
Aus dem Medizinischen Zentrum für Nervenheilkunde des Fachbereiches Medizin der
Philipps-Universität Marburg und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg,
Standort Marburg

Geschäftsf. Direktor: Prof. Dr. J.C. Krieg
Abteilung für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. W.H. Oertel

Herstellung und Charakterisierung von menschlichen Oligodendrozyten-Vorläuferzelllinien

Inaugural Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin dem
Fachbereich Humanmedizin der Philipps Universität Marburg
vorgelegt von

Claus Onischke
aus Herford

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 01.06.2006.

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Prof Dr B. Maisch

Referent: Prof Dr N. Sommer

Korreferent: Prof Dr A. Neubauer

für meine Eltern

Zusammenfassung

Bei der Multiplen Sklerose (MS) wird durch die pathognomonische Demyelinisierung ein Verlust der saltatorischen Erregungsleitung verursacht, wodurch es zu neurologischen Funktionsausfällen kommt. Spontane Remyelinisierungen treten im Verlauf der Erkrankung zwar auf, sind jedoch nur in frühen Läsionen nachweisbar. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es in der Regel zu einer progredienten Demyelinisierung und letztendlich zu einer Schädigung der Axone und damit zu bleibenden neurologischen Ausfällen.

Die für die Remyelinisierung verantwortlichen Zellen bei Nagetieren, Oligodendrocytenvorläuferzellen (oligodendrocyte-precursor-cells (OPC)), sind intensiv untersucht und charakterisiert worden. Jedoch ist das Wissen über die menschlichen Vorläuferzellen aufgrund der komplexen Anforderungen an die Kulturbedingungen begrenzt. Auch ist die Verwendung von menschlichem Gewebe mangels ausreichenden Probenmaterials schwierig.

Die in der vorliegenden Arbeit benutzte Technik der Immortalisation erlaubt es, große Mengen von identischen OPC für weitere Studien zu kultivieren. Dazu wurden primäre Gliazellkulturen mit einem temperatur-sensitiven Mutanten des SV40-large-T-antigen (tsA/U18) mit Hilfe eines retroviralen Vektors transfiziert. Mit Hilfe dieser Technik konnten drei OPC-Zelllinien identifiziert und charakterisiert werden. Die Analyse ihres Immunophänotyps und ihr Verhalten auf Kulturbedingungen, insbesondere auf Wachstumsfaktoren, erlauben einen wichtigen Einblick in die Biologie der OPC. Diese Daten sind die Basis für weitere Untersuchungen zur Entwicklung möglicher neuer therapeutischer Strategien zur Unterstützung der Remyelinisierung bei Patienten mit MS.

1 Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Inhaltsverzeichnis	3
2 Einleitung.....	5
2.1 Die Multiple Sklerose	5
2.2 Das Myelin und die Oligodendrozyten.....	6
2.3 Die Läsionen der MS	6
2.4 Remyelinisierung.....	7
2.5 OPC sorgen für Nachschub an differenzierten Zellen.....	8
2.6 Die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen	9
2.7 OPC und ihr immunologisches Markerprofil	10
2.8 Wachstumsfaktoren und die Entwicklung von OPC	12
2.9 Zelllinien als Instrument zur Untersuchung von menschlichen OPC.....	13
2.10 Fragestellung.....	14
3 Material und Methoden.....	15
3.1 Material.....	15
3.1.1 Zellkulturmedien	15
3.1.2 Chemikalien und Enzyme.....	18
3.1.3 Wachstumsfaktoren	19
3.1.4 Geräte	19
3.1.5 Primäre Antikörper.....	21
3.1.6 Sekundäre Antikörper.....	21
3.2 Methoden	23
3.2.1 Zellkultur	23
3.2.2 RT-PCR	25
3.2.3 Indirekte Immunofluoreszenz-Mikroskopie	29
3.2.4 Infektion der primären Zellen mit retroviralem Vektor.....	31
4 Ergebnisse.....	39
4.1 Eigenschaften der primären Zellkulturen	39
4.2 Titrationsergebnisse der NIH/3T3 Zellen	40

4.3	Titrationsergebnisse der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen-Kulturen	40
4.4	Transfektionsergebnisse der NIH/3T3 Zellen	40
4.5	Durch die Infektion entstehen 22 Zelllinien	41
4.6	Einige Zelllinien lassen sich durch NG2 markieren	41
4.7	Zelllinien weisen ein positives mRNA-Profil für NG2 und PDGF-R	43
4.8	Die Zelllinien zeigen temperatursensitives Verhalten	44
4.9	Expression von mRNA für Wachstumsfaktorrezeptoren	45
4.10	Zellen exprimieren ein Marker-Profil charakteristisch für OPC	46
5	Diskussion.....	49
5.1	Diskussion der Versuchskonzeption und der Methoden	49
5.2	Diskussion der Ergebnisse	51
5.3	Schlußfolgerungen	53
	Literaturverzeichnis	54
6	Anhang.....	61
6.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer	61
6.2	Danksagungen.....	62
6.3	Ehrenwörtliche Erklärung.....	63
6.4	Lebenslauf.....	64

2 Einleitung

2.1 Die Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündlich-demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Inzidenz liegt bei 3-7/100000, die Prävalenz wird mit 70/10000 Einwohner in Deutschland angegeben. Betroffen sind bei der Erstmanifestation vor allem junge Erwachsene, das Prädilektionsalter liegt zwischen 20 und 40 Jahren. Es erkranken etwa doppelt so viele Frauen wie Männer. Bei etwa 80% der Patienten ist der Verlauf zu Beginn schubförmig, und es kommt nach einigen Tagen oder Wochen unter einer teilweisen Rückbildung der Symptome zum Abklingen eines Erkrankungsschubs. Zu Beginn der Krankheit kann diese Rückbildung nahezu vollständig sein. Der chronische Verlauf der Krankheit führt in unterschiedlicher Geschwindigkeit zu zunehmenden Behinderungen. Zu Beginn der Krankheit macht sich die MS häufig durch Sensibilitätsstörungen, Paresen oder eine Optikusneuritis bemerkbar. Im Verlauf können eine Vielzahl anderer neurologischer Symptome hinzukommen (Weinshenker 1994; Poeck 1998).

Die Ursachen der MS sind nicht bekannt. Vermutet werden neben äußeren Faktoren, wie zum Beispiel einer viralen Infektion auch eine genetische Prädisposition. Pathophysiologisch nimmt man heute an, dass eine Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten am Beginn des Krankheitsprozesses steht. Der Entzündungsprozeß richtet sich gegen Bestandteile des Myelins, z.B. gegen das basische Myelin Protein (MBP). Im weiteren Verlauf der Entzündung werden proinflammatorische Zytokine freigesetzt, diese bewirken eine Aktivierung von Makrophagen und B-Zellen, und es kommt zu einer Schädigung des Myelins und der Oligodendrozyten. Der Verlust der Myelinhüllen führt zur Beeinträchtigung der saltatorischen Weiterleitung der Nervenimpulse. Die Entzündungsherde können ubiquitär im ZNS vorkommen, konzentrieren sich aber im periventrikulären Bereich. Die Verteilung der Läsionen im ZNS erklärt die Vielzahl unterschiedlicher Symptome der MS. Die herdförmige Schädigung der Markscheiden (Plaques) und die darauf folgende Astroglieose (Sklerose) der Läsion sind charakteristisch für die MS (Raine 1997; Prineas, Barnard et al. 1993; Ludwin 1997)

2.2 Das Myelin und die Oligodendrozyten

Die Axone sind umgeben von einer Markscheide aus Myelin. Das ermöglicht die saltatorische Weiterleitung entlang der Ranvier-Schnürringe und gewährleistet somit eine schnelle Ausbreitung von Impulsen. Das Myelin macht einen großen Teil der Gehirnmasse aus (40-50% der weißen Gehirnmasse). Es besteht zu 70% aus Lipiden und zu 30% aus Proteinen. Der im Vergleich zu anderen Membranen sehr hohe Lipidanteil ist vorteilhaft bei der Isolierung der Axone. Ein großer Anteil der Lipide besteht aus Galactosylceramiden (GalC). Die Proteine setzen sich zu 80% aus dem basischen Myelinprotein (MBP) und dem Proteolipidprotein (PLP) zusammen (Baumann, Jacque et al. 1983)

Das Myelin wird von den Oligodendrozyten als Bestandteil ihrer Membran gebildet. Diese zuerst von Virchow beschriebenen und als „Nervenkitt“ bezeichneten Gliazellen wickeln Plasmamembranausläufer um die Axone und bilden so eine vielschichtige Hülle. Dabei ist eine Oligodendrozytenzelle in der Lage, bis zu 50 Axone zu umhüllen. Sowohl Myelin als auch Oligodendrozyten kommen bei der MS zu Schaden. (Baumann and Pham-Dinh 2001; Bunge, Bunge et al. 1961; Lucchinetti, Bruck et al. 1999)

2.3 Die Läsionen der MS

Die Betrachtung der Läsionen bei der MS läßt verschiedene Einteilungen der Schädigungsherde je nach Alter und Aktivität zu (Raine 1997).

So erscheint bei frühen, aktiven Läsionen der Entzündungsvorgang im Vordergrund, die Herde sind durchsetzt mit „schaumigen“ Makrophagen als Zeichen der fortschreitenden Myelinzerstörung. Die Narbenbildung, erkennbar an der Astrogliose, ist in diesem Stadium noch nicht stark ausgeprägt. Dagegen hat die Astrogliawucherung bei alten, chronischen Plaques zu einer scharfen Abgrenzung der Läsionen zur Umgebung geführt. Makroskopisch betrachtet erscheinen diese daher wie „ausgestanzt“ und führen zu dem typischen Erscheinungsbild der sklerotischen Plaques. Als Übergangsform zwischen diesen beiden Arten kann man die chronisch-aktiven Läsionen bezeichnen, die parallel Entzündungsvorgänge und Astrogliawucherung aufweisen.

2.4 Remyelinisierung

Der Myelinverlust in den Läsionen ist nicht unwiederbringlich. Es ist bekannt, daß in den chronischen und auch aktiven Herden Remyelinisierung stattfindet (Prineas and Connell 1979; Prineas, Barnard et al. 1993; Raine and Wu 1993). Die Remyelinisierung kann man als Reparaturversuch betrachten, bei dem „nackte“ Axone erneut mit einer Myelinhülle umgeben werden. Dieser Vorgang kann zum Teil verantwortlich sein für den Symptomrückgang zu Beginn der Krankheit bei dem schubförmigen Verlauf der MS (Smith, Blakemore et al. 1981; Felts and Smith 1992). Diese remyelinisierten Axone sind dabei erkennbar an ihrer im Verhältnis zu ihrem Durchmesser dünneren Myelinschicht. Solche remyelinisierten Nervenfasern findet man am Rand chronischer Läsionen und als Inseln in aktiven Läsionen (Prineas and Connell 1979; Raine, Scheinberg et al. 1981; Prineas, Kwon et al. 1989). Allerdings ist der Grad der Remyelinisierung gering, und die inneren Bereiche einer Läsion zeigen kaum Aktivität die auf Reparaturmechanismen schließen läßt. Verschiedene Gründe werden hierfür diskutiert. So nimmt die Anzahl der Axone in der Läsion nach der Demyelinisierung kontinuierlich ab. Außerdem werden die Oligodendrozyten bei der MS geschädigt, es kommt in den chronischen Läsionen zu einem nahezu vollständigen Verlust dieser Zellen. Auch sind diese Zellen nur sehr begrenzt in der Lage, die Gliaarbe zu durchdringen.

Dagegen findet sich in der Randzone von chronischen Läsionen ein Saum von proliferierenden Oligodendrozyten. Diese Anhäufung von Zellen ist häufig assoziiert mit remyelinisierten Axonen in diesem Gebiet.

Ein interessantes Beispiel für remyelinisierte Areale stellen sogenannte „shadow plaques“ im ZNS dar. Diese Gebiete fallen durch ihren im Vergleich zur Umgebung geringeren Myelingeht auf. Bei der histologischen Betrachtung erkennt man die dünnen Myelinschichten und die Hyperplasie der Oligodendrozyten als Zeichen der Remyelinisierungsaktivität. Es wird angenommen, daß solche Gebiete im ZNS das Ergebnis einer einmaligen Schädigung sind (Prineas, Barnard et al. 1993). Diese „single hit lesions“ wurden daraufhin erfolgreich remyelinisiert und präsentieren sich dann als „shadow plaques“. Ein weiteres Beispiel für die Remyelinisierung bei der MS findet sich bei Herden im Rückenmark. Schwann-Zellen sind in der Lage, über die Nervenwurzeln aus dem peripheren Nervensystem in das ZNS einzuwandern und dort Nervenfasern zu remyelinisieren (Ghatak, Hirano et al. 1973).

