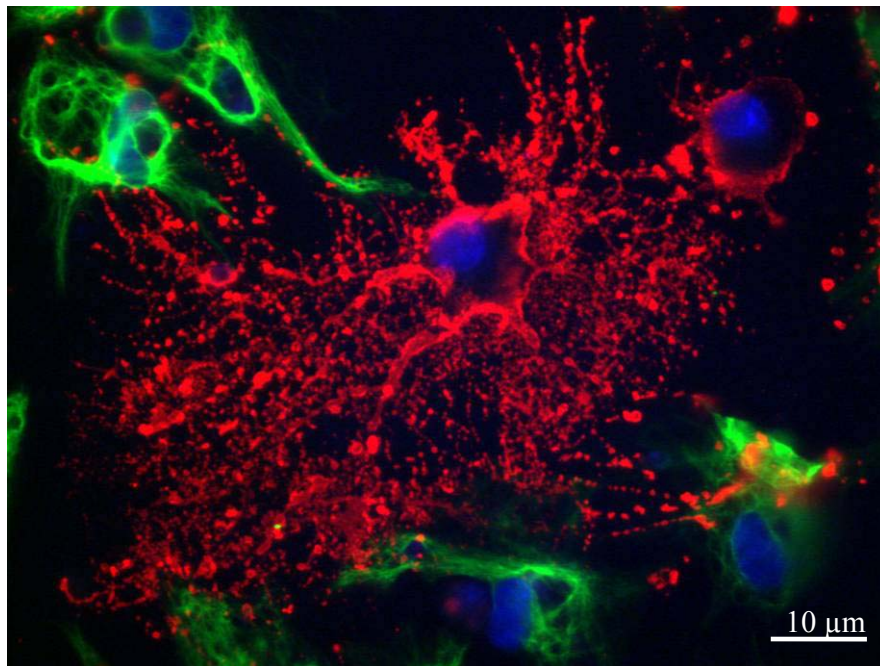
Die Induktion der terminalen Differenzierung in reife gliale Zellen wurde *in vitro* durch Wachstumsfaktorentzug ausgelöst. Die glialen Vorläuferzellen differenzierten nun in Astrozyten und Oligodendrozyten aus. Durch Färbung mit O4- und GFAP-Antikörpern wurden die Zellen *in vitro* identifiziert und der Anteil der jeweiligen Zellpopulation bestimmt. Vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug betrug der Anteil der O4-positiven Zellen  $10,6\% \pm 6,0\%$ , während  $67,8\% \pm 35,0\%$  der Zellen GFAP-positiv waren. Einem Anteil von  $21,6\%$  konnte keiner der beiden Differenzierungsmarker zugeordnet werden. Hierbei handelt es sich vermutlich um noch undifferenzierte gliale Vorläuferzellen (Abb. 14).



**Abb. 14: Prozentualer Anteil oligodendroglialer und astrozytärer Zellen vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug**

Vier Tage nach Induktion der Differenzierung durch Wachstumsfaktorentzug wurden die Zellen fixiert und gegen O4 und GFAP gefärbt. Nach Quantifizierung der HOECHST-markierten Zellkerne, der GFAP-positiven und O4-positiven Zellen wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Zellpopulation bestimmt.

Neben der quantitativen Analyse erfolgte gleichzeitig eine qualitative, morphologische Untersuchung der Zellen nach *in vitro* Differenzierung. O4-positive Zellen in der Zellkultur waren durch eine solitäre Lage charakterisiert. Sie wiesen einen polygonalen kompakt wirkenden Zellkörper mit vielen feinen, weit verzweigten Fortsätzen auf, die ein dichtes Netzwerk um den Zellkörper bildeten. GFAP-positive Zellen dagegen waren in Gruppen zusammengelagert. Die Zellkörper wiesen rundere und flachere Konfigurationen auf. Vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug hatten sie nur wenige Fortsätze ausgebildet, welche weniger grazil und kürzer gestaltet waren (Abb. 15).

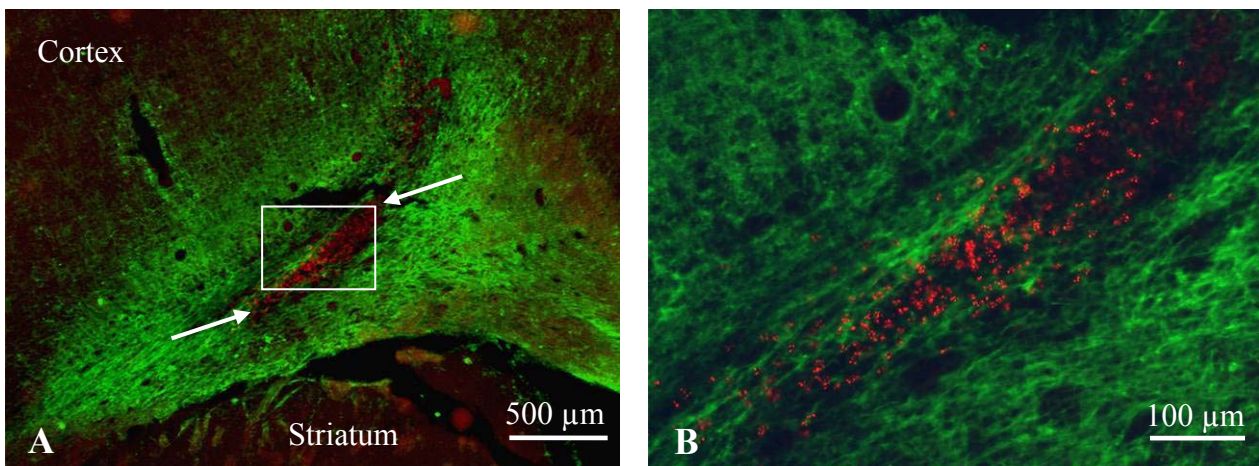


**Abb. 15: *In vitro* Differenzierung ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen in Astrozyten und Oligodendrozyten.**

Die Abbildung zeigt *in vitro* differenzierte Zellen vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug: Astrozyten (GFAP-positiv, grün) und Oligodendrozyten (O4-positiv, rot). Die Zellkerne sind blau dargestellt (HOECHST-Färbung). Gut zu erkennen sind die zahlreichen feinen Fortsätze der O4-positiven Oligodendrozyten und die in Gruppen zusammengelagerten GFAP-positiven Astrozyten.

#### **4.3 Überlebensfähigkeit ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in einen inflammatorischen Entmarkungsherd**

Die in Anwesenheit von FGF2 und PDGF proliferierten ES-Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen wurden in einen anti-MOG/Komplement-induzierten entzündlichen Entmarkungsherd transplantiert. Es wurde untersucht, inwieweit die Zellen drei, sieben, 14 und 28 Tage nach Transplantation in einem akuten inflammatorischen Demyelinisierungsherd im adulten Gehirn überleben und differenzieren können. Durch DNA *in situ* Hybridisierung mit einer mausspezifischen Sonde konnte die Verteilung der transplantierten Zellen entlang der demyelinisierten Läsion nachgewiesen werden. Die Donorzellen waren mit geringer Streuung zu allen Zeitpunkten im demyelinisierten Areal lokalisiert. Sie integrierten sich in das Empfängergewebe ohne Zeichen einer Abkapselung oder Zystenbildung (Abb. 16).



**Abb. 16: Transplantat und Demyelinisierung sieben Tage nach Zelltransplantation**

Die mit einer mausspezifischen DNA-Sonde markierten Spenderzellen (rot) verteilen sich entlang der durch anti-MOG/Komplement-induzierten Läsion. Der Verlust des CNP-Signals (grün) zeigt die Demyelinisierung an. Weiße Pfeile zeigen auf Läsion und Transplantat. B zeigt eine Ausschnittsvergrößerung aus A.

In der PBS-Kontrollgruppe wurden Zellen in dem Gewebeabschnitt angetroffen, welcher als Ergebnis der Injektionsprozedur zerstört worden war. Zu allen Zeitpunkten der Untersuchung konnten sowohl nach Transplantation in einen anti-MOG/Komplement-induzierten lokalisierten entzündlichen Entmarkungsherd als auch in den PBS-Kontrolltieren mittels *in situ* Hybridisierung überlebende Zellen nachgewiesen werden.

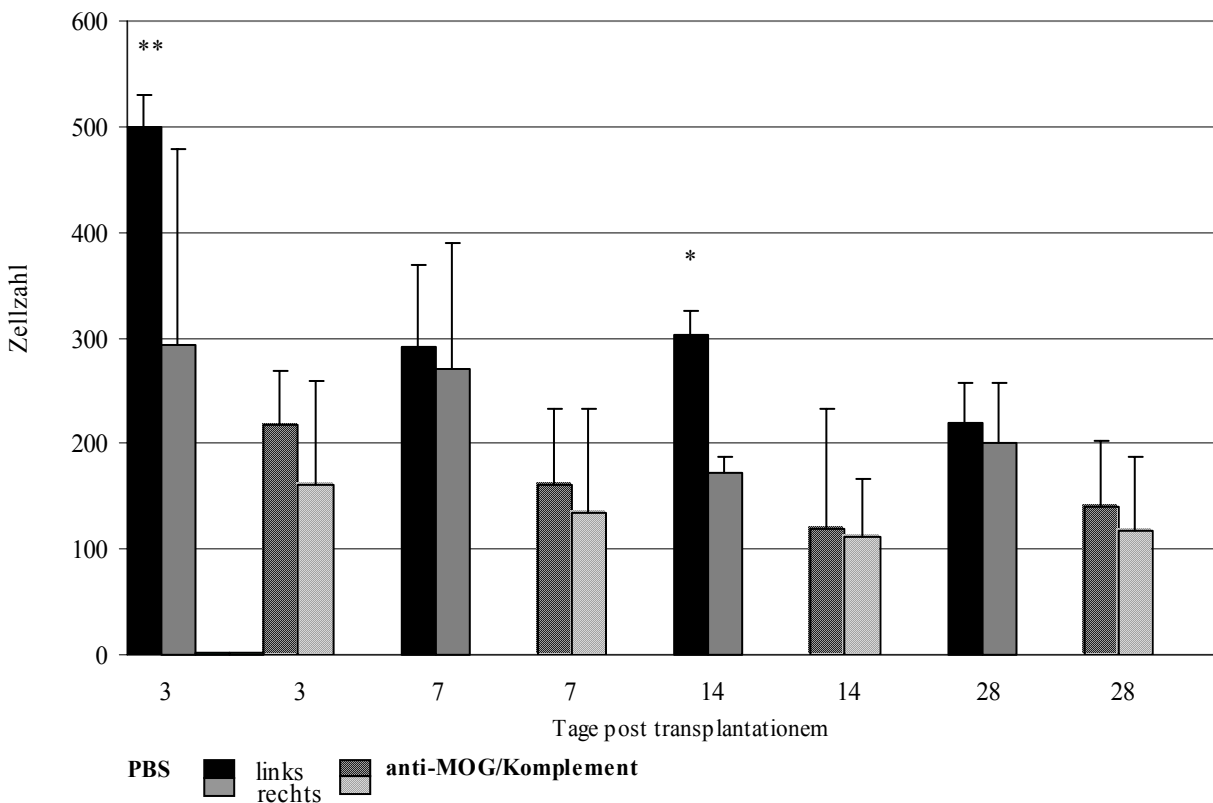
#### Vitalität der Zellen nach Lagerung auf Eis während der Transplantation

Bei der Durchführung der Transplantationsexperimente wurde jeweils eine frisch präparierte Zellsuspension für jeweils drei Versuchstiere, entsprechend sechs Hemisphäreninjektionen, verwendet. Die Applikation der Zellen erfolgte zuerst in die linke und - mit einer zeitlichen Verzögerung - in die rechte Hemisphäre. Der zeitliche Abstand von der Applikation der Zellen der frischen Zellpräparation in die linke Hemisphäre des ersten Versuchstieres bis zur Applikation der Zellen in die rechte Hemisphäre des dritten Versuchstieres betrug etwa 4,5 Stunden. Eine Vitalitätskontrolle der Zellen mit Trypanblau wurde jeweils vor der ersten und nach der letzten Transplantation durchgeführt. Stets konnten auch nach Transplantation des dritten Versuchstieres vitale Zellen nachgewiesen werden. Dabei betrug die absolute Vitalität der Zellen am Ende der Transplantation des dritten Versuchstieres  $45,6\% \pm 16,3\%$  von der Zahl vitaler Zellen in der frisch präparierten Zellsuspension.



### Seitengetrennte Analyse

Auf Grund der zeitlichen Versetzung konnte ein identisches Verhalten der Zellen in Läsionen *beider* Hemisphären *eines* Individuums nicht vorausgesetzt werden. Zunächst wurde deshalb eine seitengetrennte Analyse der bilateralen Läsionen durchgeführt. Betrachtete man die Menge der insgesamt gefundenen Zellen in den einzelnen Gruppen im Zeitverlauf, schienen sich links- und rechtshemisphärische Transplantate tatsächlich geringfügig zu unterscheiden. Sowohl in der anti-MOG/Komplement- als auch in der PBS-Gruppe waren stets in der linken Hemisphäre mehr hybridisierte Spenderzellen vorhanden als kontralateral. Ein signifikanter Unterschied war jedoch nur in der PBS-Gruppe drei Tage nach Transplantation ( $p < 0,005$ ) und 14 Tage nach Transplantation ( $p < 0,05$ ) nachweisbar (Abb. 17).



**Abb. 17: Überleben der Spenderzellen im Zeitverlauf (hemisphärengetrennte Darstellung)**

Die angegebenen Werte entsprechen Mittelwerten  $\pm$  Stab. der hybridisierten Zellen pro Schnitt am Implantationsort aus der PBS-Kontrollgruppe ( $n=2$  pro Zeitpunkt) und der anti-MOG/Komplement-Gruppe ( $n=4$  pro Zeitpunkt).