Weitere Erkenntnisse über die Reparaturversuche von demyelinisierten Läsionen wurden in den vergangenen Jahren durch Transplantationsstudien gewonnen. Dabei wurden myelinproduzierende Zellen muriner (Blakemore, Gilson et al.) oder menschlicher (Gumpel, Lachapelle et al. 1987; Seilhean, Gansmüller et al. 1996) Herkunft im Tierexperiment verpflanzt. Auch bei diesen Versuchen zeigte sich das Potential dieser Zellen zu remyelinisieren.

Die Transplantation von myelinisierenden Zellen ist auch eine denkbare therapeutische Option für MS-Patienten. Erste Transplantationsversuche haben bereits begonnen.

Die Beispiele für Remyelinisierungsvorgänge im Körper zeigen, daß der Organismus in der Lage ist, unter bestimmten Voraussetzungen demyelinisierte Läsionen bei der MS zu remyelinisieren. Im Verlauf der MS versagt dieser Mechanismus aber leider, und das Fortschreiten der Myelinzerstörung kann nicht mehr aufgehalten werden. Die Gründe für das Versagen dieses Reparaturmechanismus sind nicht bekannt. Die Forschung an Oligodendrozyten ist möglicherweise in der Lage, Antworten darauf zu finden.

2.5 OPC sorgen für Nachschub an differenzierten Zellen

Die Oligodendrozyten als myelinproduzierende Zellen des ZNS sind verantwortlich für die Reparaturvorgänge, erkennbar auch an dem Anstieg ihrer Anzahl in Verbindung mit Remyelinisierung, sowohl bei akuten (Prineas, Barnard et al. 1993; Raine and Wu 1993) als auch bei chronischen Läsionen (Prineas and Connell 1979). Als Quelle für die remyelinisierenden Oligodendrozyten in den Läsionen wurden in der Vergangenheit besonders drei Vorstellungen diskutiert (Levine, Reynolds et al. 2001): überlebende Oligodendrozyten im Plaque, Vorläuferzellen, die aus anderen Gebieten des ZNS zur Läsion wandern oder Vorläuferzellen, die sich bereits an der Stelle der Entmarkungsherde befinden.

Bei der ersten Variante müssten postmitotische reife Oligodendrozyten sich in der Läsion dedifferenzieren und dann teilen. Dieses wurde zwar *in vitro* beobachtet, (Grinspan, Stern et al. 1993), allerdings zeigen viele Studien, daß reife Oligodendrozyten sich in Läsionen weder teilen noch an der Remyelinisierung teilnehmen (Carroll, Jennings et al. 1998; Redwine and Armstrong 1998; Dibello, Dawson et al. 1999). Somit erscheint diese Variante eher unwahrscheinlich.

Dies rückt die Rolle der Vorläuferzellen in den Mittelpunkt. Diese Zellen finden sich in chronischen und akuten MS-Läsionen (Scolding, Franklin et al. 1998; Wolswijk 1998). Die Funktionen der Vorläuferzellen wurden auch im Tierexperiment untersucht. Durch verschiedene Methoden wurden bei den Tieren demyelinisierte Läsionen produziert und deren Remyelinisierung beobachtet. Dabei wurde festgestellt, daß die OPC als Antwort auf die Schädigung mit Zellteilung reagieren und so die Anzahl der Vorläuferzellen in diesem Bereich steigern (Redwine and Armstrong 1998; Dibello, Dawson et al. 1999; Levine and Reynolds 1999). Im weiteren Verlauf differenzieren die Vorläuferzellen zu reifen, myelinisierenden Oligodendrozyten und stellen so die Grundlage für eine Remyelinisierung dar. Ein weiterer Beweis für die Funktion der Vorläuferzellen gelang durch die Markierung proliferierender Zellen im ZNS der Ratte durch die Übertragung eines Markergenes mit Hilfe einer retroviralen Infektion. Bei der Untersuchung der künstlich gesetzten Läsion zeigte sich, daß die für die Remyelinisierung verantwortlichen Zellen nicht von den postmitotischen Oligodendrozyten stammten, sondern sich aus den proliferativen Vorläuferzellen entwickelt haben mussten (Gensert and Goldman 1997). Diese Experimente zeigen deutlich die Rolle der Vorläuferzelle als Ursprung der myelinisierenden Zellen.

2.6 Die Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Raff entdeckte bei Zellkulturen aus dem Nervus opticus von perinatalen Ratten einen Zelltyp mit interessanten Wachstumseigenschaften (Raff and Miller 1983). Diese waren in der Lage, je nach Kulturbedingungen zu Oligodendrozyten oder Astrozyten zu differenzieren. Entsprechend dieser Fähigkeit wurden diese Zellen O-2A-Vorläuferzellen genannt. Sie sind *in vitro* von unipolarer oder bipolarer Gestalt und exprimieren Ganglioside, die von A2B5 Antikörpern erkannt werden (Eisenbarth, Walsh et al. 1979). Diese Zellen entwickeln sich bei der Kultivierung mit 10% FKS zu Astrozyten Typ 2 mit einem positiven Antigenprofil für A2B5 und GFAP(A2B5+, GFAP+), während sie im serum-freien Medium zu Oligodendrozyten mit dem Markerprofil A2B5+ und GalC+(A2B5+, GalC+) differenzieren. Weitere Studien fanden entsprechende Zellen auch im adulten ZNS der Ratte (Wolswijk and Noble 1989; French-Constant and Raff 1986). Diese adulten Vorläuferzellen entsprechen zwar dem Markerprofil perinataler Zellen, unterscheiden sich allerdings bezüglich ihrer Beweglichkeit, der Dauer des Zellzyklus und der zeitlichen Abfolge ihrer Differenzierung (Wolswijk, Munro et al. 1991; Shi, Marinovich et al. 1998). *In vivo*

lassen sich solche Zellen durch Antikörper gegen NG2 und PDGF-Rezeptor (Nishiyama, Yu et al. 1997) anfärben. Sie exprimieren das O4 Antigen und Rezeptoren für bFGF (Redwine and Armstrong 1998). Die Vorläuferzellen kommen im gesamten ZNS vor, machen 5-8% der Gesamtzahl aller Zellen im ZNS aus und proliferieren (Dawson, Levine et al.)

Das Wissen über diese Vorläuferzellen bei der Ratte führte zur Entdeckung entsprechender Zellen auch im menschlichen Gehirn (Scolding, Rayner et al. 1995). Es gelang, aus Operationsbiopsien des Temporallappens solche Vorläuferzellen zu isolieren. In Bezug auf ihre bipolare Morphologie, Antigenprofil und zweifache Differenzierungsmöglichkeit, sowohl zu Astrozyten als auch zu Oligodendrozyten, entsprechen sie den O-2A-Vorläuferzellen der Ratten weitestgehend. Allerdings ist die Reaktion der Zellen auf Wachstumsbedingungen und Wachstumsfaktoren unterschiedlich. Hier zeigen sich die auch schon zwischen den Vorläuferzellen anderer Spezies festgestellten Unterschiede besonders deutlich (Althaus, Kloppner et al. 1992). Viele Erkenntnisse über OPC wurden durch Experimente mit Vorläuferzellen tierischen Ursprungs gewonnen.

2.7 OPC und ihr immunologisches Markerprofil

Als Gliazellen sind auch die Vorläuferzellen Abkömmlinge des Neuroepithels. In der Entwicklung entstehen aus Glioblasten Oligodendroblasten, die sich weiter zu Oligodendrozyten differenzieren. Die Myelinisierung beginnt beim menschlichen Fetus im Rückenmark etwa im 4. Monat und setzt sich im ersten Lebensjahr fort, während im Großhirn zum Zeitpunkt der Geburt die meisten Fasern noch marklos sind und die Myelinisierung bis zum Erwachsenenalter fortgesetzt wird (Moore and Persaud 1993).

Die Entwicklung zum reifen Oligodendrozyten erfolgt in Stadien. Die verschiedenen Entwicklungsstufen sind durch die Expression stadienspezifischer Antigene gekennzeichnet.

Ein wichtiges Hilfsmittel bei der Erforschung der Zelldifferenzierung ist die Immunfluoreszenzmikroskopie. Durch die Kennzeichnung bestimmter Antigene kann man so den Differenzierungsgrad der Zellen bestimmen.

Perinatale Vorläuferzellen sind kleine, proliferierende, sehr bewegliche Zellen mit einer bipolaren Morphologie. Diese frühesten Vorläufer zeigen auf ihrer Zelloberfläche GD3

Ganglioside (LeVine and Goldman 1988), Tetrasialogangliosid, markierbar durch den A2B5 Antikörper (Raff and Miller 1983) und NG2 Proteoglycan (Levine and Stallcup 1987). Ein weiteres Erkennungsmerkmal ist die Immunreaktivität der Zellen zu Antikörpern, die gegen den PDGF- α Rezeptor gerichtet ist (Nishiyama, Yu et al. 1997). Neben diesen perinatalen OPC existiert auch eine adulte Form dieser Zellen (Wolswijk and Noble 1989), die sich wahrscheinlich aus den perinatalen Gegenstücken entwickelt und diesen in ihrem Markerprofil weitgehend entsprechen. Allerdings unterscheiden sich diese adulten Zellen in Hinblick auf ihre geringere Beweglichkeit, längere Zellzyklusdauer und die verzögerte zeitliche Abfolge der Differenzierung (Wolswijk, Munro et al. 1991).

Im weiteren Verlauf der Entwicklung nehmen die Zellen eine komplexere Form an, sie strecken Zellfortsätze aus, die allerdings noch nicht weit verzweigt sind. Die zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung immer noch proliferativen Zellen sind in dieser Phase erkennbar durch ihre zusätzliche Immunreaktivität zum Antikörper O4 (Sommer and Schachner 1981; Pfeiffer, Warrington et al. 1993).

Der reife, postmitotische Oligodendrozyt ist morphologisch durch sein feines Netzwerk aus Zellfortsätzen gekennzeichnet. Die Zelle verliert ihre Immunreaktivität gegen NG2. Antikörper gegen Galactocerebroside (GalC) auf der Zelloberfläche markieren die Zelle in diesem Abschnitt der Entwicklung. Auch Proteine assoziiert mit Myelin lassen sich nun bei diesen Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie darstellen. Hierzu gehören neben anderen auch die 2', 3'-cyclisches Nukleotid 3'-Phosphohydrolase (CNP) und das basisches Myelinprotein (MBP) (Pfeiffer, Warrington et al. 1993). Das Auftreten dieser Proteine fällt zusammen mit der Fähigkeit der Zellen zu myelinisieren und zeigt den letzten Differenzierungsschritt an.