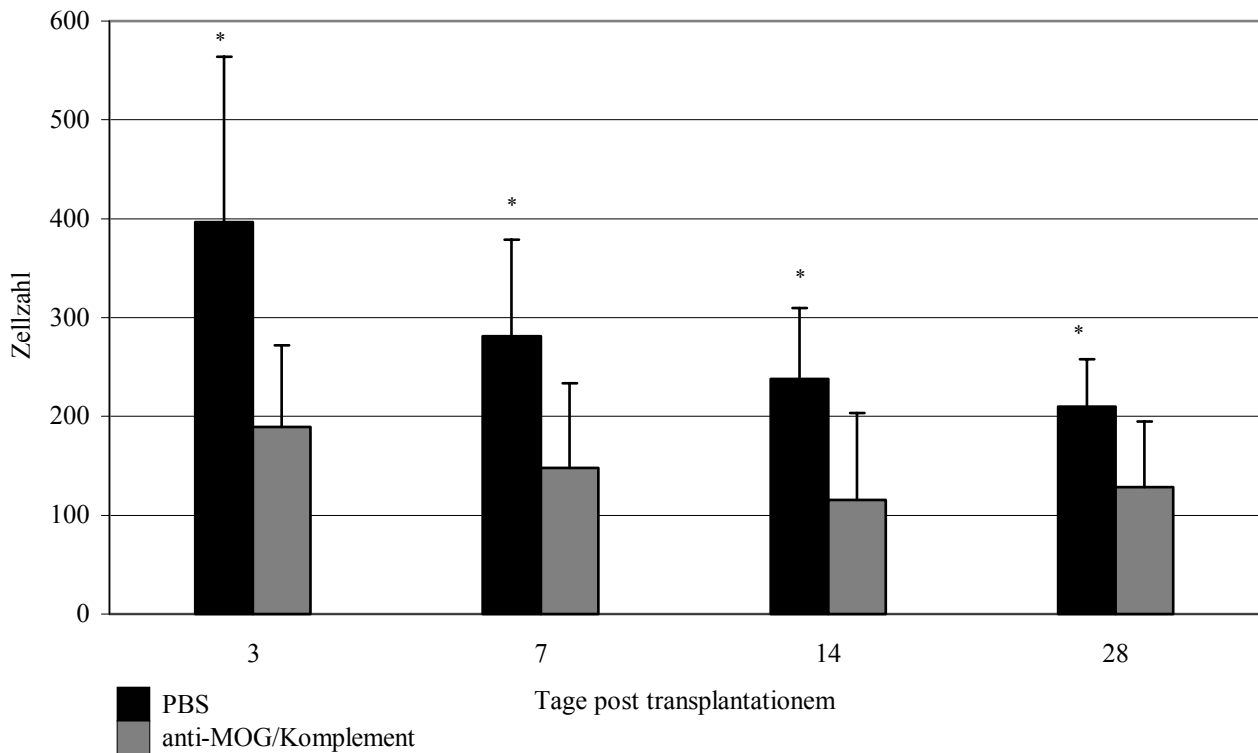
\*\* $p < 0,005$ , \*  $p < 0,05$  mit Mann-Whitney-U-Test.

Auf Grundlage dieser Daten wurde in der weiteren Auswertung auf eine seitengetrennte Analyse der Läsionen pro Hemisphäre verzichtet.

### Gesamtwert aus Einzelwerten der rechten und linken Hemisphäre

Die Werte der linken und rechten Hemisphäre wurden nun zu einem Gesamtwert zusammengefasst und ausgewertet. Dabei stellte der ermittelte Wert die durchschnittliche Zellzahl in einem Schnitt aus dem punctum maximum der entsprechenden Läsion dar.

Drei Tage nach Transplantation (p.t.) entsprechend fünf Tage nach Induktion der Demyelinisierung wurden in der anti-MOG/Komplement-Gruppe  $189,2 \pm 82,5$  und in der PBS-Kontrollgruppe  $396,4 \pm 167,2$  DNA *in situ* hybridisierte Zellen nachgewiesen. Im weiteren Verlauf konnte eine Abnahme der Zellzahl in beiden Gruppen beobachtet werden. Sieben Tage p.t. betrug die Zellzahl in der anti-MOG/Komplement-Gruppe  $147,7 \pm 86$  und in der PBS-Gruppe  $281,3 \pm 97,5$ . Die Anzahl der überlebenden Zellen am 14. Tag p.t. ergab in der anti-MOG/Komplement-Gruppe  $237,9 \pm 71,6$ , bzw.  $115,3 \pm 87,7$  in der PBS-Gruppe und am 28. Tag nach Zelltransplantation (30 Tage nach Demyelinisierung)  $209,7 \pm 48,4$ , bzw.  $128,5 \pm 66,3$  in der PBS-Kontrollgruppe. Der Mehrfachvergleich nach Bonferroni zeigte, dass die Abnahme der Zellzahl in der PBS-Gruppe am siebenten Tag p.t. mit  $p < 0,028$ , am 14. Tag p.t. mit  $p < 0,01$  und 28 Tage p.t. mit  $p < 0,001$  im Vergleich zum dritten Tag post transplantationem signifikant war. Auch in der anti-MOG/Komplement-Gruppe konnte im Vergleich zum dritten Tag ein signifikanter Unterschied der Abnahme der Zellzahl überlebender Zellen zu Tag 14 ( $p < 0,002$ ) und 28 Tage p.t. ( $p < 0,02$ ) nachgewiesen werden. In der anti-MOG/Komplement-Gruppe konnte am 28. Tag nach Transplantation eine marginale Zunahme der *in situ* hybridisierten Zellen beobachtet werden, die in der PBS-Gruppe nicht vorhanden war. Zu allen Untersuchungszeitpunkten überlebten überraschenderweise in der PBS-Kontrollgruppe signifikant mehr Zellen als in der anti-MOG/Komplement-Gruppe ( $p < 0,001$ ) (Abb. 18).

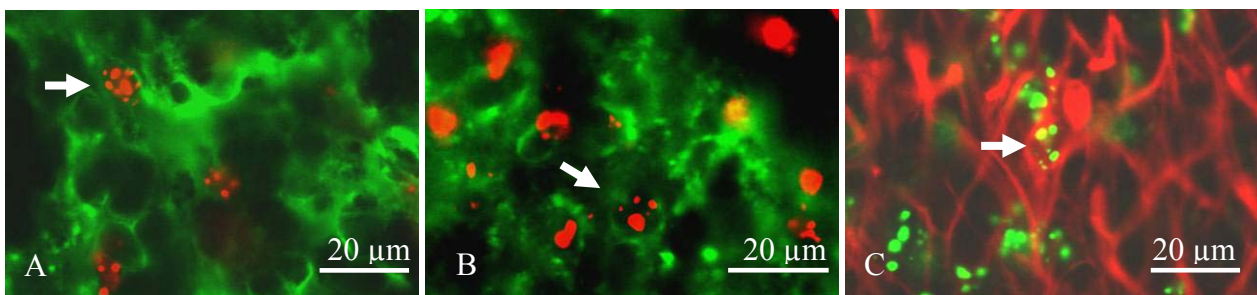


**Abb. 18: Überleben der transplantierten Zellen im Zeitverlauf (Gesamtdarstellung von PBS- und anti-MOG/Komplement-Gruppe).**

Die Grafik zeigt den Vergleich der Anzahl überlebender Zellen nach Transplantation in einen anti-MOG/Komplement-induzierten inflammatorischen Entmarkungsherd ( $n=8$  pro Zeitpunkt) im Zeitverlauf im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe ( $n=4$  pro Zeitpunkt/ Tag 14  $n=2$ ). Zu jedem Untersuchungszeitpunkt überlebten signifikant mehr Zellen in der PBS-Kontrollgruppe als in der anti-MOG/Komplement-Gruppe. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Stab. \*  $p < 0,001$ , statistische Analyse mit Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test.

#### 4.4 Differenzierungspotential ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in einen inflammatorischen Entmarkungsherd

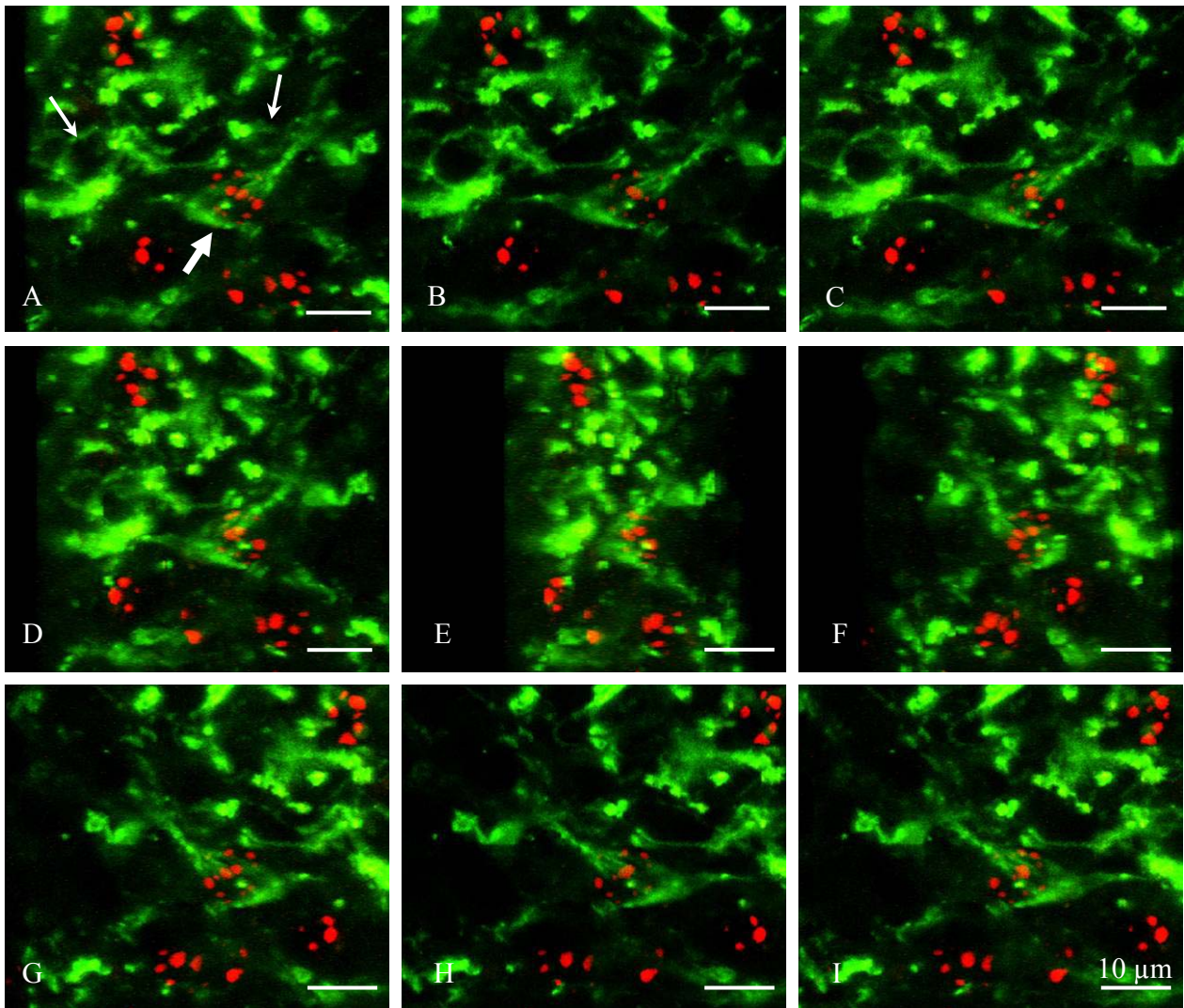
Nach Identifikation der Spenderzellen mit Fluoreszenz DNA *in situ* Hybridisierung erfolgte die Charakterisierung dieser Zellen durch immunhistochemische Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen CNP oder GFAP. Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop zeigten Doppelmarkierungen hybridisierter Zellkerne mit CNP oder GFAP in einem großen Teil der transplantierten Zellen (Abb. 19).



**Abb. 19: Doppelmarkierung der durch DNA *in situ* Hybridisierung detektierten Donorzellen mit oligodendrozyten- und astrozytenspezifischen Markern**

Die *in vivo* Differenzierung der Transplantate in gliale Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten konnte durch immunhistochemische Doppelmarkierung der durch DNA *in situ* Hybridisierung detektierten Donorzellen mit oligodendrozyten (CNP) - und astrozytenspezifischen (GFAP) Markern nachgewiesen werden. (A-B) *In situ* hybridisierte Donorzellen (rot) und CNP-positives Signal (grün), sieben (A) und 28 (B) Tage nach Transplantation in den anti-MOG/Komplement-induzierten Demyelinisierungsherd. (C) Darstellung der *in situ* hybridisierten Donorzellen (grün) und GFAP-positives Signal (rot) 28 Tage p.t.. Die Pfeile weisen auf doppelmarkierte Zellen. Die Aufnahmen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop) angefertigt.

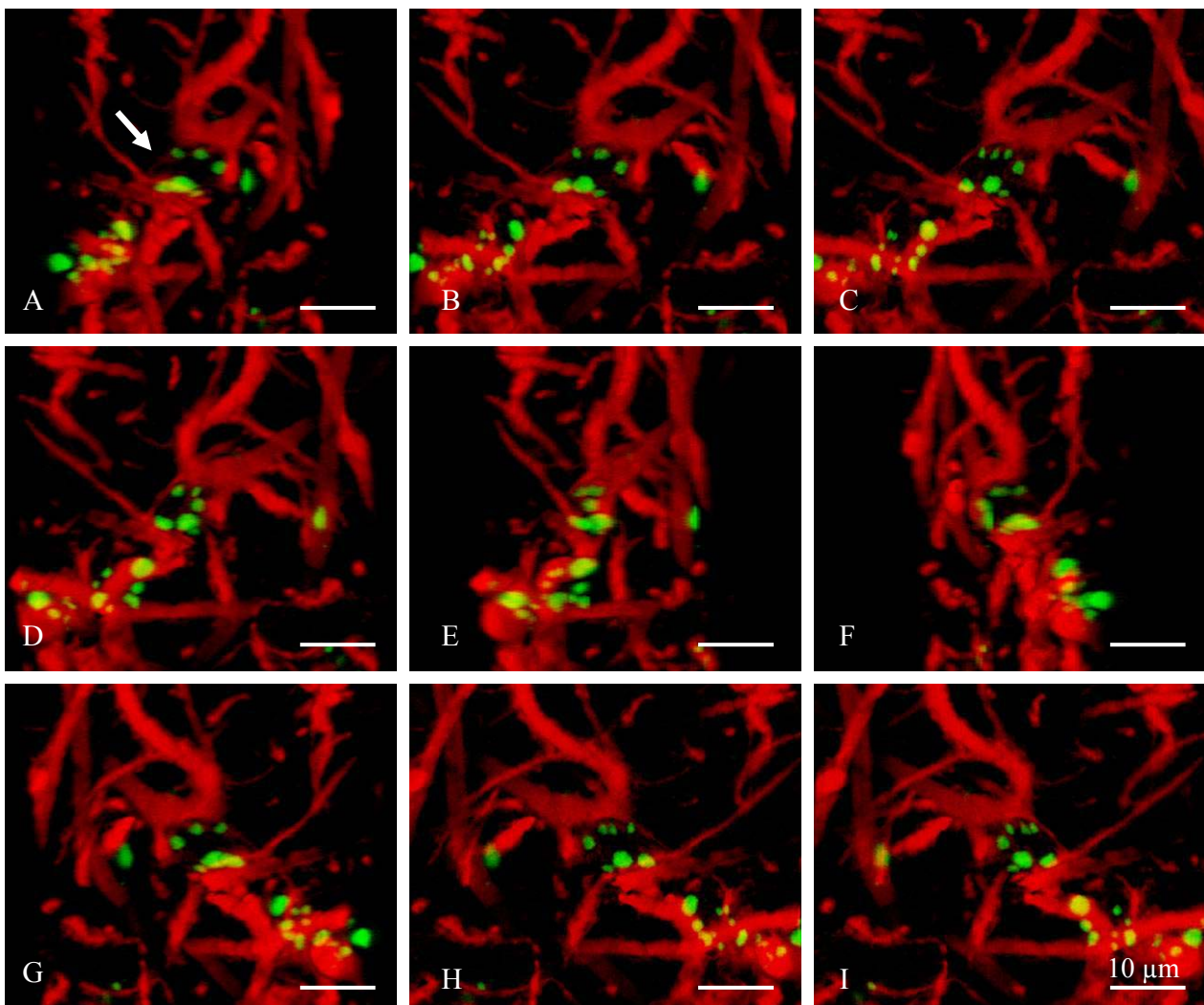
Detailliertere Untersuchungen an einem konfokalen Mikroskop bestätigten eindeutig die Expression von CNP in den mittels DNA *in situ* Hybridisierung detektierten Donorzellen (Abb. 20).



**Abb. 20: Konfokale Laserscanmikroskopie einer CNP-positiven Donorzelle 7 Tage p.t.**

Bestätigung der Expression des oligodendrozytenspezifischen Proteins CNP (grün) in hybridisierten Donorzellen (rot). Zwischen den Abbildungen A bis E und F bis I beträgt die Änderung des Drehwinkels jeweils 25 Grad, zwischen E und F liegen 50 Grad. Der kräftige weiße Pfeil in Abbildung A markiert die CNP-positive Donorzelle, der schmale Pfeil einen wirtseigenen Oligodendrozyten. Das punktförmige Signal des *in situ* hybridisierten Zellkerns wurde von aufgelockert wirkendem CNP-positivem Signal umgeben (fetter weißer Pfeil). Vom Zellkörper ließen sich zwei zarte Ausläufer in diametraler Richtung nachweisen. Dem überwiegenden Teil der CNP-positiven rundlichen Strukturen, die vereinzelt feine Ausläufer besaßen, konnte jedoch kein *in situ* hybridisierter Zellkern zugeordnet werden (schmale weiße Pfeile). Hier handelte es sich wahrscheinlich um wirtseigene CNP-exprimierende Oligodendrozyten.

Die Expression des Astrozytenmarkers GFAP der durch DNA *in situ* Hybridisierung detektierten Donorzellen wurde ebenfalls mittels konfokaler Mikroskopie verifiziert (Abb. 21).



**Abb. 21: Konfokale Laserscanmikroskopie einer GFAP-positiven Donorzelle**

Bestätigung der Expression des Astrozytenmarkers GFAP (rot) durch *in situ* hybridisierte Donorzellen (grün). Zwischen den Abbildungen A bis I beträgt die Änderung des Drehwinkels jeweils 25 Grad. Der weiße Pfeil in Abbildung A markiert die GFAP-positive Donorzelle. Vom GFAP-positiven Zellkörper ziehen zahlreiche kräftige, solide Ausläufer in mehrere Richtungen. Im weiteren Verlauf verzweigen sie sich zunehmend in immer feinere Fortsätze.

Diese Daten zeigen die oligodendrogliale und astrozytäre Differenzierung ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in einen lokalisierten inflammatorischen Entmarkungsherd.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Anti-MOG/Komplement-induzierte lokalisierte inflammatorische Entmarkung - Ein Modell zur Untersuchung myelinisierender Transplantate

In dieser Arbeit wurde ein reduktionistisches Modell einer inflammatorischen demyelinisierenden Erkrankung durch lokale Injektion von Antikörpern und Komplement verwendet, um das Überlebens- und Differenzierungspotential transplantierte Zellen zu untersuchen. Die lokale Injektion von Antikörpern gegen Myelin- und Oligodendrozytenantigene zusammen mit Komplement wurde in der Vergangenheit erfolgreich angewandt, um umschriebene demyelinisierte Areale mit ausreichendem Axonerhalt und erhaltener Remyelinisierungsfähigkeit endogener Vorläuferzellen zu erzeugen. In vorangegangenen Studien erfolgte die Induktion einer fokalen Läsion zumeist im Rückenmark (Blakemore et al. 2000; Liu et al. 2000; Shields et al. 1999) oder im kaudalen Kleinhirnschenkel (Woodruff et al. 1999a). Untersuchungen am Corpus Callosum wurden nur von wenigen durchgeführt (Gensert et al. 1997). Dabei bietet das Corpus Callosum durch seine Größe und gute operative Zugänglichkeit hervorragende Möglichkeiten, um lokalisierte Demyelinisierungsprozesse im adulten ZNS zu induzieren, Interventionen am gleichen Tier zu wiederholen und einen verlässlichen Vergleich mehrerer Tiere durchzuführen. Aus den genannten Gründen wurde in dieser Arbeit das Corpus Callosum als anatomische Struktur zur Untersuchung gewählt. Eine ausgedehnte Vorversuchsreihe diente zur Ermittlung der optimalen stereotaktischen Koordinaten. Ausgehend vom Bregma wurden die Parameter in drei Ebenen variiert. Der optimale laterale Koordinatenpunkt lag bei 2,0 mm. Bei Wahl eines geringeren lateralen Abstandes bestand die Gefahr, den venösen Sinus zu verletzen, bei größerem Abstand nahm der dorso-ventrale Durchmesser des Corpus Callosum und damit das mögliche Volumen für ein Demyelinisierungsareal ab. Eine Injektionstiefe von 2,2 mm unter Dura-Niveau, führte zu einer Applikation der Substanz ins Zentrum des Genu Corporis Callosi. Injektionstiefen von weniger als 2,2 mm resultierten in intracortikalen Depositionen, ein Einführen der Kapillare weiter als 2,3 mm führte zur Injektion der Substanz ins Striatum. Der optimale rostro-caudale Koordinatenpunkt lag 0,2 mm caudal des Bregma. Diese Koordinaten ergaben eine optimale ventrale und laterale Ausdehnung der Demyelinisierung. Zur Induktion des inflammatorischen Entmarkungsherd wurde 1 µl eines Gemisches aus anti-MOG-Antikörper und Meerschwein-Komplement eingesetzt. Die Konzentration des Antikörper/Komplement-Gemisches wurde mit

einem Mischungsverhältnis 1:2 (Antikörper und 33% Meerschweinchen-Komplement in 0,1M sterilem PBS) in Anlehnung der Angaben aus der Literatur gewählt, wobei in diesen Experimenten anti-Galactocerebroside-Antikörper (anti-GalC) verwendet wurde (Keirstead et al. 1997; Woodruff et al. 1999a). Eine stärkere Verdünnung des anti-MOG-Antikörpers mit 33%igem Komplement im Mischungsverhältnis von 1:20-1:100 bei gleicher injizierter Menge von 1 µl führte zu einem deutlich kleineren Volumen der Demyelinisierung. Vermutlich handelte es sich bei diesem Defekt um OP-bedingte Schäden. Untersuchungen zum Einfluss von Serumfaktoren bei der EAE zeigten eine strikte Komplementabhängigkeit der Demyelinisierungsaktivität. Möglicherweise schafft das Komplement zusätzliche Bindungsstellen zwischen Myelin und Antikörper, die zur besseren Antigenpräsentation (Opsonierung) und damit zu einer verstärkten Demyelinisierung führten (Grudke-Iqbal et al. 1981).

### ***5.1.1 Demyelinisierungsmodelle im Vergleich***

In der Vergangenheit sind eine Vielzahl von Tiermodellen eingesetzt worden, um die myelinogene Kapazität von transplantierten Gliazellen zu untersuchen. Nach Transplantation primärer oligodendroglialer Vorläuferzellen in myelindefiziente neonatale Mutanten konnte die Bildung von Myelin im Empfängertier nachgewiesen werden (Duncan et al. 1997a). Durch die begrenzte Überlebensdauer derartiger Mutanten sind Studien an adulten Tieren und demzufolge Aussagen zum Verhalten transplanteder Zellen in adultem Gewebe im Allgemeinen nicht möglich. Die Injektion myelintoxischer Chemikalien, wie Ethidiumbromid oder Lysolecithin in Kombination mit Bestrahlung wurde oft angewandt, um fokale demyelinisierte Areale in adulten Tieren zu erzeugen und die Myelinisierungskapazität transplanteder Zellen zu untersuchen (Gensert et al. 1997; Groves et al. 1993; Keirstead et al. 1997; Shields et al. 1999). Diese Läsionen unterscheiden sich pathogenetisch und histomorphologisch von Entmarkungsherden bei demyelinisierenden Erkrankungen. Dabei führt die Injektion von Gliotoxinen überwiegend zu einer Demyelinisierung ohne inflammatorische Begleitreaktion. Zudem werden zahlreiche endogene Vorläuferzellen nach Toxinkontakt oder radiogen zerstört und können nicht zu myelinbildenden Zellen heranreifen. Mit der EAE steht ein komplexeres Modell zur Untersuchung entzündlicher Entmarkungserkrankungen des Menschen zur Verfügung. Neben der Demyelinisierung weist die EAE eine ausgeprägte inflammatorische Komponente auf. Da sich die genaue Lokalisation der Entmarkungsherde jedoch nicht vorhersagen lässt, ist eine gezielte,



intraläsionelle Transplantation von Zellen zur Untersuchung des Zellverhaltens nicht praktikierbar. Zudem weist ein systemisches Autoimmunmodell eine außerordentliche Komplexität auf und wurde deshalb bisher nur in wenigen Studien eingesetzt, um die Remyelinisierungskapazität von Zelltransplantaten zu untersuchen (Ben-Hur et al. 2003, Tourbah et al. 1997).

### ***5.1.2 Verhalten des anti-MOG/Komplement-induzierten Entmarkungsherd im Zeitverlauf***

In dieser Arbeit wurde das Verhalten des lokalisierten inflammatorischen Entmarkungsherd zwei bis 30 Tage nach Induktion der Demyelinisierung durch Injektion von 1 µl anti-MOG/Komplement-Gemisch untersucht. Bis auf wenige Ausnahmen war eine Verminderung oder ein Verlust der MBP-Immunreaktivität, als Zeichen des Demyelinisierungsprozesses, streng auf das Gebiet des Corpus Callosum beschränkt. Die wenigen Ausnahmen zeigten eine Verminderung der immunhistochemischen Reaktion auf MBP auch im angrenzenden Cortex und zwar in unmittelbarer Nachbarschaft zum Stichkanal. Dies legte die Vermutung nahe, dass die Applikation des Gliotoxins nicht optimal ins Genu Corporis Callosi, sondern zu weit dorsal erfolgte. Möglicherweise entstand der Defekt aber auch nach korrekt erfolgter Deposition post applicationem durch einen Rückfluss des Gliotoxin-Gemisches entlang des Stichkanals, nach Entfernen der Kapillare.