2.8 Wachstumsfaktoren und die Entwicklung von OPC

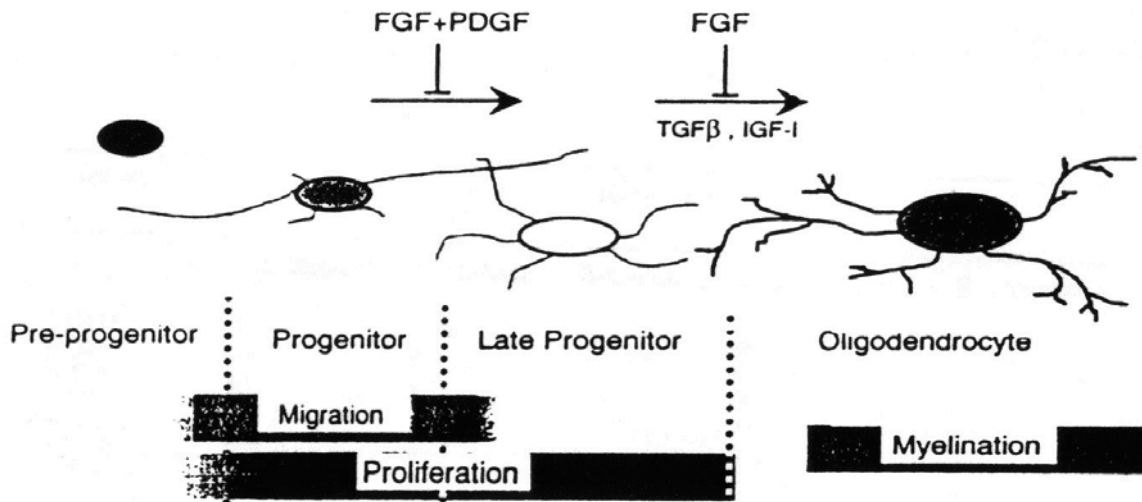


Abbildung 2-1: Wachstumsfaktoren beeinflussen die OPC Entwicklung (nach McMorris, 1996) FGF: fibroblast growth factor, PDGF: platelet-derived growth factor, TGFβ: transforming growth factor β, IGF-I: insulin-like growth factor I

Wichtige Mitogene der Entwicklung sind Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF). PDGF, im ZNS von Astrozyten und Neuronen produziert, hat bei alleiniger Gabe in der Zellkultur eine permissive Wirkung auf die Differenzierung von OPC (Raff, Lillien et al. 1988). Die Zellen durchlaufen einige Zellzyklen bis sie sich in postmitotische Oligodendrozyten umwandeln. Die gleichzeitige Gabe von PDGF und FGF dagegen führt zu einer Blockierung der Differenzierung und zu einer schnelleren Proliferationsrate der Zellen im Vergleich zur alleinigen Gabe von PDGF (Engel and Wolswijk 1996). Die Proliferation von Vorläuferzellen wird weiterhin von Insulin-like Growth Factor (IGF) und Neurotrophin-3 (NT3) beeinflusst (McMorris and Dubois-Dalcq 1988; Barres, Raff et al. 1994). Alleinige Gabe von IGF wirkt sich positiv auf die Proliferation und das Überleben von OPC aus, allerdings nur in der Anwesenheit von Insulin. NT-3 als Mitogen wirkt nur in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel mit Insulin und PDGF (Barres, Raff et al. 1994). Die Wachstumsfaktoren können also je nach Kombination miteinander sehr unterschiedliche Wirkung entfalten, teilweise sogar entgegengesetzte, wie ein Beispiel mit PDGF zeigt (McMorris and McKinnon 1996).

Transforming growth factor β (TGF- β) spielt auch eine Rolle bei der Differenzierung und Proliferation der OPC. So blockiert TGF- β die Wirkung von PDGF, senkt die Proliferationsrate der Zellen und treibt die Differenzierung der OPC voran (McKinnon, Piras et al. 1993).

Die Erkenntnisse über das Verhalten der Zellen basieren zu einem wesentlichen Teil auf Versuchen, die mit Zellen tierischen Ursprungs durchgeführt wurden. Experimente mit menschlichen OPC zeigen einen gravierenden Unterschied zwischen den Spezies, besonders in Bezug auf die Reaktion auf Wachstumsfaktoren. Die von Scolding durchgeführten Untersuchungen mit menschlichen adulten OPC machten diese Unterschiede deutlich. Kombinationen von PDGF mit FGF oder NT-3 zeigten entgegen der aus Tierversuchen bekannten Reaktionen keinen Effekt auf die Proliferation der untersuchten Zellen. Aufgrund der stark begrenzten Verfügbarkeit von Operationsbiopsien wurde in weiteren Versuchen ein Cocktail mit verschiedenen Wachstumsfaktoren getestet (bFGF, PDGF, IGF-1, CNTF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5), doch auch hier zeigte sich keinerlei Wirkung auf die Zellen. Bei der Untersuchung von perinatalen Vorläuferzellen dagegen zeigte sich eine mitogene Wirkung durch die Gabe von PDGF. Doch auch bei dieser Studie wurde die bei den Zellen muriner Herkunft beschriebene synergistische Wirkung von PDGF und bFGF nicht beobachtet – ein weiterer Hinweis auf die oben angesprochenen Speziesunterschiede (Scolding, Rayner et al. 1995).

2.9 Zelllinien als Instrument zur Untersuchung von menschlichen OPC

Das Verständnis der Biologie der OPC trägt dazu bei, den Prozess der Remyelinisierung und sein Scheitern im weiteren Verlauf der Erkrankung zu verstehen. Dieses Wissen kann die Grundlage bieten für zukünftige therapeutische Strategien, die sich auf die Unterstützung und Verstärkung der Remyelinisierung beziehen. Primäre menschliche Zellen sind für diese Forschung nur sehr schwierig zu kultivieren und natürlich auch nur in sehr begrenztem Maß vorhanden.

Zelllinien bieten die Gelegenheit, Zellen gleicher Herkunft und gleichen Entwicklungsstandes in ausreichender Anzahl mit relativ geringem Aufwand zur Verfügung zu stellen. Sie erscheinen somit als geeignetes Instrument zur weiteren Erforschung der menschlichen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.

2.10 Fragestellung

Ist es möglich, aus fetalen menschlichen Zellen mittels retroviraler Infektion mit einem onkogenhaltigen Vektor eine Zelllinie herzustellen, die ähnliche Eigenschaften wie OPC aufweist und sich daher als Instrument zur Erforschung der Biologie der menschlichen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen eignet?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkulturmedien

Tabelle 3.1.1-1: Kulturmedium N2B3

Medium	Menge
DMEM+1%PSF	92,8 ml
Insulin (0,5 mg/ml in 10 mM HCl)	2 ml
Transferrin (10 µg/ml in H ₂ O)	1 ml
Glutamin 100 mM	2 ml
SATO mix	2,2 ml

Tabelle 3.1.1-2: SATO mix, ergibt 444 ml

Medium	Menge
PBS mit 2 µ g/ml Rinderalbumin	200 ml
DdH ₂ O mit 1,6 mg/ml Putresin	200 ml
Ethanol mit 0,4 mg/ml Thyroxin	20 ml
Ethanol mit 0,34 mg/ml Trijodthyronin	20 ml
Ethanol mit 62 µg/ml Progesteron	2 ml
DdH ₂ O mit 0,39 mg/ml Natrium Selenite	2 ml

Tabelle 3.1.1-3: Enzymlösung I

Medium	Menge
Trypsin	2,5 ml
Collagenase 10 mg/ml	1 ml
DNase 1 mg/ml	1 ml
MEM mit HEPES Puffer	50 ml

Tabelle 3.1.1-4: Enzymlösung II

Medium	Menge
Trypsin-EDTA	2,5 ml
Collagenase 10 mg/ml	1 ml
DNase 1 mg/ml	1 ml
MEM mit HEPES Puffer	50 ml

Tabelle 3.1.1-5: Enzymlösung III

Medium	Menge
Trypsin Inhibitor	125 mg
DNase 1 mg/ml	100 μ l
Bovines Serum Albumin	83 mg
Fötales Kälber Serum	2,5 ml
MEM mit HEPES Puffer	50 ml

Tabelle 3.1.1-6: Einfriermedium

Medium	Menge
10% FCS	2,5 ml
100% FCS	2 ml
Dimethyl Sulfoxid	0,5 ml

Tabelle 3.1.1-7: 10% FCS

Medium	Menge
DMEM	450 ml
Fötale Kälberserum	50 ml

Tabelle 3.1.1-8: 2 x Transfektionspuffer

Medium	Menge
NaCl	1,6364 g
Hepes	1,3014 g
NaHPO ₄	0,0212g

Tabelle 3.1.1-9: Kultur- und Transportmedien

Medium	Hersteller
Dulbecco´s minimal Eagle medium (DMEM)	Gibco, Carlsbad, CA, Nr.11995
Fötale Kälberserum(FCS)	Gibco, Carlsbad, CA, Nr. 16000
Hanks Medium	Gibco, Carlsbad, CA, Nr. 24020
Hibernate E	Gibco, Carlsbad, CA, Nr. 10741
Minimal Eagle Medium(MEM) mit Hepes Puffer	Sigma, St. Louis, MO, Nr. M7278
Trypsin-EDTA	Gibco, Carlsbad, CA, Nr. 25300

3.1.2 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 3.1.2-1: Chemikalien und Enzyme

Chemikalien	Hersteller
Antimykotische Lösung	Sigma, St. Louis, MO, Nr. A4668
Bovines Albumin	Sigma, St. Louis, MO, Nr. A4503
BrdU Labeling and Detection Kit	Roche, Indianapolis, IN, Nr. 1296736
DAPI	Roche, Indianapolis, IN, Nr. 236276
Collagenase	Sigma, St. Louis, MO, Nr.C0255
Dimethylsulfoxid(DMSO)	Sigma, St. Louis, MO, Nr. D5879
Desoxyribonuklease I: Typ 4	Sigma, St. Louis, MO, Nr. D5025
Insulin	Sigma, St. Louis, MO, Nr. I6634
L-Glutamin	Sigma, St. Louis, MO, Nr. G7029
L-Thyroxin	Sigma, St. Louis, MO, Nr. T1775
Normales Ziegen Serum	Gibco, Carlsbad, CA, Nr. 50-062Z
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Burlingame, CA
Papain	Sigma, St. Louis, MO, Nr. P4762
Poly-L-Lysin	Sigma, St. Louis, MO, Nr. P6282
Progesteron	Sigma, St. Louis, MO, Nr. P0130
Putrescin	Sigma, St. Louis, MO, Nr. P5780
Selenit	Sigma, St. Louis, MO, Nr. S5261
Transferrin	Sigma, St. Louis, MO, Nr. T8158
Trijodthyroxin	Sigma, St. Louis, MO, Nr. T6397
TRIzol	Gibco, Carlsbad, CA, Nr.15596
Trypsin (10x)	Sigma, St. Louis, MO, Nr. T4549

Vectorshield	Vector laboratories, CA, USA, Nr. H1000
--------------	--

3.1.3 Wachstumsfaktoren

Tabelle 3.1.3-1: Wachstumsfaktorn

Wachstumsfaktor	Hersteller
Fibroblast Growth Factor, basic	Gibco, Carlsbad, CA, Nr. 13256
Platelet Derived Growth Factor, AA	Sigma, St. Louis, MO, Nr. P3076

3.1.4 Geräte

Tabelle 3.1.4-1: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Bildverarbeitungssoftware	Axiovision 3.0 , Zeiss, NY, USA
Gefrierschränke	Revco, NC, USA
	Kelvinator, CO, USA
Inkubatoren	Wasser-ummantelter Inkubator 3250, Forma Scientific, MA, USA
	CO2incubator314R, Labline, IA, USA
Kamera	AxioCam, Zeiss, NY, USA
Mikroskope	Axiovert 25, Zeiss, NY, USA
	Axioskop 2 plus, Zeiss, NY, USA
PCR Maschine	Omnigen Thermal Cycler, Hybaid, FL, USA
Reinraumwerkbank	Sterilgard Hood Class 2, Baker, NY, USA

Zentrifuge	Accuspin FR, Beckman, NY, USA
	Tischzentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.1.5 Primäre Antikörper

Tabelle 3.1.5-1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Art	Hersteller	Verd.
Anti-CNPase IgG1	mmc	Sigma, St. Louis, MO, Nr. C5922	1:20
Anti A2B5 IgM	mmc	Roche Indianapolis, IN, Nr. 1 300 016	1:10
Anti O4 IgM	mmc	Boehringer, Ridgefield, CT, Nr. 1518-925	1:4
		Chemicon, Temecula, CA, Nr. MAB 345	1:70
Anti-PDGF α Rezeptor IgG1	mmc	R&D Systems, Minneapolis, MN, MAB 1264	1:100
Anti rat NG2 Chondroitin Sulfat Proteoglycan IgG	rmc	Chemicon, Temecula, CA, Nr. AB 5320	1:50
Anti-cow GFAP	rmc	Dako, Raleigh, NC, Nr. Z0334	1:50
Anti-Galc IgG3	mmc	Roche, Indianapolis, IN, Nr. 1351621	1:10
Anti-SV40 large T Antigen IgG2a	mmc	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, Nr. sc-148	1:50
Anti-SV40 large T antigen IgG2a	mmc	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, Nr. sc-148	1:50
Anti-Thy1 IgG1	mmc	Harlan, Indianapolis, IN, Nr. MAS 379	1:20

mmc – mouse monoclonal; rpc – rabbit polyclonal, rmc- rabbit monoclonal

3.1.6 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3.1.6-1: Fluoreszin Konjugate

Antikörper	Hersteller
Anti-Rabbit IgG	Boehringer, Ridgefield, CT, Nr. 1814-257

Anti-Mouse IgG	Harlan, Indianapolis, IN, Nr. SBA1075-02
Anti-Mouse IgG2a	Harlan, Indianapolis, IN, Nr. SBA 1080-02
Anti-Mouse IgM	Harlan, Indianapolis, IN, Nr. SBA 1020-02

Tabelle 3.1.6-2: Rhodamin Konjugate

Antikörper	Hersteller
Anti-Rabbit IgG	Boehringer, Ridgefield, CT, Nr. 0100825
Anti-Mouse IgG1	Harlan, Indianapolis, IN, Nr. SBA 1070-02
Anti-Mouse IgM	Harlan, Indianapolis, IN, Nr. SBA 1020-03

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Allgemeine Angaben zur Zellkultur

Die Arbeit an den Zellkulturen wurde in einem separaten Raum des Labors durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden an einer Reinraumwerkbank vorgenommen. Die Arbeitsplätze wurden vor und nach jedem Arbeitsabschnitt mit 70% Ethanol gesäubert, um die Kulturen vor Kontaminationen zu bewahren. Alle Instrumente und Behältnisse, die in Kontakt mit den Zellen kamen, waren steril.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in drei separaten Wassermantelbrutschänken bei 33°C, 37°C oder 39°C, 5% CO₂-haltiger Atmosphäre und gesättigtem Wasserdampfdruck.

Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Dabei wurde eine Pipette benutzt, die an der Vakuumsleitung des Labors angeschlossen und mit einem Wasserschloss versehen war. Das gebrauchte Medium wurde gesammelt und entsprechend entsorgt.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit den Grundflächen 25 cm² (T25) oder 75cm² (T75) kultiviert. Desweiteren wurden Kulturschalen mit 6 oder 24 Vertiefungen sowie Mikrotiterplatten verwendet.

Nicht benötigte Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierzu wurden diese trypsiniert. Nach Zentrifugation wurde das so erhaltene Zell-Pellet im 2 ml Einfriermedium aufgelöst, in zwei Einfrierröhrchen umgefüllt und für 20 Minuten bei -20°C gelagert. Danach wurden die Zellen für 12 Stunden bei einer Temperatur von -70°C gelagert, bevor sie zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert wurden (Mattson 2000).

Das Auftauen der Zellen begann mit dem Erwärmen der Ampulle in warmem Wasser. Die Zellsuspension wurde möglichst bald mit 5 ml 10 % FCS und 3 ml 100 % FCS vermischt. Die Lösung wurde für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml 10 % FCS aufgelöst. Die Lösung wurde in T25 Kulturflaschen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hälfte des Mediums erneuert.

3.2.1.2 Präparation der primären Kulturen

Die Oligodendrozytenkulturen wurden aus fetalen menschlichen Rückenmarksproben hergestellt. Diese wurden von der „New York State-licensed Human Fetal Tissue Repository at the Albert Einstein College of Medicine“ zur Verfügung gestellt. Die postmortem gewonnenen Gewebeproben (19.-23. Woche Gestationsalter) wurden in Hibernate E Medium transportiert. Dabei wurde darauf geachtet, die Transportzeiten so kurz wie möglich zu halten, nicht jedoch länger als 3 Stunden.

In Petrischalen wurden die Gewebeproben in Hanks Medium von Resten der Meningen und Blutgefäße unter einem Mikroskop befreit. Diese wurden dann mit Hilfe eines Skalpells in kleine Stücke zerteilt. Danach wurde diese Mischung mit einer Pipette in ein Zentrifugenröhrchen übertragen und für drei Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 2 ml der Enzymlösung I gemischt und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch eine weitere Zentrifugation für drei Minuten bei 1000 rpm wieder gesammelt und der Überstand verworfen. Diese Prozedur wurde mit weiteren 2 ml der Enzymlösung I wiederholt. Das dabei entstehende Zellpellet wurde nun mit der Enzymlösung II vermischt und für 15 Minuten bei 37°C belassen. Nach einer letzten Zentrifugation für drei Minuten bei 1000rpm wurde der Überstand erneut verworfen und das Zellpellet mit der Enzymlösung III behandelt. Das Gemisch wurde jeweils dreimal durch eine Kanüle gepresst. Dieser Vorgang wurde mit jeweils enger werdenden Kanülen wiederholt.

Diese Einzelzellsuspension wurde nun mit 20 ml N2B3+10% FCS vermischt, um den Trypsinbestandteil der Enzymlösung zu inaktivieren. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 1000 rpm wurde das Zellpellet in 5 ml N2B3 aufgelöst und in Kulturflaschen für 12-14 Stunden bei 37°C inkubiert.

Der Überstand in diesen Flaschen wurde dann entfernt. Die Flaschen mit den anhaftenden Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Die nun darin gelösten Zellen wurden für fünf Minuten bei 1000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in 2 ml N2B3 aufgelöst. Diese Zellen wurden dann in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ pro Deckglas in einer Multischale mit 24 Vertiefungen ausplattiert. Die Deckgläser waren Poly-L-Lysin (PLL)-beschichtet. Nach vier Stunden im Inkubator bei 37°C wurden die einzelnen Vertiefungen mit 0,5 ml N2B3 gefüllt. Dem Medium wurde in den ersten fünf Tagen täglich human platelet-derived growth factor (PDGF) bis zu einer Endkonzentration von 10ng/ml zugegeben. Das Medium wurde alle zwei

Tage gewechselt. Am dritten Tag wurden diese Zellen für die Infektionsexperimente verwandt (Barres, Lazar et al. 1994; Scolding, Rayner et al. 1995; Mattson 2000)

3.2.2 RT-PCR

3.2.2.1 Methode und Protokoll


Die Polymerase Chain Reaction (PCR) Technik erlaubt die Vervielfältigung von DNA. Bei der Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) erfolgt zunächst eine Transkription von mRNA in cDNA mit Hilfe des Enzym Reverse Transkriptase. Die cDNA wird dann vervielfältigt.

In der Vorbereitung werden die RNA-haltige Probe, der Reaktionspuffer mit den Enzymen Omniscript und Sensiscript Reverse Transcriptase und HotStarTaq DNA Polymerase, jeweils 400 µM von jeder dNTP, 0,6 µM von jedem Primer, RNase Inhibitor mit RNase-freiem Wasser zu einem Endvolumen von 50 µl vermischt und mit einer Schicht Mineralöl überdeckt. Die Proben werden in einen Thermocycler gestellt.

Die Reaktion beginnt mit der reversen Transkriptase durch die Erwärmung des Reaktionsgemisches auf 50°C für 30 Minuten. Die Transkription der mRNA wird durch Erhitzen der Probe auf 95°C gestoppt. Diese Temperatur denaturiert das RNA-cDNA Hybrid und inaktiviert das Enzym. Die cDNA dient als Vorlage für die folgende PCR. Die PCR wird benutzt, um ein Segment der DNA zu vervielfältigen, das zwischen zwei bekannten Sequenzen liegt. Hierzu werden Primer benötigt, die eine komplementäre Oligonukleotidsequenz zu diesen Sequenzen besitzen. Nach der Trennung des mRNA-cDNA Komplexes wird die Probe auf eine Temperatur abgekühlt, an der die Primer sich an die Zielsequenz anlagern können. Die DNA-Polymerase nutzt diese Komplexe als Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges. Nach der Synthese wiederholt sich die Abfolge von Denaturierung, Anlagerung und Synthese. Bei jedem Zyklus verdoppelt sich die Menge der DNA. Die RT-PCR wurde ausgeführt mit Hilfe des Quiagen OneStep RT-PCR kit (QUIAGEN 2000, Valencia, USA).

Zur Kontrolle der Produktgröße wurden die Proben auf einem 1,5 % Agarose Gel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und unter UV-Licht betrachtet (Kawasaki 1990).

Abfolge der Reaktionsschritte im Thermocycler

Reverse Transkription	30 min	50°C
Beginn der PCR	15 min	95°C
dreistufige Reaktionsabfolge (der folgende Zyklus wurde 38 mal wiederholt)		
Denaturierung	1 min	94°C
Anlagerung	1 min	59°C 
Verlängerung	1 min	72°C
Beendigung der Reaktionsabfolge	10 min	72°C

3.2.2.2 Extraktion von RNA aus kultivierten Zellen

Das Kulturmedium wurde entfernt, die einschichtig wachsenden Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen. Zu jedem Deckglas wurden 280 µl TRIzol Reagenz gegeben und die Zellen durch mehrmaliges auf- und abpipettieren von der Unterlage gelöst. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden 56 µl Chloroform hinzugegeben und sofort kräftig für 15 Sekunden geschüttelt. Nach einer weiteren Inkubation für drei Minuten bei Raumtemperatur wurde das Zellgemisch in kleine Gefäße überführt und für 15 Minuten bei 12000g und 8°C zentrifugiert. Die Lösung unterteilt sich dabei in zwei Phasen: Eine untere rote Schicht und eine wässrige, farblose obere Schicht. Die RNA ist in der oberen Phase gelöst. Zur Prezipitation wird diese Phase vorsichtig abpipettiert und mit 140 µl Isopropylalkohol gemischt. Nach einer Inkubation für zehn Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung für zehn Minuten bei 12000g und 8°C zentrifugiert. Die RNA bildet sich dabei als farbloser, gelartiger Niederschlag am Boden des Gefäßes.

Nach der vorsichtigen Entfernung des Überstandes wird die RNA mit 300 µl 75 % Ethanol gewaschen. Die Lösung wird maschinell stark durchmischt und für fünf Minuten bei 7500g bei 8°C zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet für zehn Minuten getrocknet und danach in RNase freiem Wasser im 55°C warmen Wasserbad gelöst. (Almazan and McKay 1992)

3.2.2.3 Verwendete Primer

Es wurden veröffentlichte Primer Sequenzen für human PDGF α und β Rezeptoren, FGF 2 Rezeptoren, IGF 1 Rezeptoren sowie den TrkC Rezeptor benutzt (Sable and Yeh 1995). Alle anderen Primer wurden in Anlehnung an die Standard Richtlinien und mit Referenz zu veröffentlichten Wachstumsfaktor-Rezeptoren mRNA Sequenzen an der NCBI Entrez nucleotide facility hergestellt (Tabelle 3.2.2).



Tabelle 3.2.2: Tabelle 3 verwendete Primer bei der RT-PCR

Primer		Sequenz	Erwartete Produktgröße
PDGF α Rezeptor	F	5'-CAG CTG AGT GAG ATT GTG GAG-3'	408 bp
	R	5'-AGA GTC TAT GCC GAT GTC GTC-3'	
PDGF β -Rezeptor	F	5'-TGA CCA CCC AGC CAT CCT TC-3'	228 bp
	R	5'-GAG GAG GTG TTG ACT TCA TTC-3'	
IGF-1 Rezeptor	F	5'-ATG GAG GAG AAG CCG ATG TGT-3'	572 bp
	R	5'-GTT CTC CAG CTC TGA AGC AAT-3'	
MPG	F	5'-CAG TAC CCT ACG CAT ACT TCG A-3'	273 bp
	R	5'-ATA GGC ATC GTC CTC ATA CTC C-3'	
NG 2	F	5'-AGA GTC TCA ACA GTG CCA GCT A-3'	356 bp
	R	5'-GGC CAC ATC ATC TGT AGT CAA C-3'	
ErbB2	F	5'-AGC AGA AGA TCC GGA AGT ACA C-3'	375 bp
	R	5'- CAT AGG GCA TAA GCT GTG TCA C-3'	
ErbB3	F	5'- GAC CCA GAG AAG CTC AAT GTC T-3'	449 bp
	R	5'-CAG ACA CCT CCT CGG CTA TAA T-3'	
ErbB4	F	5'-CGC TTC AGT AGA GGA AGG ATC T-3'	322 bp
	R	5'-CAT GAC TAG TGG GAC CGT TAC A-3'	
FGF 2 Rezeptor	F	5'-GGT CGT TTC ATC TGC CTG GTC G-3'	282 bp
	R	5'-TGG CGC CCT TTA TCT GCA AGT A-3'	
TrkC	F	5'-CAC GCC AGG CCA AGG GTG AG-3'	571/613 bp
	R	5'-GAA TTC ATG ACC ACC AGC CA-3'	

TrK – tyrosine kinase neurotrophin receptor; NG2 – rat NG2 chondroitin sulfate proteoglycan; MPG – human melanomaassociated chondroitin sulfate proteoglycan; ErbB – human v-erb-b avian eythroblastic leukaemia viral oncogene homolog neuregulin receptor

3.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

3.2.3.1 Allgemein

Die Darstellung von Antigenen in kultivierten Zellen erfolgte durch Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen. Bei der hier benutzten indirekten Methode wird das Antigen zunächst mit einem Antikörper inkubiert. Die Lokalisation der Antigen-Antikörper-Komplexe wird durch antikörperspezifische, mit fluoreszierenden Farbstoffen verbundene sekundäre Antikörper angezeigt. Durch diese Methode wird die Signalintensität des Antigens im Vergleich zur direkten Methode verstärkt.