Schon zum frühesten Untersuchungszeitpunkt, zwei Tage p.i., konnte eine Demyelinisierungsreaktion anhand einer schwächeren immunhistochemischen Reaktion gegen MBP nachgewiesen werden. Dabei war der Gewebeverband weitgehend intakt, die Myelinscheiden waren in ihrer Kontinuität nicht unterbrochen (Vgl. Abb. 12-A). Fünf Tage p.i. war ein fast vollständiger Verlust der MBP-Reaktivität mit nur im Zentrum vereinzelt vorhandenen, in ihrer Kontinuität unterbrochenen, Myelinscheiden nachweisbar (Vgl. Abb. 9). Das Volumen der Demyelinisierung erreichte fünf Tage nach Induktion ein Maximum und nahm dann bis 30 Tage p.i. kontinuierlich ab. Schließlich stellte sich nur noch ein strichförmig ausgezogenes Areal mit fehlender MBP-Reaktivität dar (Vgl. Abb. 12). Eine Verkleinerung der Läsion zeigte sich insbesondere in dorso-ventraler Richtung. Dies ist möglicherweise Ausdruck einer vom Rand der Läsion zum Zentrum fortschreitenden endogenen Remyelinisierung, wie sie in Gliotoxin-induzierten lokalisierten Demyelinisierungsherden im ZNS adulter Ratten beobachtet wurde (Shields et al. 1999). Am neunten Tag p.i. waren rundliche MBP-positive

Strukturen über die ganze Läsion verteilt (Vgl. Abb. 12-C<sub>4</sub>). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um Myelin endogener Oligodendrozyten, die zur Remyelinisierung in die Läsion rekrutiert worden waren. In der Vergangenheit wurden solche Myelinstrukturen in einer demyelinisierten Läsion im Corpus Callosum adulter Ratten als „Doughnut-ähnlich“ beschrieben (Gensert et al. 1997). Dreißig Tage p.i. waren im Randbereich der Läsion zahlreiche Axone erkennbar, die in ihrem Verlauf von MBP-positiven laminaren Strukturen begleitet wurden (Vgl. Abb. 12-E<sub>4</sub>). Vermutlich handelte es sich hierbei um Myelinscheiden, die nach Rekrutierung endogener Oligodendrozyten neu gebildet worden waren. Bis zum Zeitpunkt 30 Tage p.i. konnte jedoch keine restitutio ad integrum nachgewiesen werden. Möglicherweise war aber auch der Untersuchungszeitraum bis maximal 30 Tage nach Induktion der Demyelinisierung nicht ausreichend, um eine vollständige Wiederherstellung zu erzielen. Andererseits könnte es sich bei der verbliebenen Läsion um einen mechanisch erzeugten Schaden handeln, welcher entweder durch das Einführen der Glaskapillare und der damit verbundenen Durchtrennung der dicht gepackten und dünnen, empfindlichen Axone im Corpus Callosum und/oder durch die druckbedingte Injektion der Flüssigkeit verursacht wurde. Der darauf folgende Untergang der Axone könnte dann zu einem sekundären Myelinverlust und einem bleibenden Defekt geführt haben. Neben der gezielten Destruktion ausgereifter Oligodendrozyten durch anti-MOG-Antikörper kann ein Kollateralschaden endogener Oligodendrozytenvorläufer nicht ausgeschlossen werden. MOG wurde lange als spezifischer Marker differenzierter Oligodendrozyten erachtet (Coffey et al. 1997; Scolding et al. 1997; Slavin et al. 1997; Solly et al. 1996). Kürzlich wurde dieses Glykoprotein jedoch auch in NG2- und PDGFR $\alpha$ -positiven Oligodendrozytenvorläuferzellen nachgewiesen (Li et al. 2002). Allerdings läßt die ausgeprägte spontane Remyelinisierung in unserem Modell vermuten, dass die anti-MOG/Komplement-induzierte Demyelinisierung den überwiegenden Teil der endogenen Oligodendrozytenvorläufer intakt ließ.

Die Detektion der Axone erfolgte mit einer Färbung gegen Neurofilament. Zu allen Zeitpunkten der Untersuchung konnten intakte Axone nachgewiesen werden. Axontorpedos und dystrophe Axone ließen sich sowohl in der anti-MOG/Komplement-Gruppe als auch in der PBS-Kontrollgruppe, ohne offensichtlichen Unterschied zwischen den Gruppen darstellen. Hier handelte es sich vermutlich zumeist um Axondegenerationen nach mechanischem Schaden. In einigen Präparaten, insbesondere der anti-MOG/Komplement-Gruppe 16 und 30 Tage p.i., zeigte das Gewebe im Zentrum der Läsion eine fast vollständig fehlende Immunreaktivität für MBP und

NF200 (Vgl. Abb. 12-D4). Die fortschreitende inflammatorische Reaktion hatte zu ödematösen Veränderungen des Gewebes geführt, was die Vermutung nahe legt, dass diese Gewebeanteile während der immunhistochemischen Färbungen, die überwiegend an frei schwimmenden Schnitten durchgeführt wurden, aus dem Gewebeverband herausgelöst wurden. Damit entstand der Eindruck von Pseudozysten. Die HE-Färbung wurde hingegen an aufgezogenen Schnitten durchgeführt, so dass es hier nicht zu einem Verlust des zentralen ödematös-fragilen Gewebeabschnittes kam.

Mit der HE-Färbung wurde die ausgeprägte inflammatorische Komponente, die durch eine massive Zellinfiltration hauptsächlich lympho- und monozytärer Zellen gekennzeichnet war, nachgewiesen (Vgl. Abb. 10). Eine derartige Infiltration mit Leukozyten, Makrophagen und Mikroglia mit gutem Axonerhalt wird auch in akuten Entmarkungsherden bei der MS beobachtet (Adams et al. 1989; Adams et al. 1990).

### ***5.1.3 Grenzen des anti-MOG/Komplement-induzierten Entmarkungsmodells***

Einer Reihe von Fragestellungen sind an einem lokalisierten Entmarkungsmodell, wie der anti-MOG/Komplement-induzierten Demyelinisierung, Grenzen gesetzt. Transplantationsstudien an einem akuten Modell repräsentieren nur die akuten Plaques im Verlauf chronisch demyelinisierender Krankheiten wie der MS. Myelinregeneration ist zu Beginn der Erkrankung partiell noch durch spontane endogene Remyelinisierung möglich. Neben akuten Läsionen bestimmt die Anwesenheit chronischer Plaques das pathologische Bild der MS. Diese Phase ist gekennzeichnet durch die Erschöpfung des endogenen Zellpools remyelinisierender Zellen, Axonuntergang und Glianarbenbildung. Aussagen über Verhalten und Remyelinisierungskapazität transplanteder Zellen in chronischen Plaques konnten deshalb mit diesem Modell nicht getroffen werden.

Des Weiteren repräsentiert das lokale anti-MOG/Komplement-induzierte Modell nur eine fokale Läsion in einem Individuum. Demyelinisierende Erkrankungen wie die MS sind jedoch multifokal lokalisiert und beziehen große Abschnitte von Gehirn und Rückenmark mit ein. Aussagen zum Verhalten multipler Läsionen können nicht vorgenommen werden. Einflüsse komplexer systemischer Immunreaktionen, wie sie bei der MS beobachtet werden bleiben ebenso unberücksichtigt.

## **5.2 ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen überleben und differenzieren in einem inflammatorischen Demyelinisierungsherd**

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen nach Transplantation in einen akuten, lokalisierten, stark inflammatorischen Entmarkungsherd überleben und in reife Gliazellen - Astrozyten und Oligodendrozyten - ausdifferenzieren können. Zu allen Zeitpunkten waren die Donorzellen mit geringer Streuung im demyelinisierten Areal lokalisiert. Es zeigte sich kein Hinweis auf atypisches proliferatives Verhalten oder Teratombildung, wie es beispielsweise nach ES-Zell-Transplantation in ein Tiermodell einer Parkinsonerkrankung beobachtet wurde (Björklund et al. 2001).

### ***5.2.1 Überleben ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in anti-MOG/Komplement-induzierte Entmarkungsherde***

Zu allen Untersuchungszeitpunkten, bis einschließlich vier Wochen nach Transplantation der Zellen in die Läsion, ist der Nachweis überlebender Donorzellen gelungen. Bei bilateraler Injektion der Zellen ins Corpus Callosum wurde zunächst eine seitengetrennte Quantifizierung durchgeführt, um mögliche intraindividuelle Interaktionen bei Induktion zweier Läsionen in einem Versuchstier auszuschließen. Es zeigte sich eine höhere Zahl überlebender Zellen in der linken Hemisphäre im Vergleich zur Gegenseite. Signifikante Unterschiede waren jedoch nur in der PBS-Gruppe drei Tage ( $p < 0,005$ ) und 14 Tage ( $p < 0,05$ ) nach Transplantation vorhanden. Wobei vierzehn Tage p.t. in der Kontrollgruppe nur ein Versuchstier untersucht wurde und eine valide Aussage beim Vergleich von nur zwei Läsionen nicht möglich ist. Mit Ausnahme der PBS-Kontrollgruppe drei Tage p.t. konnte somit kein signifikanter Unterschied zwischen dem Überleben der Donorzellen nachgewiesen werden. Für die weitere statistische Auswertung konnten die Läsionen als voneinander unabhängig betrachtet und die Werte der rechten und linken Hemisphäre zu einem Gesamtwert zusammengefasst werden. Die geringfügig niedrigere Zahl überlebender Zellen rechtshemisphärisch ist aus dem Ablauf des Experimentes zu erklären. Die Lagerung der Zellen auf Eis während des Versuchs führte zum Abfall der Zellvitalität am Ende des Experimentes auf  $45,6\% \pm 16,3\%$  der Anzahl vitaler Zellen der frischen Zellpräparation. Bei stets linkshemisphärischem Beginn mit der Zellinjektion gelangten somit jeweils mehr vitale Zellen in die linke als in die rechte Hemisphäre.

Im Vergleich der Anzahl überlebender Zellen zwischen der anti-MOG/Komplement-Gruppe und PBS-Kontrollgruppe im Zeitverlauf zeigte sich ein überraschendes Ergebnis. Zu allen Untersuchungszeitpunkten überlebten in der PBS-Kontrollgruppe signifikant mehr Zellen als in der anti-MOG/Komplement-Gruppe. Möglicherweise wurden im lokalisierten anti-MOG/Komplement-induzierten inflammatorischen Demyelinisierungsprozess Mediatoren freigesetzt, die in der PBS-Gruppe nicht vorhanden waren und die zum Zelluntergang transplanteder Zellen führten. Diese Daten stehen im Widerspruch zu Ergebnissen die nach Transplantation von HOECHST-markierten CG4-Zellen ins Rückenmark adulter Ratten nach Induktion einer EAE gewonnen wurden. Im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren fanden sich in den Empfängertieren mit EAE mehr überlebende HOECHST-markierte Zellen, welche sich zudem über wesentlich weitere Strecken im Nervensystem verbreitet hatten (Tourbah et al. 1997). Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die im Rahmen einer EAE auftretenden entzündlichen Veränderungen Überleben und Migrationsverhalten glialer Vorläuferzellen positiv beeinflussen. Für eine Reihe von Zytokinen, Wachstums- und Überlebensfaktoren konnte *in vitro* ein Einfluss auf Oligodendrozytenvorläufer gezeigt werden (Barres et al. 1994; Grinspan et al. 1993; McMorris et al. 1996). Eine mögliche Erklärung für die im Widerspruch stehenden Ergebnisse dieser Arbeit und der Studie von Tourbah et al. 1997 bieten die unterschiedlichen Eigenschaften von Zelllinien wie CG4-Zellen und ES-Zell-abgeleiteten Vorläuferzellen. Um eine valide Antwort darauf zu finden, wären vergleichbare Experimente mit beiden Zelltypen und detaillierte Untersuchungen der molekularen Abläufe während des inflammatorischen Demyelinisierungsprozesses notwendig.

### ***5.2.2 Differenzierung ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen nach Transplantation in anti-MOG/Komplement- induzierte Entmarkungsherde***

Die Differenzierung transplanteder ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen in Oligodendrozyten wurde mit der Expression des myelinassoziierten Proteins CNP, die Differenzierung in Astrozyten mit der Expression des Astrozytenmarkers GFAP durch in hybridisierten Donorzellen nachgewiesen (Vgl. Abb. 20, 21). Hybridisierte Donorzellen wiesen größtenteils aber weder eine CNP- noch eine GFAP-Expression auf. Wahrscheinlich waren sie in einem undifferenzierten Stadium verblieben. Um diese Frage zu beantworten, müssten Färbungen mit Antikörpern gegen vorläuferzellspezifische Antigene durchgeführt werden.

In den angewendeten Blockfärbetechniken waren sowohl die Antikörperpenetration als auch die Eindringtiefe immunhistochemischer Reagenzien begrenzt. Bei der Auswertung der 40 µm dicken Schnittpräparate am konfokalen Laserscanmikroskop erfolgte ein Scannen in 0,5 µm Schichten. Signale der immunhistochemischen Färbungen waren nur über insgesamt 20 µm nachweisbar, so dass nicht alle vorhandenen Zellen und Zellbestandteile zur Darstellung kamen. Damit war die eindeutige Zuordnung von CNP-positiven Internodien und GFAP-positiven Zellfortsätzen zu verschiedenen *in situ* hybridisierten Donorzellen oder wirtseigenen Zellen limitiert und eine Quantifizierung nicht möglich. Eine Analyse des Einflusses der stark inflammatorischen Umgebung und die Präsenz demyelinisierter Axone auf die *in vivo* Differenzierung konnte deshalb nicht durchgeführt werden.

### **5.2.3 Grenzen des Transplantationsexperimentes**

Nachdem eine Differenzierung *in vivo* in reife Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen wurde, richtet sich eine wichtige Fragestellung darauf, inwieweit die Donorzell-abgeleiteten reifen Oligodendrozyten demyelinisierte Axone aufsuchen, neue Myelinscheiden bilden und damit aktiv an einer Remyelinisierung teilnehmen können. Dem alleinigen Einsatz von immunhistochemischen Färbungen, wie sie hier angewandt wurden, sind dabei Grenzen gesetzt. Um aussagekräftige Befunde zu erheben, müssten in nachfolgenden Studien zusätzlich elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden.

Darüber hinaus sind bei Anwendung eines akuten lokalisierten inflammatorischen Demyelinisierungsmodells zur Untersuchung des Verhaltens transplantierte Zellen in der Läsion weitere Fragen nicht zu beantworten. Beispielsweise erlaubt ein lokales inflammatorisches Demyelinisierungsmodell keine Aussagen zum Verhalten transplantierte Zellen im Kontext einer systemischen Immunreaktion, wie sie bei humanen demyelinisierenden Erkrankungen vorhanden ist. Des Weiteren war die Beobachtung des Zellverhaltens in diesem Experiment auf einen Untersuchungszeitraum von maximal vier Wochen nach Transplantation begrenzt. Angaben zum Langzeitverhalten sind nur in nachfolgenden Studien mit längeren Überlebenszeiten der Versuchstiere möglich.