Die primären Antikörper erkennen und binden an spezifische Epitope. Diese können entweder monoklonal sein, das heißt sie erkennen nur ein bestimmtes Epitop, oder polyklonal, sie erkennen eine Mehrzahl von Epitopen.

Die sekundären Antikörper müssen sich gegen die entsprechende Klasse der Immunglobuline der jeweiligen Spezies richten. Diese Antikörper sind verbunden mit fluoreszierenden Farbstoffen. Diese Farbstoffe zeichnen sich dadurch aus, daß sie auftreffendes Licht einer bestimmten Wellenlänge mit einer verlängerten Wellenlänge wieder abgeben. Die jeweiligen Farbstoffe sind spezifisch in ihrem Absorptions- und Emissionsspektrum. Dies führt dazu, daß rot, grün und blau fluoreszierende Farbstoffe zur Verfügung stehen.

Das Fluoreszenzmikroskop ist ausgestattet mit einer Quecksilberlampe. Durch Filter wird die Intensität des Lichtes reguliert, und es ist so möglich, die jeweiligen Farbstoffe in der Zelle darzustellen.

Zur Aufzeichnung der Bilder wurde eine digitale Kamera verwendet (Zhang, Ge et al.)

3.2.3.2 Fixierung der Zellen

Die Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin überzogenen Glasplättchen kultiviert. Nach der Entfernung der Zellen aus der Nährlösung wurden sie sofort mit sterilem PBS überdeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Im Folgenden wurden sie zweimal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden sie mit eiskaltem Methanol bedeckt und für 15 Minuten bei -20°C fixiert. Methanol erhält hierbei die Proteinstruktur der Zelle durch Dehydratation und Koagulation.

Für einige Antigene war es notwendig, die Zellen mit Formaldehyd zu fixieren. Formaldehyd verbindet die Seitenketten benachbarter Proteine miteinander und erreicht so eine Fixierung der Proteine an ihrer ursprünglichen Position in der Zelle. Dabei wurden die Zellen für zwei Minuten bei Raumtemperatur mit 2% Paraformaldehyd inkubiert. (Zhang, Lundberg et al. 1998)

3.2.3.3 Auftragen der Antikörper

Der Fixierung der Zellen folgte nun das Auftragen der Antikörper. Die primären Antikörper werden in PBS mit 10% normalen Serums von Ziegen verdünnt. Jeweils 50 µl der Antikörper-Lösung wurde pro Coverslip aufgetragen, so daß das gesamte Glasplättchen bedeckt war. Bei 37° C wurden die Zellen nun für 20 Minuten mit dem Antikörper inkubiert. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:100 in PBS) wiederum für 20 Minuten bei 37°C behandelt und erneut in PBS gewaschen.

3.2.3.4 Gegenfärbung

Durch die Fixierung der Zelle erscheint die Morphologie häufig verändert. Um die Position des angefärbten Antigens in der Zelle beurteilen zu können, ist es daher manchmal erforderlich, das Chromatin des Zellkerns anzufärben, um sich so am Zellkern orientieren zu können. Hierzu wurde der fluoreszierende Farbstoff Hoechst 33258 verwendet. Der Coverslip wurde nach der Färbung mit dem sekundären Antikörper für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit dem Farbstoff inkubiert. Dadurch kommt es zu einer blauen Darstellung der Chromatinstrukturen im Fluoreszenzmikroskop. So ist man in der Lage, die Lokalisation des Antigens mit der anderer Strukturen in der Zelle zu vergleichen. (Zhang, Lundberg et al. 1998)

3.2.3.5 Nachweis von 5-Brom-2'-desoxy-uridin (BrdU)

Die Inkorporation von BrdU in die zelluläre DNA ermöglicht den Nachweis von Zellproliferation und DNA-Synthese. Das BrdU wird dabei durch einen monoklonalen

Antikörper nachgewiesen. Dieser Antikörper wird durch einen fluoreszierenden sekundären Antikörper mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie sichtbar gemacht.

Zum Nachweis wurde das „5-Bromo-2‘-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I (Roche, IN, USA)“ verwendet. (Almazan and McKay 1992)

3.2.3.6 Einbettung

Nach dem Färben müssen die Zellen auf einem Objektträger fixiert werden. Dabei ist es wichtig, daß das hierfür verwendete Medium eine Komponente enthält, die das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe verlangsamt. Hierzu haben wir Vectashield (Vector laboratories, CA, USA) verwendet. Die Glasplättchen wurden dann mit farblosem Nagellack versiegelt. Die Proben wurden bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

3.2.4 Infektion der primären Zellen mit retroviralem Vektor

3.2.4.1 Allgemein

Die spontane Immortalisierung von menschlichen Zellen ist ein extrem seltener Prozeß. Er wird mit einer Häufigkeit von $<10^{-12}$ beobachtet. Durch die Intergration von Genen in das Genom der primären Zellen ist man in der Lage, diesen Vorgang zu beeinflussen. Als immortalisierende Gene werden Gensequenzen bezeichnet, die nach dem Einbau in das Genom der Zelle zur Proteinbiosynthese von Eiweißen führen und dadurch die Häufigkeit der Immortalisierung steigern. Die Gene, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind das „Simian Virus 40 large T antigen (lTag)“, das Onkogen „cMyc“ und „human telomerase reverse transkriptase (hTERT)“.

Die Infektion durch das Simian Virus 40 (SV40) von Zellen führt zu einer zufälligen Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom. Dabei wird dem large T antigen (lTag), welches von den frühen Regionen des SV40 Genoms encodiert wird, die Funktion der Immortalisierung zugeschrieben. Eine wichtige Bedeutung erlangte eine temperatursensitive

Mutante dieses Gens, da hierbei die Expression temperaturabhängig ist. So ist bei einer permissiven Temperatur von 33°C das Genprodukt stabil und funktional, während es bei 39°C, entsprechend der Körperkerntemperatur der Ratte, instabil und somit funktionsunfähig ist. McKay ist es 1988 gelungen, mit Hilfe eines retroviralen Vektors, der eine temperatursensitive Variante des SV40 lTag zusammen mit einer Antibiotikaresistenz trug, eine Zelllinie ausgehend von brain precursor Zellen herzustellen. Die durch das lTag immortalisierten Zellen behalten den Phänotyp der Ursprungszelle und produzieren bei Transplantationsstudien mit Mäusen nur selten Tumore. Allerdings führt die Transformierung zu einer stark erhöhten Wachstumsrate der Zellen. Dies wird erklärt durch eine kürzere G1 Verweildauer (Sladek und Jacobberger, 1992). Der genaue Grund für die Wirkung des lTag ist weiterhin unklar. Ein Grund scheint die Interaktion des lTag mit dem Tumorsuppressorgenprodukt p53 zu sein. Zusätzlich führt die erhöhte lTag Proteinkonzentration in der Zelle zur vermehrten Aktivität der den Zellzyklus beeinflussenden Enzyme Cyclin A, Cyclin B und p34^{cdc25} (Chang und Schlegel, 1996).

In dieser Arbeit wurde die tsA/U18 temperatursensitive Mutante des SV40 large-T-antigen verwandt.

Zelluläre Protoonkogene kodieren für Wachstumsfaktoren und andere Proteine, die die normale Zellproliferation und Differenzierung beeinflussen. Der erfolgreiche Gen-Transfer von Onkogenen in die Zelle führt zur Immortalisierung der Zelle. Zu diesen Onkogenen gehört unter anderen das myc (Kelekar and Cole 1987). So wurden zum Beispiel neuronale Vorläuferzellen aus dem Riechepithel von adulten Mäusen durch retrovirale Transfektion des n-myc-Onkogens immortalisiert (MacDonald et al., 1996). Hinweise für einen möglichen Erfolg dieses Versuches gaben Erkenntnisse, nach denen die Expression von n-myc in vivo assoziiert ist mit der neuronalen Entwicklung und Differenzierung (Zimmermann et al., 1986) und das aktivierte n-myc im Zusammenhang steht mit der Entwicklung von Neuroblastomen (Alt et al., 1986).

Ein Grund für die begrenzte Lebensspanne von Zellen scheint die Verkürzung der Telomere zu sein. Viele maligne Zellen und Zelllinien, ausgehend von solchen Zellen, sind in der Lage, die Länge der Telomere konstant zu halten. Für diesen Vorgang ist ein RNA-Protein-Komplex verantwortlich, die Telomerase. Die katalytische Untereinheit dieses Komplexes (human telomerase reverse transcriptase oder hTERT) wurde mittels Transfektion in Zellen aktiviert und führte zu einer Verlängerung der Lebensspanne von den Zellen (Vaziri and Benchimol 1998). Beim Gentransfer kann man prinzipiell zwischen passiven und aktiven

Methoden unterscheiden. Als passive Methoden seien die Elektroporation oder Calciumphosphatpräzipitation genannt. Die aktive Methode benutzt Viren, um die Gene in das Genom integrieren zu lassen. Während die ersten Methoden einfacher in der Durchführung sind, ist man mit der aktiven Methode in der Lage, erfolgreiche Gentransfers auch mit geringeren Zellzahlen und empfindlichen Zellen durchzuführen.

Es wurde ein retroviraler Vektor benutzt, um die Zellen zu infizieren, und so das jeweilige Gen zu integrieren. Der Vektor ist pBABE, ein amphotrophes, replikations-unfähiges retrovirales Plasmid, das auf dem murinen moloney Leukämie-Virus beruht. Dieser Virus ist in der Lage, eine große Auswahl von Zelltypen zu infizieren. Im Lebenszyklus der Retroviren gelangt der Kern des Nucleocapsids durch Zellmembranverschmelzung in die Wirtszelle. Die virale RNA wird zunächst durch die viruseigene Reverse Transkriptase in ein DNA/RNA-Hybrid umgeformt und nach einem weiteren Schritt in das Wirtsgenom integriert. Durch Austausch der viralen Gene mit Fremdgenen (Transgenen) ist man in der Lage, die gewünschten Gene zu integrieren. Der Provirus besteht an beiden Enden aus jeweils identischen Long Terminal Repeats (LTR). Diese LTRs enthalten unter anderem die Promoterregion. In der Nähe der LTR befinden sich die Informationen für reverse Transkriptase, Primer-Binding-Site und das Signal Psi, verantwortlich für Verpackung der Virusbestandteile in das Capsid. Zwischen den LTR liegen die viralen Gene. Das gag/pro Gen codiert für Core-Proteine und virale Proteasen, das pol-Gen ist zuständig für die Expression von viralen Enzymen und das Gen env codiert für Glycoproteine auf der Membran. Bei dem Design von retroviralen Vektoren werden diese Gene ersetzt durch ein oder mehrere fremde Gene. Dadurch fehlen dem Virus die für den Lebenszyklus notwendigen Proteine und Enzyme. Diese Replikationsunfähigkeit des Virus ist ein wichtiger Sicherheitsfaktor für den Umgang mit dem Vektor.

Zur Herstellung von infektiösem Retrovirus wird die retrovirale Vektor-RNA in Zellen einer Verpackungszelllinie transfiziert. Diese Zellen exprimieren die für den Vermehrungszyklus notwendigen Enzyme und Proteine. Die RNA wird in das Capsid integriert, und durch Abschnürung werden die Viren in das Kulturmedium abgegeben (Schneider 2001).

In dieser Arbeit wurden retrovirale Vektoren mit jeweils zwei Fremdgenen kombiniert. Diese Kombination bestand aus einem Gen für eine bestimmte Antibiotikaresistenz, um die erfolgreich infizierten Zellen zu selektieren, und einem Onkogen, um das Wachstumsverhalten der Zellen zu verändern.

3.2.4.2 Herstellung der Vektoren

C-myc, temperatursensitives large T antigen oder hTERT Onkogene wurden in die Cloning sites von kommerziell erhältlichen Hygromycin-, Neomycin oder Puromycin-resistenten pBABE Vektoren eingefügt.

Die hier verwendeten Vektoren waren entweder cmyc oder ITag kombiniert mit Neomycin- oder Hygromycin-Resistenz, oder hTERT kombiniert mit Puromycin- oder Hygromycin-Resistenz.