Dennoch zeigen die gewonnenen Daten zeigen, dass ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen nach Transplantation in lokalisierte demyelinisierte Läsionen mit akuter inflammatorischer Reaktion überleben und differenzieren. Das deutet darauf hin, dass die Verwendung embryonaler

Donorzellen langfristig für die Behandlung demyelinisierender Erkrankungen wie der MS in Betracht gezogen werden könnte.

### **5.3 ES-Zellen – eine geeignete Spenderquelle für remyelinisierende Transplantate?**

Bei Erkrankungen des ZNS wie zum Beispiel Schlaganfall, Morbus Parkinson oder Multiple Sklerose, die durch Verlust neuronaler oder glialer Zellen gekennzeichnet sind, bieten Zellersatzstrategien einen hoffnungsvollen Therapieansatz. Ein Kernproblem von Transplantationsstrategien ist die Verfügbarkeit geeigneten Spendergewebes. Große Hoffnung wird in die Verwendung von ES-Zellen zum Ersatz dysfunktioneller oder zu Grunde gegangener Zellen im ZNS gesetzt. Neben ihrer Pluripotenz stellen sie durch ihre nahezu uneingeschränkte Vermehrbarkeit prinzipiell eine unerschöpfliche Spenderquelle für Zelltransplantate dar. In den letzten Jahren wurde intensiv daran gearbeitet, ES-Zellen gezielt in Kultur in therapeutisch relevante Zelltypen ausreifen zu lassen. Eine Vielzahl von Zellpopulationen sind in differenzierenden Kulturen muriner ES-Zellen beschrieben, so z.B. hämatopoietische Zellen (Gutierrez-Ramos et al. 1992; Palacios et al. 1995), insulinproduzierende Zellen (Lumelsky et al. 2001; Soria et al. 2000), Herzmuskelzellen (Klug et al. 1996; Maltsev et al. 1994; Wobus et al. 1997) und Zellen des Nervensystems (Bain et al. 1995; Brüstle et al. 1999a; Fraichard et al. 1995; Lee et al. 2000; Li et al. 1998; Okabe et al. 1996; Strübing et al. 1995; Wernig et al. 2002). Ziel bei Zellersatztherapien demyelinisierender Erkrankungen ist es, Oligodendrozytenvorläuferzellen oder Oligodendrozyten aus ES-Zellen zu generieren, die in der Lage sind nach Transplantation demyelinisierte Areale zu remyelinisieren.

#### ***5.3.1 Gewinnung hoch aufgereinigter bipotenter, oligoastrozytärer Vorläuferzellen aus murinen ES-Zellen***

Mit der Etablierung eines komplexen Differenzierungsprotokolls konnten in der Vergangenheit bipotente gliale Vorläuferzellen aus murinen ES-Zellen in einer hochaufgereinigten Form gewonnen werden. Diese Vorläuferzellen proliferierten in Anwesenheit von FGF2, EGF und PDGF und differenzierten nach Transplantation in das Nervensystem von *md* Ratten in Astrozyten und myelinisierende Oligodendrozyten (Brüstle et al. 1999a). Allerdings differenzierte nur ein Teil dieser Vorläuferzellen zu Oligodendrozyten aus. Vier Tage nach

Wachstumsfaktorentzug exprimierten weniger als 40% der Zellen oligodendrozytenspezifische Marker. Der überwiegende Teil der Zellen zeigte astrozytenspezifische Antigene oder verblieb in einem glialen Vorläuferzellstadium (Brüstle et al. 1999a).

In dieser Arbeit wurden durch Anwendung dieses Differenzierungsprotokolls ebenfalls bipotente ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen in einem hohen Reinheitsgrad gewonnen. Die terminale Differenzierung in reife gliale Zellen *in vitro* wurde durch Wachstumsfaktorentzug ausgelöst. Dabei betrug vier Tage nach Wachstumsfaktorentzug der Anteil GFAP-positiver astrozytärer Zellen  $67,8\% \pm 35,0\%$ , während sich nur  $10,6\% \pm 6,0\%$  der Zellen O4-positiv darstellten. Unmittelbar vor Wachstumsfaktorentzug konnte bei Betrachtung der Zellkulturen am Lichtmikroskop jedoch ein sehr hoher Anteil oligodendroglialer Vorläuferzellen beobachtet werden (Vgl. Abb. 13). Eine exakte Quantifizierung wurde nicht durchgeführt. Für die Diskrepanz des visuell hohen oligodendroglialen Anteils *vor* und des quantitativ doch recht geringen Anteils *nach* Wachstumsfaktorentzug können im Wesentlichen zwei Erklärungen gefunden werden. Erstens könnte die oligodendrogliale Vorläuferzellpopulation auf Grund ihrer grazen Struktur weniger fest an der Zellkulturschale gehaftet haben. Möglicherweise kam es während der Fixierung und des Färbeprozesses zu einem Verlust der fragilen Oligodendrozyten wohingegen die astrozytären Zellen fester am Boden der Zellkulturschale hafteten und sich nicht beim Waschvorgang ablösten. Eine zweite Erklärung könnten die *in vitro* Bedingungen während des Wachstumsfaktorentzugs geben. Denkbar ist, dass unter Zellkulturbedingungen durch Wachstumsfaktorentzug ein Milieu geschaffen wurde, dass generell zwar die Differenzierung in beide gliale Zelltypen ermöglichte, dabei die astrozytäre Linie aber favorisierte. Vorstellbar ist aber auch ein individueller Fehler, da nach Angaben aus der Literatur bei Anwendung dieses Zellkulturprotokolls und identischer Vorgehensweise ein oligodendroglialer Zellanteil zwischen 20% und 40% erzielt werden konnte (Brüstle et al. 1999a, Perez-Bouza et al. 2005).

Voraussetzung für einen möglichen klinischen Einsatz ist die Gewinnung von reinen Zellpopulationen mit einem hohen Prozentsatz an oligodendroglialen Vorläuferzellen. Damit verbunden wäre eine höhere Effizienz der transplantierten Zellen und eine geringere Wahrscheinlichkeit der spontanen Differenzierung in nicht erwünschte Zelllinien im Vergleich zur Transplantation undifferenzierter embryonaler Stammzellen, insbesondere aber auch ein reduziertes Risiko der Teratombildung (Keirstead 2001; Loebel et al. 2003; Schmandt et al. 2005). Zahlreiche Versuche wurden unternommen, um den geringen Anteil oligodendroglialer Zellen *in vitro* zu steigern. Ergebnisse von Liu et al. (2000) zeigten, dass aus Gliazellen



bestehende Sphären unter Einfluss von Retinsäure gewonnen werden konnten, die nach dem Plattieren zu 90% in Oligodendrozyten differenzierten. Erst kürzlich ist es gelungen mittels gerichteter Differenzierung unter Anwesenheit von Wachstumsfaktoren in Kombination mit Lineage-Selektion genetisch manipulierter muriner ES-Zellen – die Zellen enthielten ein Neomycin-Resistenz-Gen unter Kontrolle des Maus-Oligodendrozyten-spezifischen CNP Promotors I und II (CNP- $\beta$ geo) - eine homogene Zellpopulation oligodendroglialer Vorläuferzellen zu generieren und nach Transplantation ins Rückenmark hereditärer *md* Ratten eine Ausreifung in myelinisierende Oligodendrozyten nachzuweisen (Glaser et al. 2005).

Eine unabdingbare Voraussetzung für die therapeutische Anwendung Zelltransplantat-vermittelter Myelinersatzstrategien ist die Übertragbarkeit der an Nagern gewonnenen Daten auf den Menschen.

Die Gewinnung humaner Oligodendrozyten und Oligodendrozytenvorläuferzellen in einem hohen Reinheitsgrad aus genetisch nicht manipulierten humanen ES-Zellen und Myelinisierung nach Transplantation dieser Zellen in das Rückenmark von *shi* Mäusen wurde erst kürzlich nachgewiesen (Nistor et al. 2005).

### **5.3.2 Grenzen von Zellersatzstrategien bei demyelinisierenden Erkrankungen**

Demyelinisierende Erkrankungen wie die MS sind multifokal lokalisiert und beziehen große Abschnitte von Gehirn und Rückenmark mit ein. Dementsprechend wäre für eine effiziente Rekonstruktion die Einschleusung von Spenderzellen mittels Transplantation in eine Vielzahl von Läsionen und Hirnregionen erforderlich. Aus rein praktischen Gründen ist das für die therapeutische Anwendung kein gangbarer Weg. In früheren Studien an unreifen Empfängertieren konnte gezeigt werden, dass multipotente Stammzellen nach Transplantation in das Ventrikelsystem ins embryonale und neonatale Gehirn migrierten und eine Myelinbildung in multiplen Hirnregionen möglich war (Learish et al. 1999; Yandava et al. 1999). Das Verhalten im adulten ZNS war bis vor kurzem noch unklar. Jüngst konnte gezeigt werden, dass multipotente neurale Vorläuferzellen, die aus dem Striatum neonataler Ratten gewonnen und zu Neurosphären expandiert wurden, nach intrathekaler oder intraventrikulärer in multiple EAE-Läsionen adulter Tiere migrieren können (Ben-Hur et al. 2003). In anderen Studien konnte eine Migration von aus dem Gehirn adulter Mäuse gewonnener neuraler Vorläuferzellen in multiple EAE-Läsionen nach intrathekaler und intravenöser Transplantation nachgewiesen werden (Pluchino et al. 2003). Die

Möglichkeit, durch zerebroventrikuläre Transplantation oder gar durch einfache intravenöse Applikation Zellen gezielt in multiple chronisch läionierte Areale des adulten ZNS zu rekrutieren, eröffnet neue Perspektiven für einen klinischen Einsatz.

Anzumerken bleibt, dass neurale Transplantate trotz allem lediglich eine Reparatur bereits eingetretener Läsionen bewirken können, während der Krankheitsprozess selbst dadurch nicht beeinflusst wird. In zukünftigen Strategien für remyelinisierende Transplantate könnte deshalb beispielsweise die Implantation geeigneter Spenderzellquellen, wie ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen, mit Donorzell-vermittelter Freisetzung neuroprotektiver Faktoren kombiniert werden.

#### **5.4. Perspektiven und Risiken**

Als Donorquelle für remyelinisierende Zelltransplantate sind ES-Zellen durch ihre nahezu uneingeschränkte Vermehrbarkeit und Pluripotenz eine echte Alternative. Daneben bieten sie einen weiteren entscheidenden Vorteil gegenüber primären Zelllinien oder anderen neuronalen Vorläufern. Da es sich um eine stark proliferationsaktive Zellpopulation handelt, sind an ES-Zellen auch komplexe genetische Veränderungen durchführbar. Auf therapeutische Anwendungen übertragen würde es diese Methode erlauben, genetisch speziell auf die Indikation abgestimmte Spenderzellen zu erzeugen oder Krankheitsgene, die an der Pathogenese der jeweiligen Erkrankung beteiligt sind, vor der Transplantation aus den Zellen zu entfernen.

Seit der Herstellung des Klonschafes „Dolly“ zeichnen sich Perspektiven ab, durch Kernverpflanzung bzw. Reprogrammierung des Zellkerns embryonale Stammzellen aus demselben Organismus zu gewinnen (Wilmut et al. 1997) und damit autologes Spendergewebe für Zellersatztherapien zu verwenden. Auf diese Weise wäre es möglich, Transplantatabstoßungen, ein enormes Problem in der Transplantationsmedizin, zu umgehen. Allerdings würde das Verfahren der Kernreprogrammierung große Mengen an humanen Eizellen erfordern, deren Verfügbarkeit jedoch streng reglementiert ist.

Erkenntnisse in der Erforschung adulter Stammzellen haben in der Vergangenheit für Euphorie gesorgt. Weisen sie doch darauf hin, dass Stammzellen aus regenerativen Geweben wie dem Knochenmark auch Zellen nicht regenerativer Gewebe ausbilden können. Da diese Zellen vom selben Individuum stammen, könnten durch eine solche „Transdifferenzierung“ körpereigene Spenderzellen gewonnen und Abstoßungsreaktionen umgangen werden. Aus

Knochenmarkstransplantaten bei Versuchstieren ergaben sich Hinweise darauf, dass Zellen aus dem Knochenmark in das Gehirn einwandern und dort zu einem geringen Anteil neuronale Marker exprimieren können (Brazelton et al. 2000; Mezey et al. 2000; Priller et al. 2001). Ob es sich dabei wirklich um funktionell aktive Neurone handelte ist unklar. Einige Befunde mahnen zu einer vorsichtigen Interpretation von Transdifferenzierungsstudien. Nach Kokultur von adulten Knochenmarkszellen bzw. adulten neuralen Stammzellen mit embryonalen Stammzellen fand sich eine geringe Anzahl von Zellen, welche die Eigenschaften sowohl von adulten als auch von ES-Zellen aufwiesen. In weiteren Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass dem nicht eine Transdifferenzierung, sondern eine Fusion adulter und embryonaler Stammzellen zugrunde lag (Terada et al. 2002; Ying et al. 2002).

Der Einsatz von ES-Zellen geht jedoch weit über den Zellersatz hinaus. Die Stammzellforschung eröffnet der modernen Medizin faszinierende Perspektiven. Die grundlegenden Arbeiten zur Differenzierung embryonaler und gewebespezifischer Stammzellen werden dazu beitragen, die Mechanismen der Entstehung verschiedener Gewebe und Zelltypen besser zu verstehen. Auch für pharmakologische und toxikologische Studien können die aus humanen Stammzellen gewonnenen somatischen Zellen herangezogen werden. Die gezielte Modifizierung von Genen in humanen ES-Zellen wird es weiterhin ermöglichen, die molekularen Mechanismen vieler Erkrankungen an transgenen Zellen zu untersuchen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In inflammatorischen demyelinisierenden Erkrankungen des Menschen führt die limitierte Fähigkeit für endogene Regeneration zu bleibenden neurologischen Defiziten. Die Transplantation myelinisierender Zellen ist in der Vergangenheit als viel versprechende therapeutische Möglichkeit zunehmend ins Zentrum des klinischen Interesses gerückt. Tierexperimentelle Studien belegen, dass ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen nach Transplantation in embryonale, neonatale und adulte Nagetiere mit hereditären oder chemisch-induzierten Myelindekten effizient Myelinscheiden bilden. Die Überlebensfähigkeit und das Potential transplanteder ES-Zell-abgeleiteter glialer Vorläuferzellen zur Myelinisierung in akuten entzündlichen Läsionen adulter Tiere war bisher jedoch unklar.

Mit diesem Projekt sollten weitere Grundlagen für die Anwendung von ES-Zell-abgeleiteten glialen Vorläuferzellen als Donorquelle für Transplantations-vermittelte Therapien von Entmarkungserkrankungen erarbeitet werden. Zentrale Frage dabei war, ob ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen nach Transplantation in einen anti-MOG/Komplement-induzierten lokalisierten inflammatorischen Entmarkungsherd überleben und differenzieren. In einer ausgedehnten Vorversuchsreihe wurden zunächst durch Variation verschiedener Parameter wie der stereotaktischen Koordinaten, die Größe des injizierten Volumens, der Konzentration des anti-MOG/Komplement-Gemisches, der Beschaffenheit der Glaskapillare und der Zeitdauer der Applikation der Substanz die optimalen Bedingungen etabliert, um eine spezifische, lokal umschriebene, inflammatorische Demyelinisierung bei noch suffizientem Axonerhalt im Corpus Callosum adulter Wistar Ratten zu erzeugen. Anschließend erfolgte die Gewinnung einer hochaufgereinigten Population glialer Vorläuferzellen durch gezielte *in vitro* Differenzierung von murinen ES-Zellen. ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen wurden dann in einen zwei Tage alten Entmarkungsherd mit ausgeprägter inflammatorischer Komponente transplantiert. In einem Untersuchungszeitraum bis zu vier Wochen nach Transplantation konnte ein Überleben der Donorzellen und eine Differenzierung in Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, dass ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen nach Transplantation in einen akuten anti-MOG/Komplement-induzierten Entmarkungsherd mit starker inflammatorischer Komponente im adulten ZNS überleben und differenzieren können. Durch ihre nahezu uneingeschränkte Vermehrbarkeit und ihre Pluripotenz repräsentieren ES-Zell-abgeleitete gliale Vorläuferzellen somit ein alternatives Werkzeug für die Reparatur von Myelindekten.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Adams, C. W., R. N. Poston und S. J. Buk (1989). "Pathology, histochemistry and immunocytochemistry of lesions in acute multiple sclerosis." J Neurol Sci **92**(2-3): 291-306.

Adams, C. W. und R. N. Poston (1990). "Macrophage histology in paraffin-embedded multiple sclerosis plaques is demonstrated by the monoclonal pan-macrophage marker HAM-56: correlation with chronicity of the lesion." Acta Neuropathol (Berl) **80**(2): 208-211.

Adelmann, M., J. Wood, I. Benzel, P. Fiori, H. Lassmann, J. M. Matthieu, M. V. Gardinier, K. Dornmair und C. Linington (1995). "The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat." J Neuroimmunol **63**(1): 17-27.

Anderson, E. S. und C. Bjartmar (2000). "[Oligodendrocytes have a key role in the development of CNS function and in myelin related diseases]." Lakartidningen **97**(28-29): 3265-3268.

Archer, D. R., P. A. Cuddon, D. Lipsitz und I. D. Duncan (1997). "Myelination of the canine central nervous system by glial cell transplantation: a model for repair of human myelin disease." Nat Med **3**(1): 54-59.

Bain, G., D. Kitchens, M. Yao, J. E. Huettner und D. I. Gottlieb (1995). "Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro." Dev Biol **168**(2): 342-357.

Barber, P. C. and D. Dahl (1987). "Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in normal and transected rat olfactory nerve." Exp Brain Res **65**(3): 681-685.

Barber, P. C. and R. M. Lindsay (1982). "Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes." Neuroscience **7**(12): 3077-3090.

Barnett, S. C., R. J. Franklin, et al. (1993). "In vitro and in vivo analysis of a rat bipotential O-2A progenitor cell line containing the temperature-sensitive mutant gene of the SV40 large T antigen." Eur J Neurosci **5**(10): 1247-1260.

Baron-Van Evercooren, A., E. Clerin-Duhamel, P. Lapie, A. Gansmüller, F. Lachapelle und M. Gumpel (1992a). "The fate of Schwann cells transplanted in the brain during development." Dev Neurosci **14**(2): 73-84.

Baron-Van Evercooren, A., A. Gansmüller, E. Duhamel, F. Pascal und M. Gumpel (1992b). "Repair of a myelin lesion by Schwann cells transplanted in the adult mouse spinal cord." J Neuroimmunol **40**(2-3): 235-242.

Baron-Van Evercooren, A., A. Gansmüller, E. Clerin und M. Gumpel (1991). "Hoechst 33342 a suitable fluorescent marker for Schwann cells after transplantation in the mouse spinal cord." Neurosci Lett **131**(2): 241-244.

Barres, B. A., M. C. Raff, F. Gaese, I. Bartke, G. Dechant und Y. A. Barde (1994). "A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development." Nature **367**(6461): 371-375.

Barres, B. A., I. K. Hart, H. S. Coles, J. F. Burne, J. T. Voyvodic, W. D. Richardson und M. C. Raff (1992a). "Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage." Cell **70**(1): 31-46.

Barres, B. A., I. K. Hart, H. S. Coles, J. F. Burne, J. T. Voyvodic, W. D. Richardson und M. C. Raff (1992b). "Cell death in the oligodendrocyte lineage." J Neurobiol **23**(9): 1221-1230.

Ben-Hur, T. O., M. Idelson, H. Khaner, M. Pera, E. Reinhartz, A. Itzik, B. E. Reubinoff (2004). "Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats." Stem Cells **22**(7): 1246-1255

Ben-Hur, T., O. Einstein, R. Mizrachi-Kol, O. Ben-Menachem, E. Reinhartz, D. Karussis und O. Abramsky (2003). "Transplanted multipotential neural precursor cells migrate into the inflamed white matter in response to experimental autoimmune encephalomyelitis." Glia **41**(1): 73-80.

Ben-Hur, T., B. Rogister, K. Murray, G. Rougon und M. Dubois-Dalcq (1998). "Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain." J Neurosci **18**(15): 5777-5788.

Bibel, M., J. Richter, K. Schrenk, K. L. Tucker, V. Staiger, M. Korte, M. Goetz, Y.-A. Barde (2004). "Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage." Nat. Neurosci **9** (7): 1003-1009.

Bignami, A., L. F. Eng, D. Dahl und C. T. Uyeda (1972). "Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence." Brain Res **43**(2): 429-435.

Billon, N., C. Jolicoeur, Q. L. Ying, A. Smith und M. Raff (2002). "Normal timing of oligodendrocyte development from genetically engineered, lineage-selectable mouse ES cells." J Cell Sci **115**(Pt 18): 3657-3665.

Björklund L. M., R. Sánchez-Pernaute, S. Chung (2001). "Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model." Proc Natl Acad Sci USA **99**: 2344-2349.

Björklund, A.(1991). " Neural transplantation- an experimental tool with clinical possibilities." Trends in Neurosci **70** : 319- 322

Blakemore, W. F., J. M. Gilson und A. J. Crang (2000). "Transplanted glial cells migrate over a greater distance and remyelinate demyelinated lesions more rapidly than endogenous remyelinating cells." J Neurosci Res **61**(3): 288-294.

Blakemore, W. F. und A. J. Crang (1989). "The relationship between type-1 astrocytes, Schwann cells and oligodendrocytes following transplantation of glial cell cultures into demyelinating lesions in the adult rat spinal cord." J Neurocytol **18**(4): 519-528.

Blakemore, W. F. und A. J. Crang (1988). "Extensive oligodendrocyte remyelination following injection of cultured central nervous system cells into demyelinating lesions in adult central nervous system." Dev Neurosci. **10**: 1-11.

Blakemore, W. F. und A. J. Crang (1985). "The use of cultured autologous Schwann cells to remyelinate areas of persistent demyelination in the central nervous system." J Neurol Sci **70**(2): 207-223.

Blakemore, W. F. (1977). "Remyelination of CNS axons by Schwann cells transplanted from the sciatic nerve." Nature **266**(5597): 68-69.

Blanes T. (1898). "Sobre algunos puntos dudosos de la estructura del bulbo olfactorio." Rev. Trim. Microg. **3**: 99-127

Bogler, O., D. Wren, S. C. Barnett, H. Land und M. Noble (1990). "Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(16): 6368-6372.

Bradley, A., M. Evans, M. H. Kaufman und E. Robertson (1984). "Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines." Nature **309**(5965): 255-256.

Braun, P. E., F. Sandillon, A. Edwards, J. M. Matthieu und A. Privat (1988). "Immunocytochemical localization by electron microscopy of 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in developing oligodendrocytes of normal and mutant brain." J Neurosci **8**(8):

3057-3066.

Brazelton, T. R., F. M. Rossi, G. I. Keshet und H. M. Blau (2000). "From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice." Science **290**(5497): 1775-1779.

Brustle, O., K. N. Jones, R. D. Learish, K. Karram, K. Choudhary, O. D. Wiestler, I. D. Duncan und R. D. McKay (1999a). "Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants." Science **285**(5428): 754-756.

Brustle O. (1999b). "Building Brains: Neural chimeras in the Study of Nervous System Development and Repair." Brain Pathology **9** : 527-545

Brustle, O., K. Choudhary, K. Karram, A. Huttner, K. Murray, M. Dubois-Dalcq und R. D. McKay (1998). "Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats." Nat Biotechnol **16**(11): 1040-1044.

Brustle, O., A. C. Spiro, K. Karram, K. Choudhary, S. Okabe und R. D. McKay (1997). "In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14809-14814.

Brustle, O., U. Maskos und R. D. McKay (1995). "Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain." Neuron **15**(6): 1275-1285.

Brunner, C., H. Lassmann, T. V. Waehneltd, J. M. Matthieu und C. Linington (1989). "Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats." J Neurochem **52**(1): 296-304.

Campagnoni, A. T. (1988). "Molecular biology of myelin proteins from the central nervous system." J Neurochem **51**(1): 1-14.

Campbell, K., M. Olsson und A. Bjorklund (1995). "Regional incorporation and site-specific differentiation of striatal precursors transplanted to the embryonic forebrain ventricle." Neuron **15**(6): 1259-1273.

Cattaneo, E. und R. McKay (1990). "Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor." Nature **347**(6295): 762-765.

Cepko, C. (1988). "Immortalization of neural cells via oncogene transduction." Trends Neurosci **11**(1): 6-8.



- Chandross, K. J., R. I. Cohen, P. Paras, Jr., M. Gravel, P. E. Braun und L. D. Hudson (1999). "Identification and characterization of early glial progenitors using a transgenic selection strategy." J Neurosci **19**(2): 759-774.
- Chung, S., K. C. Sonntag, T. Andersson, L. M. Bjorklund, J. J. Park, D. W. Kim, U. J. Kang, O. Isacson, K. S. Kim (2002). " Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons." Eur. J. Neurosci. **16** : 1829-1838.
- Coffey, J. C. und K. W. McDermott (1997). "The regional distribution of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in the developing rat CNS: an in vivo immunohistochemical study." J Neurocytol **26**(3): 149-161.
- Compston, A., J. Zajicek, J. Sussman, A. Webb, G. Hall, D. Muir, C. Shaw, A. Wood und N. Scolding (1997). "Glial lineages and myelination in the central nervous system." J Anat **190**(Pt 2): 161-200.
- Compston, A. (1994). "Brain repair: an overview." J Neurol **242**(1 Suppl 1): 1-4.
- Crang, A. J., R. J. Franklin, W. F. Blakemore, M. Noble, S. C. Barnett, A. Groves, J. Trotter und M. Schachner (1992). "The differentiation of glial cell progenitor populations following transplantation into non-repairing central nervous system glial lesions in adult animals." J Neuroimmunol **40**(2-3): 243-253.
- Davis, A. A. und S. Temple (1994). "A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex." Nature **372**(6503): 263-266.
- Degos J. D, A. M. Ergis, J. P. Lefaucheur, F. Lisovoski, E. Pailhous, P. Remy, S. Palfi, G. L. Defer, P. Cesaro, P. Hantraye und M. Peschanski (2000). "Safety and tolerability assessment of intrastriatal neural allografts in five patients with Huntington's disease." Exp Neurol **161**(1): 194-202.
- Devon, R. and R. Doucette (1992). "Olfactory ensheathing cells myelinate dorsal root ganglion neurites." Brain Res **589**(1): 175-179.
- Di Bello C., I., M. R. L. Dawson, J. M. Levine, R. Reynolds (1999). "Generation of oligodendroglial progenitors in acute inflammatory demyelinating lesions of the rat brain stem is associated with demyelination rather than inflammation." J Neurocyt **28** : 365-381.