Sowohl die Onkogene als auch der pBABE Vektor mit den verschiedenen Antibiotikaresistenzen waren im Labor verfügbar.

Zur Vervielfältigung der Plasmide wurden diese in Bakterien transformiert und die transformierten Zellen mit Hilfe der mit dem Plasmid übertragenen Ampicillinresistenz selektiert und expandiert. Zur Transformation der Bakterien wurden DH 5 α Kompetente E. coli (Gibco, Carlsbad, CA) verwandt. 50 μ l dieser Bakterienlösung wurden mit 10 μ g DNA vermischt. Nach einer halbstündigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien mit Hilfe des auf 42°C vorgeheizten Wasserbades für 35 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach weiteren zwei Minuten auf dem Eis wurde 450 μ l S.O.C. Medium zugegeben. Bei 37°C wurden die Röhrchen auf einer Schüttelapparatur bei 250 rpm inkubiert, bevor sie auf Agarplatten ausgesät wurden. Zur Selektion der transformierten Bakterienkolonien wurden die Agarplatten aus Luria broth (Sigma, CA, USA) mit einer Ampicillin Konzentration von 0,1 μ g/ml hergestellt. Auf diesen Agarplatten wurden die Bakterien für zwölf Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterienkolonien wurden mit Hilfe einer sterilen Glaspipette auf ein Gefäß mit 2 ml Luria broth (Ampicillin Konzentration 0,1 μ g/ml) übertragen. Nach einer weiteren zwölf Stunden dauernden Inkubationsphase bei 37°C wurden 0,5 ml dieser Kultur auf ein Gefäß mit 500 ml Luria broth mit Ampicillin (0,1 μ g/ml) übertragen und zwölf Stunden bei 37°C auf einer Schüttelplatte inkubiert. Zur Extraktion der Plasmid-DNA wurde in der Folge das „Quiagen Maxi-Prep Kit“ (Quiagen, CA, USA) benutzt. Zur Aufbewahrung wurde diese DNA in TE-Puffer gelöst und bei -70°C aufbewahrt. Die so hergestellte DNA wurde im nächsten Schritt zur Transfektion der NIH/3T3-Zellen verwandt. (Peden, Charles et al. 1989; Almazan and McKay 1992; Jung, Crang et al. 1994)

3.2.4.3 Titration der letalen Antibiotika-Konzentration für die NIH/3T3 Zellen

Zur Bestimmung der notwendigen Mindestdosis für die Selektierung der transformierten Zellen wurde eine Titration mit dem jeweiligen Antibiotikum durchgeführt. In jede Vertiefung einer 6er Kulturschale wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen ausgesät. Die Zellen wurden mit 2 ml 10% FCS bedeckt. In steigender Konzentration wurde den Zellen Antibiotika hinzugefügt. Zur Kontrolle blieb eine Vertiefung ohne Antibiotikum.

Das Medium wurde am DIV 5 gewechselt und das Resultat nach zehn Tagen bestimmt.

3.2.4.4 Titration der letalen Antibiotika-Konzentration für die primären Zellen

Am DIV 3 wurde das Medium der Zellen ausgetauscht. In fünf Vertiefungen wurde in steigender Dosierung Antibiotika zugegeben, die sechste Vertiefung wurde ohne Antibiotika als Kontrolle benutzt. Das Ergebnis wurde nach neun Tagen abgelesen.

3.2.4.5 Kalziumphosphat-Transfektion der NIH/3T3 Zellen

Die NIH/3T3-Zellen wurden in Petrischalen mit 10% FCS zwei Tage kultiviert. Das Medium wurde entfernt und durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Zur Transfektion der NIH/3T3 Zellen wurde 10 µg Plasmid-DNA verwendet. Diese DNA wurde in einem Röhrchen mit sterilem Wasser auf 500 µl Endvolumen aufgefüllt. In einem zweiten Röhrchen wurden 26 µl CaCl₂ (2,5 M) vorbereitet. Die zur Präzipitation notwendige Menge war zuvor durch Titration bestimmt worden. In das Röhrchen wurde nun langsam die DNA Lösung gegeben. Mit Hilfe einer Pipette wurde in dieses Gefäß zeitgleich Luft geblasen, während 500 µl 2xTFB (Transfektionspuffer) zugegeben wurde. Für jede der verschiedenen DNAs wurden gleichzeitig zwei Negativkontrollen angelegt. Eine Negativkontrolle bestand aus den Reaktionsbestandteilen ohne die DNA, und in einer weiteren Kontrolle fehlte sowohl DNA als auch CaCl₂.

Das Gemisch wurde nach 10 Minuten Präzipitation langsam über die Zellen geträufelt. Diese Zellen wurden 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen einem Glycerol-Schock unterzogen. Hierzu wurden sie zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und mit 5 ml PBS mit 15% Glycerin bedeckt und bei 37°C für 4 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen (zwei Mal mit serumfreiem Medium) werden die Zellen mit 10% FCS bedeckt und bei 37°C für 12 Stunden inkubiert. Nach dieser Phase werden die Zellen gesplittet. Hierzu werden sie mit 1 ml PBS und 100 µl Trypsin von der Oberfläche gelöst und mit 1 ml 10% FCS gemischt. Von diesem Zellgemisch wurden jeweils 100 µl auf drei Petrischalen mit 10 ml 10% FCS verteilt und für 12 Stunden bei 37°C bebrütet. Nach dieser Zeit wurde dem Medium zur Selektion der transformierten Zellen die jeweils notwendige Konzentration an Antibiotikum zugegeben. Die erforderlichen Konzentrationen

wurden durch Titration ermittelt und betragen für Neomycin 800 µg/ml und für Hygromycin 100 µg/ml. Nach fünf Tagen wurde das Medium gewechselt und erneut Antibiotika zugegeben. Nach ca. 7 Tagen konnte mit dem Auftreten von ersten Kolonien gerechnet werden. Diese wurden einzeln auf Kulturflaschen übertragen und bei 37°C bebrütet. Das Medium dieser Zellen enthält nun den infektiösen Retrovirus. Zur Infektion der primären Zellkulturen wurde der Überstand dieser Zellen nach 2 Tagen Kulturzeit benutzt (Graham and van der Eb 1973; Wigler, Silverstein et al. 1977).



3.2.4.6 Infektion der primären Zellkultur

Zur Infektion der primären Zellkulturen wurde das retrovirushaltige Medium der transformierten NIH/3T3-Zellen verwandt. Hierzu wurden diese in 6er Multischalen kultiviert. Vor der geplanten Infektion wurde die Nährlösung dieser Zellen durch 1 ml 10% FCS ersetzt. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und gefiltert (Porengröße 0,45 µm). Von dem Medium der primären Zellkultur wurden 300 µl je Vertiefung entfernt und durch eine gleiche Menge infektiöses Medium ersetzt. Nach Zugabe von 5 µl Polybren wurden die Zellen für 1½ Stunden bei 37°C bebrütet. Daraufhin wurde das Medium durch 0,5 ml N2B3 mit PDGF (10ng/ml) oder 10%FCS ersetzt und inkubiert. Nach 24 Stunden wurde den Vertiefungen die notwendige Dosis des jeweiligen Antibiotikums zugegeben. Das Medium inklusive Antibiotikum und Wachstumsfaktor wurde alle 2 Tage erneuert.

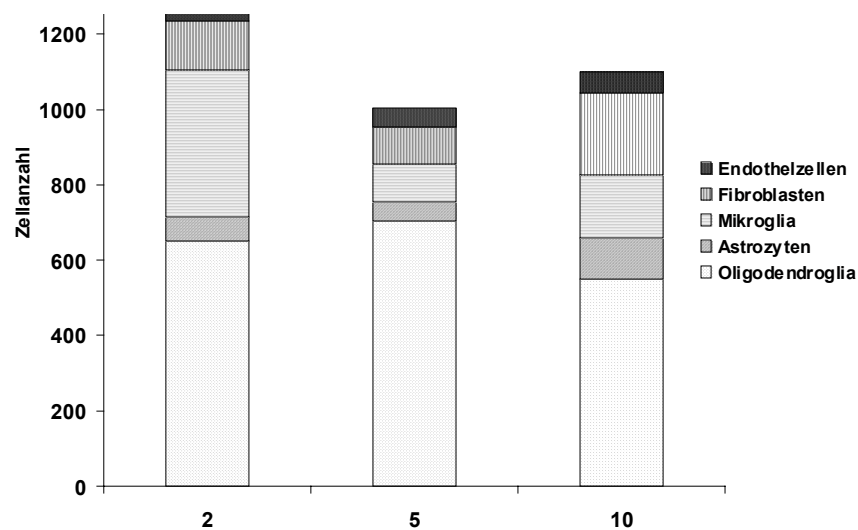
Die Kulturschalen wurden jeden Tag unter dem Mikroskop betrachtet, und es wurde versucht, Kolonien so früh wie möglich zu erkennen und auf separate Kulturgefäße zu übertragen. Dies geschah mit Hilfe von Pipetten. Die Lokalisation der Kolonien wurde unter dem Mikroskop auf den Kulturschalen mit einem Filzstift markiert und dann vorsichtig in eine Mikrotiterplatte übertragen. In diesen wurden die Zellen dann mit 0,5 ml 10% FCS bedeckt und weiter inkubiert. Sobald sich in diesen Vertiefungen ein Wachstum mit konfluierendem Zellrasen abzeichnete, wurden die Zellen auf Kulturschalen mit 6 Vertiefungen subkultiviert. Anschließend wurden sie zur weiteren Charakterisierung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und RT-PCR in Kulturschalen mit 24 Vertiefungen kultiviert (Westerman and Leboulch 1996).

4 Ergebnisse

4.1 Eigenschaften der primären Zellkulturen

Bei der Kultivierung der primären Zellen wurde ein Anteil der Oligodendroglia an der Gesamtzellzahl von 70% nach 5 DIV (day in vitro) erreicht (). Diese Zellpopulation setzt sich zusammen aus bi- oder tripolaren Zellen, die sowohl NG2 und PDGF- α Rezeptor exprimieren als auch Antigene, die durch den A2B5 Antikörper erkannt werden. Einige Zellen wiesen auch eine Immunoreaktivität zu dem Antikörper O4 auf.

Tabelle 4: Anteil der Oligodendroglia bei den primären Zellkulturen



4.2 Titrationsergebnisse der NIH/3T3 Zellen

Die Titration wurde wie beschrieben durchgeführt und ergab folgendes Ergebnis:

Tabelle 3.2.4-5: Antibiotikakonzentration für die NIH/3T3 Zellen

Antibiotikum	Letale Dosis
Neomycin	800 µg/ml
Hygromycin	100 µg/ml
Puromycin	2,5 µg/ml

4.3 Titrationsergebnisse der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen-Kulturen

Tabelle 3.2.4-6: Antibiotikakonzentration für die primären Zellen

Antibiotikum	Letale Dosis
Neomycin	2000 µg/ml
Hygromycin	300 µg/ml
Puromycin	5 µg/ml

4.4 Transfektionsergebnisse der NIH/3T3 Zellen

Die erfolgreiche Transfektion der Zellen wurde durch die Selektierung auf das entsprechende Antibiotikum belegt. Nach 8 Tagen erschienen die ersten Kolonien. Die Kontrollen ohne Antibiotikazugabe wuchsen zu einem konfluenten Zellrasen. Die Kontrollen ohne Zugabe von DNA bzw. ohne Zugabe von sowohl DNA also auch CaCl_2

zeigten bei der Kultivierung ohne Antibiotika einen Zellrasen, bei der Zugabe von Antibiotika zeigte sich kein Wachstum.

Die gewonnenen Überstände enthielten einen infektiösen Retrovirus mit den folgenden Kombinationen von Onkogen und Antibiotikaresistenz:

cMyc + Neomycin-Resistenz

cMyc + Hygromycin-Resistenz

ITag + Neomycin-Resistenz

ITag + Hygromycin-Resistenz

hTERT + Puromycin-Resistenz

hTERT + Hygromycin-Resistenz

4.5 Durch die Infektion entstehen 22 Zelllinien

Es wurden Infektionsversuche mit sechs verschiedenen primären Kulturen vorgenommen. Dies waren PP23, PP25, PP28, PP36, PP38 und PP42. Die Infektionen wurden mit verschiedenen Onkogen/Resistenz Kombinationen vorgenommen.