- Doucette, R. (1991). "PNS-CNS transitional zone of the first cranial nerve." J Comp Neurol **312**(3): 451-466.
- Duncan, I. D., W. E. Grever und S. C. Zhang (1997a). "Repair of myelin disease: strategies and progress in animal models." Mol Med Today **3**(12): 554-561.
- Duncan, I. D. und R. L. Hoffman (1997b). "Schwann cell invasion of the central nervous system of the myelin mutants." J Anat **190 ( Pt 1)**: 35-49.
- Duncan, I. D. und E. A. Milward (1995). "Glial cell transplants: experimental therapies of myelin diseases." Brain Pathol **5**(3): 301-310.
- Duncan, I. D., K. F. Lunn, B. Holmgren, R. Urba-Holmgren und L. Brignolo-Holmes (1992a). "The taiep rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect." J Neurocytol **21**(12): 870-884.
- Duncan, I. D., C. Paino, D. R. Archer und P. M. Wood (1992b). "Functional capacities of transplanted cell-sorted adult oligodendrocytes." Dev Neurosci **14**(2): 114-122.
- Duncan, I. D., J. P. Hammang, K. F. Jackson, P. M. Wood, R. P. Bunge und L. Langford (1988). "Transplantation of oligodendrocytes and Schwann cells into the spinal cord of the myelin-deficient rat." J Neurocytol **17**(3): 351-360.
- Dusart, I., O. Isacson, F. Nothias, M. Gumpel und M. Peschanski (1989). "Presence of Schwann cells in neurodegenerative lesions of the central nervous system." Neurosci Lett **105**(3): 246-50.
- Ebers G. C., K. Kukay, D. E. Bulman (1996). "A full genome search in multiple sclerosis." Nat Genet **13**:472-476
- Evans, M. J. und M. H. Kaufman (1981). "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos." Nature **292**(5819): 154-156.
- Finley, M. F., N. Kulkarni und J. E. Huettner (1996). "Synapse formation and establishment of neuronal polarity by P19 embryonic carcinoma cells and embryonic stem cells." J Neurosci **16**(3): 1056-1065.
- Fraichard, A., O. Chassande, G. Bilbaut, C. Dehay, P. Savatier und J. Samarut (1995). "In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons." J Cell Sci **108** (Pt 10): 3181-3188.

Franklin, R. J. and S. C. Barnett (2000). "Olfactory ensheathing cells and CNS regeneration: the sweet smell of success?" Neuron **28**(1): 15-8.

Franklin, R. J. und W. F. Blakemore (1997a). "Transplanting oligodendrocyte progenitors into the adult CNS." J Anat **190**(Pt 1): 23-33.

Franklin, R. J. und W. F. Blakemore (1997b). "To what extent is oligodendrocyte progenitor migration a limiting factor in the remyelination of multiple sclerosis lesions?" Mult Scler **3**(2): 84-87.

Franklin, R. J., J. M. Gilson und W. F. Blakemore (1997c). "Local recruitment of remyelinating cells in the repair of demyelination in the central nervous system." J Neurosci Res **50**(2): 337-344.

Franklin, R. J., J. M. Gilson, et al. (1996). "Schwann cell-like myelination following transplantation of an olfactory bulb-ensheathing cell line into areas of demyelination in the adult CNS." Glia **17**(3): 217-224.

Franklin, R. J., S. A. Bayley, R. Milner, C. Ffrench-Constant und W. F. Blakemore (1995). "Differentiation of the O-2A progenitor cell line CG-4 into oligodendrocytes and astrocytes following transplantation into glia-deficient areas of CNS white matter." Glia **13**(1): 39-44.

Gansmüller, A., E. Clerin, F. Kruger, M. Gumpel und F. Lachapelle (1991). "Tracing transplanted oligodendrocytes during migration and maturation in the shiverer mouse brain." Glia **4**(6): 580-590.

Gansmüller, A., F. Lachapelle, A. Baron-Van Evercooren, J. J. Hauw, N. Baumann und M. Gumpel (1986). "Transplantations of newborn CNS fragments into the brain of shiverer mutant mice: extensive myelination by transplanted oligodendrocytes. II. Electron microscopic study." Dev Neurosci **8**(4): 197-207.

Gardinier, M. V., P. Amiguet, C. Linington und J. M. Matthieu (1992). "Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily." J Neurosci Res **33**(1): 177-187.

Gensert, J. M. und J. E. Goldman (1997). "Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS." Neuron **19**(1): 197-203.

- Ghosh, A. und M. E. Greenberg (1995). "Distinct roles for bFGF and NT-3 in the regulation of cortical neurogenesis." Neuron **15**(1): 89-103.
- Glaser, T., A. Perez-Bouza, K. Klein, O. Brustle (2005). "Generation of purified oligodendrocyte progenitors from embryonic stem cells." FASEB J. Jan; **19**(1): 112-114. Epub 2004 Oct 14.
- Gout, O. und M. Dubois-Dalcq (1993). "Directed migration of transplanted glial cells toward a spinal cord demyelinating lesion." Int J Dev Neurosci **11**(5): 613-623.
- Grinspan, J., L. Wrabetz und J. Kamholz (1993). "Oligodendrocyte maturation and myelin gene expression in PDGF-treated cultures from rat cerebral white matter." J Neurocytol **22**(5): 322-333.
- Gritti, A., E. A. Parati, L. Cova, P. Frolichsthal, R. Galli, E. Wanke, L. Faravelli, D. J. Groves, A. K., S. C. Barnett, R. J. Franklin, A. J. Crang, M. Mayer, W. F. Blakemore und M. Noble (1993). "Repair of demyelinated lesions by transplantation of purified O-2A progenitor cells." Nature **362**(6419): 453-455.
- Grundke-Iqbal, I., Raine, C. S., Johnson, A. B., Brosnan C. F., Bornstein, M. B (1981). "Experimental allergic encephalomyelitis." J Neurol Sci **50**: 63-79.
- Gumpel, M., O. Gout, C. Lubetzki, A. Gansmüller und N. Baumann (1989). "Myelination and remyelination in the central nervous system by transplanted oligodendrocytes using the shiverer model. Discussion on the remyelinating cell population in adult mammals." Dev Neurosci **11**(2): 132-139.
- Gumpel, M., N. Baumann, M. Raoul und C. Jacque (1983). "Survival and differentiation of oligodendrocytes from neural tissue transplanted into new-born mouse brain." Neurosci Lett **37**(3): 307-311.
- Gutierrez-Ramos, J. C. und R. Palacios (1992). "In vitro differentiation of embryonic stem cells into lymphocyte precursors able to generate T and B lymphocytes in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 9171-9175.
- Haines J. L., M. Ter-Minassian, A. Bazyk (1996). "A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex: the Multiple Sklerose Genetics Group." Nat Genet **13**: 469-471.

- Hasegawa, M. and J. Rosenbluth (1991). "Transplantation of labeled fetal spinal cord fragments into juvenile myelin-deficient rat spinal cord." Anat Rec **229**(1): 138-143.
- Holz, A. und M. E. Schwab (1997). "Developmental expression of the myelin gene MOBP in the rat nervous system." J Neurocytol **26**(7): 467-477.
- Hubner, K., G. Fuhrmann, L.K. Christenson, J. Kehler, R. Reinbold, R. De La Fuente, J. Wood, J. F.3rd Strauss, M. Boiani, H. R. Scholer (2003). "Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells." Science May 23; **300**(5623): 1251-1256.
- Imaizumi, T., K. L. Lankford, et al. (2000). "Xenotransplantation of transgenic pig olfactory ensheathing cells promotes axonal regeneration in rat spinal cord." Nat Biotechnol **18**(9): 949-953.
- Imaizumi, T., K. L. Lankford, et al. (1998). "Transplanted olfactory ensheathing cells remyelinate and enhance axonal conduction in the demyelinated dorsal columns of the rat spinal cord." J Neurosci **18**(16): 6176-6185.
- Itoyama, Y., A. Ohnishi, J. Tateishi, Y. Kuroiwa und H. D. Webster (1985). "Spinal cord multiple sclerosis lesions in Japanese patients: Schwann cell remyelination occurs in areas that lack glial fibrillary acidic protein (GFAP)." Acta Neuropathol (Berl) **65**(3-4): 217-223.
- Jeffery, N. D. und W. F. Blakemore (1995). "Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lyssolecithin." J Neurocytol **24**(10): 775-781.
- Johe, K. K., T. G. Hazel, T. Muller, M. M. Dugich-Djordjevic und R. D. McKay (1996). "Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system." Genes Dev **10**(24): 3129-3140.
- Keirstead, H. S (2001). "Stem cell transplantation into the central nervous system and the control of differentiation." J Neurosci Res **63**: 233-236.
- Keirstead, H. S. und W. F. Blakemore (1997). "Identification of post-mitotic oligodendrocytes incapable of remyelination within the demyelinated adult spinal cord." J Neuropathol Exp Neurol **56**(11): 1191-1201.
- Keller, G. M. (1995). "In vitro differentiation of embryonic stem cells." Curr Opin Cell Biol **7**(6): 862-869.

- Kim, T. und S. E. Pfeiffer (1999). "Myelin glycosphingolipid/cholesterol-enriched microdomains selectively sequester the non-compact myelin proteins CNP and MOG." J Neurocytol **28**(4-5): 281-293.
- Klug, M. G., M. H. Soonpaa, G. Y. Koh und L. J. Field (1996). "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts." J Clin Invest **98**(1): 216-224.
- Kordower, J. H., T. B. Freeman, B. J. Snow, F. J. Vingerhoets, E. J. Mufson, P. R. Sanberg, R. A. Hauser, D. A. Smith, G. M. Nauert, D. P. Perl und et al. (1995). "Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease." N Engl J Med **332**(17): 1118-1124.
- Kornek, B., M. K. Storch, R. Weissert, E. Wallstroem, A. Stefferl, T. Olsson, C. Linington, M. Schmidbauer und H. Lassmann (2000). "Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions." Am J Pathol **157**(1): 267-276.
- Kumar, D., T. J. Kamp, M. M. LeWinter (2005). "Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration." Coron Artery Dis. **16** (2): 111-116.
- Lachapelle, F., M. Gumpel, M. Baulac, C. Jacque, P. Duc und N. Baumann (1983). "Transplantation of CNS fragments into the brain of shiverer mutant mice: extensive myelination by implanted oligodendrocytes. I. Immunohistochemical studies." Dev Neurosci **6**(6): 325-334.
- Learish, R. D., O. Brüstle, S. C. Zhang und I. D. Duncan (1999). "Intraventricular transplantation of oligodendrocyte progenitors into a fetal myelin mutant results in widespread formation of myelin." Ann Neurol **46**(5): 716-722.
- Lee, S. H., N. Lumelsky, L. Studer, J. M. Auerbach und R. D. McKay (2000). "Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells." Nat Biotechnol **18**(6): 675-679.
- Lendahl, U. und R. D. McKay (1990). "The use of cell lines in neurobiology." Trends Neurosci **13**(4): 132-137.

- Levenberg, S., J. S. Golub, M. Amit, J. Itzkovitz-Eldor, R. Langer (2002). "Endothelial cells derived from human embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4391-4396.
- LeVine, S. M. und J. E. Goldman (1988). "Spatial and temporal patterns of oligodendrocyte differentiation in rat cerebrum and cerebellum." J Comp Neurol **277**(3): 441-455.
- Levison, S. W. und J. E. Goldman (1993). "Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain." Neuron **10**(2): 201-212.
- Li, G., A. J. Crang, J. L. Rundle, W. F. Blakemore (2002). "Oligodendrocyte progenitor cells in the adult rat CNS express myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)." Brain Pathol **12**: 463-471.
- Li, M., L. Pevny, R. Lovell-Badge und A. Smith (1998). "Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection." Curr Biol **8**(17): 971-974.
- Lindvall, O., G. Sawle, H. Widner, J. C. Rothwell, A. Bjorklund, D. Brooks, P. Brundin, R. Frackowiak, C. D. Marsden, P. Odin und et al. (1994). "Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease." Ann Neurol **35**(2): 172-180.
- Linnington, C., M. Bradl, H. Lassmann, C. Brunner und K. Vass (1988). "Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein." Am J Pathol **130**(3): 443-454.
- Liu, S., Y. Qu, T. J. Stewart, M. J. Howard, S. Chakraborty, T. F. Holekamp und J. W. McDonald (2000). "Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6126-6131.
- Loebel, D. A., C. M. Watson, R. A. De Young, P. P. Tamm (2003). "Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells." Dev Biol **264**:1-14.
- Louis, J. C., E. Magal, D. Muir, M. Manthorpe und S. Varon (1992). "CG-4, a new bipotential glial cell line from rat brain, is capable of differentiating in vitro into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes." J Neurosci Res **31**(1): 193-204.
- Lumelsky, N., O. Blondel, P. Laeng, I. Velasco, R. Ravin und R. McKay (2001). "Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets." Science **292**(5520): 1389-1394.

- Maltsev, V. A., A. M. Wobus, J. Rohwedel, M. Bader und J. Hescheler (1994). "Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents." Circ Res **75**(2): 233-244.
- Martin, G. R. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(12): 7634-7638.
- McFarland H. F., J. A. Frank, P. S. Albert (1992). "Using gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging lesions to monitor disease activity in multiple sclerosis." Ann Neurol **32**: 758-766.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science **276**(5309): 66-71.
- McMorris, F. A. und R. D. McKinnon (1996). "Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: prospects for therapy of demyelinating disease." Brain Pathol **6**(3): 313-329.
- Mezey, E., K. J. Chandross, G. Harta, R. A. Maki und S. R. McKercher (2000). "Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow." Science **290**(5497): 1779-1782.
- Mikoshiba, K., H. Okano, T. Tamura und K. Ikenaka (1991). "Structure and function of myelin protein genes." Annu Rev Neurosci **14**: 201-217.
- Morassutti, F. Roisen, D. D. Nickel und A. L. Vescovi (1996). "Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor." J Neurosci **16**(3): 1091-1100.
- Murray, K. und M. Noble (1985). "In vitro studies on the comparative sensitivities of cells of the central nervous system to diphtheria toxin." J Neurol Sci **70**(3): 283-293.
- Nishimura, F., M. Yoshikawa, S. Kanda, M. Nonaka, H. Yokota, A. Shiroy, H. Nakase, H. Hirabayashi, Y. Oujji, J. Birumachi, S. Ishizaka, T. Sakaki (2003). "Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models: improved behavior by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells." Stem Cells **21**:171-180.



- Nishino, H., T. Hashitani, M. Kumazaki, H. Sato, F. Furuyama, Y. Isobe, N. Watari, M. Kanai und S. Shiosaka (1990). "Long-term survival of grafted cells, dopamine synthesis/release, synaptic connections, and functional recovery after transplantation of fetal nigral cells in rats with unilateral 6-OHDA lesions in the nigrostriatal dopamine pathway." Brain Res **534**(1-2): 83-93.
- Nistor, G. I., M. O. Totoiu, N. Haque, M. K. Carpenter, H. S. Keirstead (2005). "Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation." Glia **49**: 385-396.
- Okabe, S., K. Forsberg-Nilsson, A. C. Spiro, M. Segal und R. D. McKay (1996). "Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro." Mech Dev **59**(1): 89-102.
- O'Leary, M. T. und W. F. Blakemore (1997a). "Oligodendrocyte precursors survive poorly and do not migrate following transplantation into the normal adult central nervous system." J Neurosci Res **48**(2): 159-167.
- O'Leary, M. T. und W. F. Blakemore (1997b). "Use of a rat Y chromosome probe to determine the long-term survival of glial cells transplanted into areas of CNS demyelination." J Neurocytol **26**(4): 191-206.
- Palacios, R., E. Golunski und J. Samaridis (1995). "In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7530-7534.
- Perez-Bouza, A., T. Glaser, O. Bruestle (2005). "ES-Cell derived Glial Precursors Contribute to Remyelination in Acutely Demyelinated Spinal Cord Lesions." Brain Pathol **15**: 208-216.
- Pfeiffer, S. E., Warrington, A. E. und Bansal, R.(1993). "The oligodendrocyte and its many cellular processes". Trends in Cell Biology **3**: 191-197.
- Philpott, L. M., O. V. Kopyov, A. J. Lee, S. Jacques, C. M. Duma, S. Caine, M. Yang und K. S. Eagle (1997). "Neuropsychological functioning following fetal striatal transplantation in Huntington's chorea: three case presentations." Cell Transplant **6**(3): 203-212.
- Pixley, S. K. (1992). "The olfactory nerve contains two populations of glia, identified both in vivo and in vitro." Glia **5**(4): 269-284.

- Plant, G. W., P.F. Currier, E. P. Cuervo, M. L. Bates, Y. Pressman, M. B. Bunge, P. M. Wood (2002). "Purified adult ensheathing glia fail to myelinate axons under culture conditions that enable Schwann cells to form myelin." J. Neurosci. **22**: 6083-6091.
- Pluchino, S., A. Quattrini, E. Brambilla, A. Gritti, G. Salani, G. Dina, R. Galli, U. Del Carro, S. Amadio, A. Bergami, R. Furlan, G. Comi, A. L. Vescovi and G. Martino (2003). "Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis." Nature **422**(6933): 688-694.
- Priller, J., D. A. Persons, F. F. Klett, G. Kempermann, G. W. Kreutzberg und U. Dirnagl (2001). "Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo." J Cell Biol **155**(5): 733-738.
- Prineas J. W., E. E. Kwon, E. S. Cho, L. R. Sharer (1984). "Continual breakdown and regeneration of myelin in progressive multiple sclerosis plaques." Ann N Y Acad Sci **436**: 11-32.
- Raff, M. C., R. H. Miller und M. Noble (1983). "A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium." Nature **303**(5916): 390-396.
- Raisman, G. (2001). "Olfactory ensheathing cells - another miracle cure for spinal cord injury?" Nat Rev Neurosci **2**(5): 369-375.
- Ramon-Cueto, A., M. I. Cordero, et al. (2000). "Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia." Neuron **25**(2): 425-35.
- Ray, J. und F. H. Gage (1994). "Spinal cord neuroblasts proliferate in response to basic fibroblast growth factor." J Neurosci **14**(6): 3548-3564.
- Reynolds, B. A. und S. Weiss (1992a). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-1710.
- Reynolds, B. A., W. Tetzlaff und S. Weiss (1992b). "A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes." J Neurosci **12**(11): 4565-4574.
- Rudick R. A., D. Cookfair; R. Ranshoff (1996). "Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial interferon beta-1a (Avonex) for relapsing multiple sclerosis." Ann Neurol **40**: 516.
- Scolding, N. J. und R. J. Franklin (1997). "Remyelination in demyelinating disease." Baillieres Clin Neurol **6**(3): 525-548.

Saher, G., B. Brügger, C. Lappe-Siefke, W. Möbius, R. Tozawa, M. C. Wehr, F. Wieland, S. Ishibashi, K. A. Nave (2005). "High cholesterol level is essential for myelin membrane growth." Nat. Neurosc. **8**(4): 468-475.

Sawcer S., H. B. Jones., R. Feakes (1996). "A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22." Nat Genet **13**: 464-468.

Schachner, M., S. K. Kim und R. Zehnle (1981). "Developmental expression in central and peripheral nervous system of oligodendrocyte cell surface antigens (O antigens) recognized by monoclonal antibodies." Dev Biol **83**(2): 328-338.

Schmandt T., E. Meents, G. Gossrau, V. Gornik, S. Okabe, O. Brustle (2005). "High purity lineage selection of embryonic stem cell-derived neurons." Stem Cells Dev. **14**(1): 55-64.

Shamblott, M. J., J. Axelman, S. Wang, E. M. Bugg, J. W. Littlefield, P. J. Donovan, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins und J. D. Gearhart (1998). "Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(23): 13726-13731.

Shields, S. A., W. F. Blakemore und R. J. Franklin (2000). "Schwann cell remyelination is restricted to astrocyte-deficient areas after transplantation into demyelinated adult rat brain." J Neurosci Res **60**(5): 571-578.

Shields, S. A., J. M. Gilson, W. F. Blakemore und R. J. Franklin (1999). "Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following gliotoxin-induced CNS demyelination." Glia **28**(1): 77-83.

Slavin, A. J., T. G. Johns, J. M. Orian und C. C. Bernard (1997). "Regulation of myelin oligodendrocyte glycoprotein in different species throughout development." Dev Neurosci **19**(1): 69-78.

Smith, K. J. und S. M. Hall (1994). "Central demyelination induced in vivo by the calcium ionophore ionomycin." Brain **117 ( Pt 6)**: 1351-1356.

Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl und D. Rogers (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." Nature **336**(6200): 688-690.

Smith, K. J., W. I. McDonald und W. F. Blakemore (1979). "Restoration of secure conduction by central demyelination." Trans Am Neurol Assoc **104**: 25-29.

- Solly, S. K., J. L. Thomas, M. Monge, C. Demerens, C. Lubetzki, M. V. Gardinier, J. M. Matthieu und B. Zalc (1996). "Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition." *Glia* **18**(1): 39-48.
- Soria, B., E. Roche, G. Berna, T. Leon-Quinto, J. A. Reig und F. Martin (2000). "Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice." *Diabetes* **49**(2): 157-162.
- Sternberger, N. H., Y. Itoyama, M. W. Kies und H. d. Webster (1978). "Immunocytochemical method to identify basic protein in myelin-forming oligodendrocytes of newborn rat C.N.S." *J Neurocytol* **7**(2): 251-263.
- Storch, M. K., A. Stefferl, U. Brehm, R. Weissert, E. Wallstrom, M. Kerschensteiner, T. Olsson, C. Linington und H. Lassmann (1998). "Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology." *Brain Pathol* **8**(4): 681-694.
- Strübing, C., G. Ahnert-Hilger, J. Shan, B. Wiedenmann, J. Hescheler und A. M. Wobus (1995). "Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons." *Mech Dev* **53**(2): 275-287.
- Swiatek, P. J. und T. Gridley (1993). "Perinatal lethality and defects in hindbrain development in mice homozygous for a targeted mutation of the zinc finger gene *Krox20*." *Genes Dev* **7**(11): 2071-2084.
- Takami, T., M. Oudega, M. L. Bates, P. M. Wood, N. Kleitman, M. B. Bunge (2002). "Schwann cells but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord." *J Neurosci*. **22**: 6670-6681.
- Terada, N., T. Hamazaki, M. Oka, M. Hoki, D. M. Mastalerz, Y. Nakano, E. M. Meyer, L. Morel, B. E. Petersen und E. W. Scott (2002). "Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion." *Nature* **416**(6880): 542-545.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall und J. M. Jones (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-1147.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, T. G. Golos, M. Durning, C. P. Harris, R. A. Becker und J. P. Hearn (1995). "Isolation of a primate embryonic stem cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A*

92(17): 7844-7848.

Tontsch, U., D. R. Archer, M. Dubois-Dalcq und I. D. Duncan (1994). "Transplantation of an oligodendrocyte cell line leading to extensive myelination." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(24): 11616-11620.

Trapp, B. D., T. Moench, M. Pulley, E. Barbosa, G. Tennekoon und J. Griffin (1987). "Spatial segregation of mRNA encoding myelin-specific proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7773-7777.

Trotter, J., A. J. Crang, M. Schachner, W. F. Blakemore (1993). "Lines of glial precursor cells immortalised with a temperature-sensitive oncogene give rise to astrocytes following transplantation into demyelinated lesions in the central nervous system." Glia **9**: 25-40.

Tourbah, A., C. Linnington, C. Bachelin, V. Avellana-Adalid, H. Wekerle und A. Baron-Van Evercooren (1997). "Inflammation promotes survival and migration of the CG4 oligodendrocyte progenitors transplanted in the spinal cord of both inflammatory and demyelinated EAE rats." J Neurosci Res **50**(5): 853-861.

Vass, K., K. Heininger, B. Schafer, C. Linnington und H. Lassmann (1992). "Interferon-gamma potentiates antibody-mediated demyelination in vivo." Ann Neurol **32**(2): 198-206.

Warrington, A. E., E. Barbarese und S. E. Pfeiffer (1993). "Differential myelinogenic capacity of specific developmental stages of the oligodendrocyte lineage upon transplantation into hypomyelinating hosts." J Neurosci Res **34**(1): 1-13.

Weinshenker B.G. (1996). "Epidemiology of multiple sclerosis." Neurol Clin **14**: 291-308.

Wekerle, H., K. Kojima, J. Lannes-Vieira, H. Lassmann und C. Linnington (1994). "Animal models." Ann Neurol **36**(Suppl): 47-53.

Wekerle, H., C. Linnington, H. Lassmann (1986). "Cellular immune reactivity within the CNS." Trends Neurosci **9** : 271-277.

Wernig, M., F. Benninger, T. Schmand, M. Rade, K. L. Tucker, H. Bussow, H. Beck, O. Bruestle (2004). "Functional integration of embryonic stem cell-derived neurons in vivo." J Neurosci **24**: 5258-5268.

Wernig, M., B. Scheffler, O. Bruestle, "Medizinische Perspektiven der Stammzellforschung." In: Ganten, D., Ruckpaul, K., Hrsg, Grundlagen der Molekularen Medizin. Berlin, Heidelberg, New

- York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer – Verlag , 2003: 680-709.
- Wernig, M., K. L. Tucker, V. Gornik, A. Schneiders, R. Buschwald, O. D. Wiestler, Y. A. Barde, O. Bruestle (2002). "Tau EGFP embryonic stem cells: an efficient tool for neuronal lineage selection and transplantation." J Neurosci Res **69**: 918-924.
- Wichterle, H., I. Lieberam, J. A. Porter, T. M. Jessel (2002). "Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons." Cell **110** : 385-397.
- Wiles, M. V., G. Keller (1991). "Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture." Development **111** : 259-267.
- Williams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, C. L. Stewart, D. P. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola und N. M. Gough (1988). "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." Nature **336**(6200): 684-687.
- Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind und K. H. Campbell (1997). "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells." Nature **385**(6619): 810-813.
- Windrem, M. S., M. C. Nunes, W. K. Rashbaum, T. H. Schwartz, R. A. Goodman, G. McKhann, 2nd, N. S. Roy und S. A. Goldman (2004). "Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain." Nat Med **10**(1): 93-97.
- Wobus, A. M., G. Kaomei, J. Shan, M. C. Wellner, J. Rohwedel, G. Ji, B. Fleischmann, H. A. Katus, J. Hescheler und W. M. Franz (1997). "Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **29**(6): 1525-1539.
- Woodruff, R. H. und R. J. Franklin (1999a). "Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: a comparative study." Glia **25**(3): 216-228.
- Woodruff, R. H. und R. J. Franklin (1999b). "The expression of myelin protein mRNAs during remyelination of lysolecithin-induced demyelination." Neuropathol Appl Neurobiol **25**(3): 226-235.
- Yamamoto, T., J. Kawamura, S. Hashimoto und M. Nakamura (1991). "Extensive proliferation of peripheral type myelin in necrotic spinal cord lesions of multiple sclerosis." J Neurol Sci

**102(2): 163-169.**

Yandava, B. D., L. L. Billingham und E. Y. Snyder (1999). ""Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 7029-7034.

Ying, Q. L., J. Nichols, E. P. Evans und A. G. Smith (2002). "Changing potency by spontaneous fusion." Nature **416**(6880): 545-548.

Zhang, S. C., M Wernig, I. D. Duncan, O. Bruestle, J. A. Thomson (2001). "In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells." Nat. Biotechnol. **19** : 1129-1133.

Zhang, S. C., C. Lundberg, D. Lipsitz, L. T. O'Connor und I. D. Duncan (1998). "Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells." J Neurocytol **27**(7): 475-489.

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. Otmar D. Wiestler, ehemals Institutsleiter, danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Institut für Neuropathologie der Universität Bonn durchführen zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. Oliver Brüstle möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Für ihre stete Einsatzbereitschaft, ihre unermüdliche und wertvolle Unterstützung in allen Fragen und ihr offenes Ohr in schwierigen Situationen möchte ich Rachel Buschwald und Khalad Karam meinen ausdrücklichen Dank aussprechen.

Herrn U. Klatt danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der grafischen Abbildungen.

Frau Dr. W. Kuhlisch danke ich für ihre unkomplizierte Beratung in allen Fragen der Statistik.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Neuropathologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.