Von den primären Kulturen wurden zwei erfolgreich infiziert. Dies waren die beiden Kulturen PP36 und PP38, insgesamt entstanden 22 Zelllinien zur weiteren Untersuchung.

PP36 ergab 5 Zelllinien, die alle auf die Übertragung des Onkogens cMyc zurückzuführen sind. Dieses Onkogen war kombiniert mit der Antibiotikaresistenz für Neomycin.

Bei PP38 wurden 17 Zelllinien weiter verfolgt und expandiert. Dabei handelte es sich um Zellen mit der Integration des Onkogens ITag mit der Resistenz auf Hygromycin.

Die Immortalisierung war also erfolgreich durch die retrovirale Infektion, entweder mit ITag kombiniert, mit Hygromycin-Resistenz oder cMyc mit Neomycin-Resistenz.

4.6 Einige Zelllinien lassen sich durch NG2 markieren

Die entstandenen Zelllinien wurden durch Immunfluoreszenz mit den Antikörpern NG2 als OPC-Marker und Anti-Thymin als Fibroblasten-Marker auf ihre Eigenschaften überprüft. Dabei waren 17 Zelllinien sowohl positiv für NG2 und negativ für Thy (Ergebnisse siehe Tabelle 3.2.4-7: NG2 und Thy Profil der Zelllinien). Diese Klone wurden weiter untersucht.

Tabelle 3.2.4-7: NG2 und Thy Profil der Zelllinien

Zelllinie	PP	Transgen	Färbung
A	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
B	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
C	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
D	PP36	cMyc/neo	NG2-/Thy+
E	PP36	cMyc/neo	NG2-/Thy+
F	PP36	cMyc/neo	NG2+/Thy+
G	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
H	PP38	lTag/Hygro	NG2+/Thy-
I	PP36	cMyc/neo	NG2-/Thy+
K	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
L	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
M	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
O	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
P	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
Q	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
R	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
S	PP36	cMyc/neo	NG2-/Thy-
T	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
U	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
W	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-
Y	PP38	lTag/hygro	NG2+/Thy-

4.7 Zelllinien weisen ein positives mRNA-Profil für NG2 und PDGF-R

Ein Großteil der NG2+ Zelllinien wurde per RT-PCR auf die Expression von mRNA für den Rezeptor von PDGF und für NG2 hin untersucht (Abbildung 4-1):

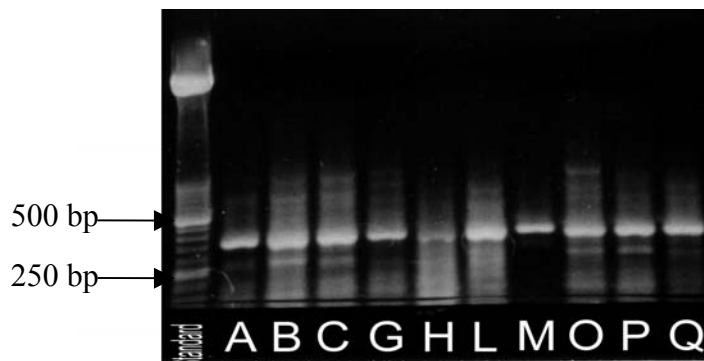


Abbildung 4-1: RT-PCR Produkte, RNA isoliert aus verschiedenen Zelllinien, durchgeführt mit dem Primer für PDGF-Rezeptor, erwartete Produktgröße 408 Basenpaare

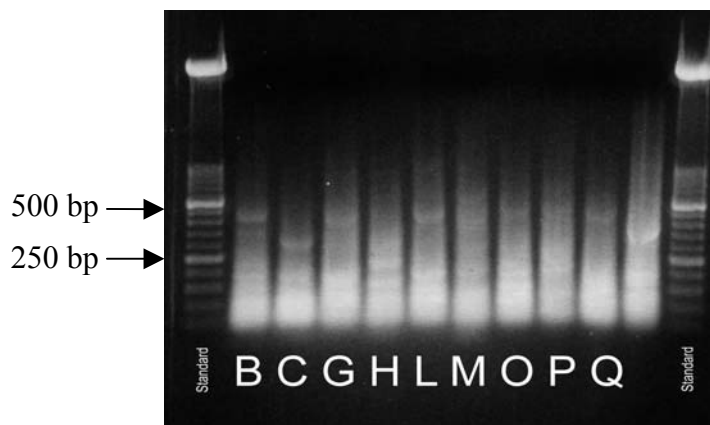


Abbildung 4-2: RT-PCR Produkte, RNA isoliert aus verschiedenen Zelllinien, durchgeführt mit dem Primer für NG2, erwartete Produktgröße 356 Basenpaare

Dabei zeigte sich für alle untersuchten Zelllinien ein PCR-Produkt der erwarteten Größe für NG2, während sich nur bei den Zelllinien B, G und L ein Produkt der erwarteten Größe für den PDGF-Rezeptor zeigte (Abbildung 4-2). Diese drei Zelllinien wurden weiter untersucht. Die restlichen Zellen wurden zur späteren Untersuchung eingefroren.

4.8 Die Zelllinien zeigen temperatursensitives Verhalten

Die Integration der temperatursensitiven Variante des ITag-Gens führt erwartungsgemäß zum Nachweis des ITag und Proliferation bei einer Umgebungstemperatur von 33°C. Die Erhöhung der Temperatur auf 39°C führte zum Sistieren des Wachstums, ITag war nicht mehr nachweisbar (Abbildung 4-1).

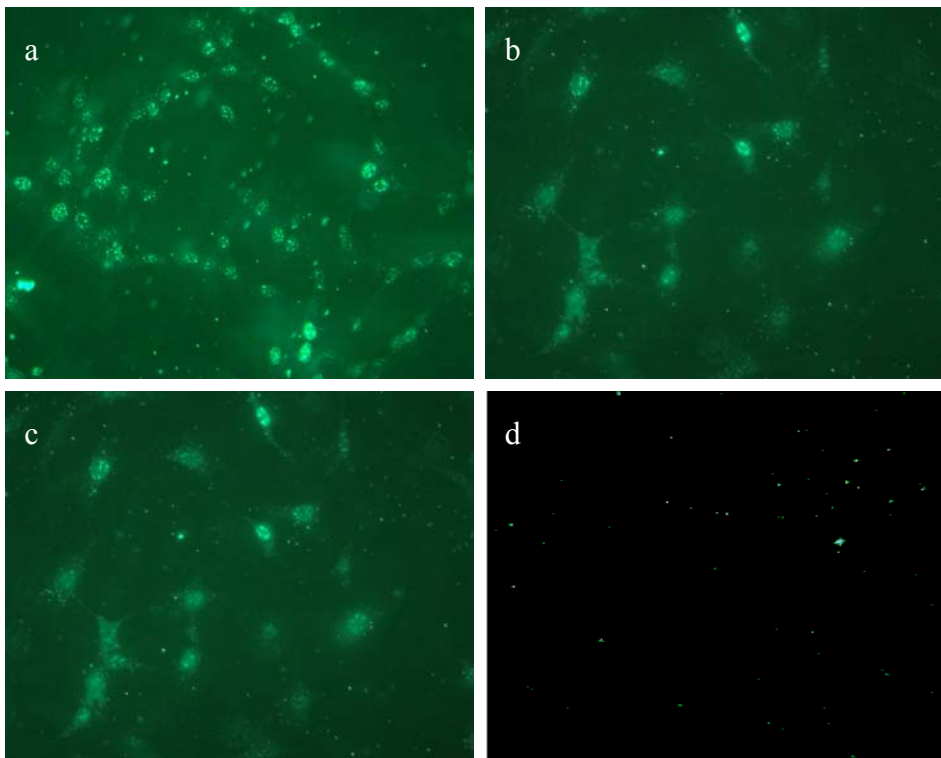


Abbildung 4-1 Nachweis von ITag, Immunfluoreszenzaufnahme, Zellen kultiviert bei 33°C und 0,5% FCS (a, b, c), sekundärer Antikörper gekennzeichnet mit FITC, Zelllinie B (a), Zelllinie G (b) und Zelllinie L (c), Zellen die bei 39°C kultiviert wurden zeigen keine Reaktivität zu dem Antikörper (d)

4.9 Expression von mRNA für Wachstumsfaktorrezeptoren

Bei Zelllinie B zeigt sich mittels RT-PCR eine Vielzahl von Wachstumsfaktorrezeptoren (Abbildung 4-1). So exprimieren die Zellen mRNA der Rezeptoren von PDGF (PDGF α und β Rezeptor), TGF (Erb B2/3/4) basischen FGF (FGF R2), IGF (IGF-1-Rezeptor) und NT3 (Trk C). NG2 und MPG (human melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan).

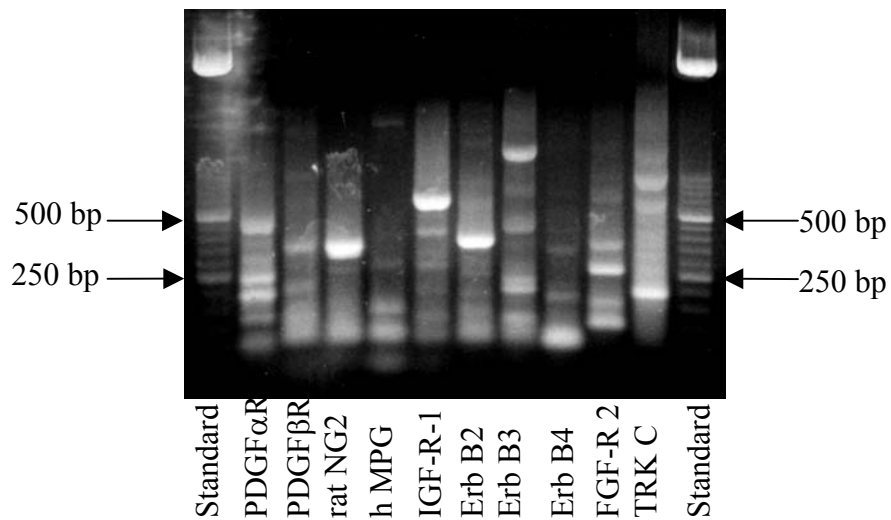


Abbildung 4-1: RNA aus der Zelllinie B, RT-PCR Ergebnis mit verschiedenen Primern

4.10 Zellen exprimieren ein Marker-Profil charakteristisch für OPC

Das Antigenprofil der Zelllinien wurde wie folgt mittels Immunfluoreszenz gesichert.

Für Zelllinie B:

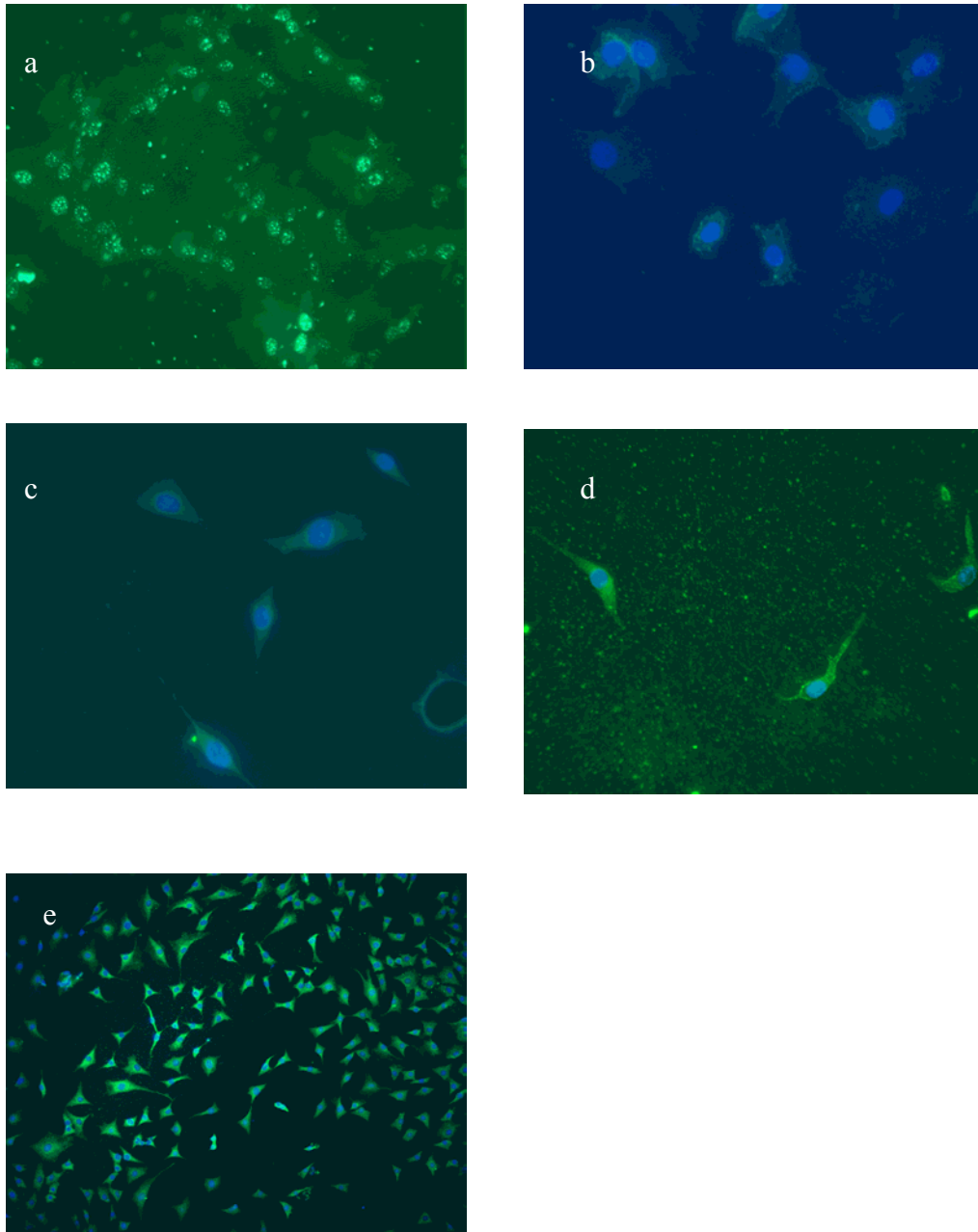


Abbildung 4-1: Immunfluoreszenzaufnahmen, a) Anti-lTag, DIV(day in vitro)6; b) NG2, DIV 6; c) anti-GFAP, DIV 10; d) anti- PDGF α , DIV 10; e) anti- CNPase, DIV 18; (b, c, d, e) Zellkern-Gegenfärbung mit HOECHST, (a-d) kultiviert bei 33°C und 0,5% FKS, sekundärer Antikörper markiert mit FITC

Für die Zelllinie G:

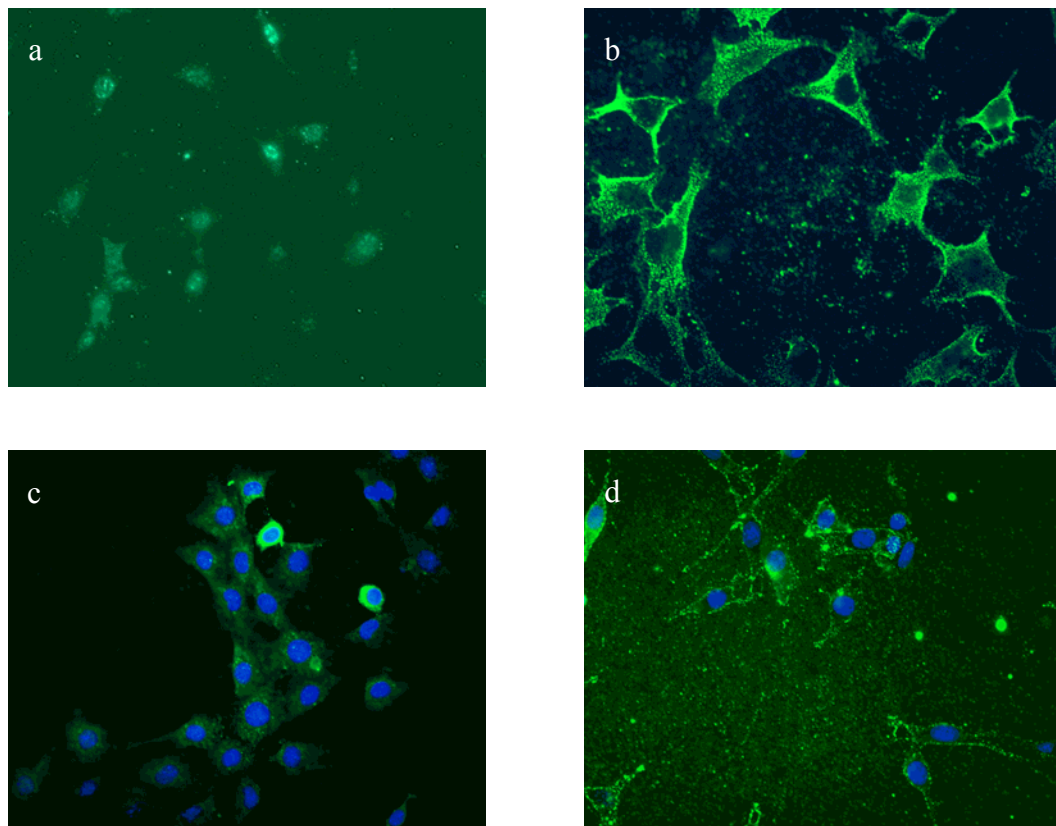


Abbildung 4-2 : Immunfluoreszenzaufnahmen, (a) ITag-Antikörper, (b) NG2-Antikörper, (c) CNPase-Antikörper, (d) PDGF-Rezeptor-Antikörper, sekundärer Antikörper markiert mit FITC

Für die Zelllinie L:

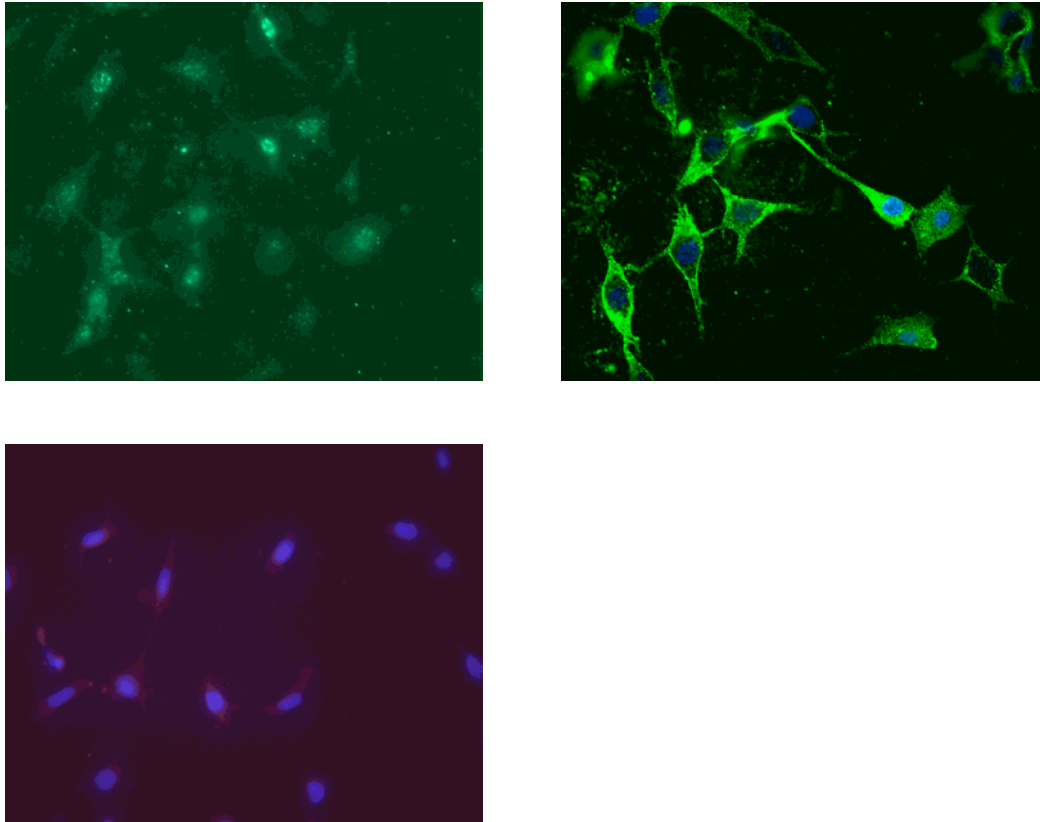


Abbildung 4-3: Immunfluoreszenzaufnahmen, (a) ITag-Antikörper, (b) NG2-Antikörper, (c) A2B5-Antikörper, (d) CNPase-Antikörper, (a,b,c) sekundärer Antikörper markiert mit FITC, (d) sekundärer Antikörper markiert mit TexasRed

5 Diskussion

Es ist gelungen durch die retrovirale Infektion mit einer temperatursensitiven Variante des SV40 ITag (tsA/U18) aus fötalen, menschlichen Zellen OPC-Zelllinien herzustellen. Die Zelllinien weisen eine für OPC typische Expression von Markern auf.

5.1 Diskussion der Versuchskonzeption und der Methoden

Bei der Untersuchung von Oligodendrozyten-Vorläufer-Zellen stößt man auf verschiedene Probleme. Präparationen menschlicher primärer Zellen sind nur schwer zugänglich, und adultes Gewebe enthält einen vergleichsweise geringen Anteil von OPC. Die Zellkulturen, die aus dem Gewebe hergestellt werden, enthalten eine Vielzahl von verschiedenen Zellen (Tab. 4.1). Methoden zur Anreicherung von OPC, wie zum Beispiel das Immunopanning, sind sehr aufwendig. Auch sind die Zellen in Bezug auf ihren Differenzierungsgrad nicht einheitlich, so daß die Abfolge der verschiedenen Stadien anhand solcher Kulturen nur vorsichtig beurteilt werden kann. Zwar ist es möglich Reinheiten von bis zu 90% zu erreichen, dies ist jedoch nur mit einem hohen Aufwand zu erreichen (Yang, Watanabe et al. 2005). Zelllinien sind angesichts dieser Probleme mit primären Kulturen ein wichtiges Hilfsmittel in der Erforschung der Biologie dieser Zellen. Sie stellen unabhängig von Biopsieentnahmen ausreichend Zellen zur Verfügung. Die dazu notwendige Methode ist im Vergleich zu primären Kulturen relativ einfach. Die Zellen sind einheitlichen Ursprungs und ermöglichen so den direkten Vergleich. Dabei darf man natürlich nicht außer Acht lassen, daß es sich bei diesen Zellen um ein Modell mit möglicherweise, durch die Manipulation am Genom, veränderten Reaktionen auf Wachstumsfaktoren und andere Kulturbedingungen handelt. Trotz dieser möglichen Nachteile bietet sich mit dem Gebrauch von menschlichen Zelllinien eine Methode, Erkenntnisse aus Zellen muriner oder anderer tierischer Herkunft an menschlichen Zellen zu überprüfen, ohne dafür stark limitierte und schwer herzustellende menschliche primäre Zellen zu benutzen.

Die hier für die Infektion benutzten primären Zellkulturen entstammten aus der Präparation von fötalem Rückenmark. Versuche, aus adultem Biopsiematerial Zelllinien herzustellen, gingen mit sehr geringer Effektivität der Infektion einher (unveröffentlichte Beobachtungen Wilson). Fötale Zellen erschienen aus diesem Grund geeigneter für die Herstellung von

primären Zellkulturen, da in dieser Entwicklungsstufe mehr OPC in einem frühen Entwicklungsstadium anzutreffen sind und somit die Aussichten auf eine erfolgreiche Infektion steigt. Durch die Kulturbedingungen der primären Zellen ist es gelungen, den Anteil der OPC in den Kulturen zum Zeitpunkt der Infektion auf 70% zu steigern (Wilson, Onischke et al. 2003). Um die Effektivität des Gentransfers zu steigern, wurde mit der retroviralen Infektion eine aktive Art der Genübertragung benutzt. Diese Methode zeichnet sich im Gegensatz zu passiven Methoden (z. B. Elektroporation und CaCl-Transfektion) durch eine hohe Effizienz aus und ist gleichzeitig auch bei sehr empfindlichen Zellen anwendbar (Mulligan 1993). Das Genkonstrukt wird dauerhaft in das Genom der Zelle integriert und führt so zu stabilen Transfektionen. Das eingefügte Material steht dabei unter der Transkriptionskontrolle eines Promoters in den LTR.

Die Kombination des Onkogens mit einer Antibiotikaresistenz ermöglicht die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen. Um die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transfektion zu erhöhen, wurde dieses Experiment mit drei verschiedene Genkonstrukten vorgenommen.

Das Onkogen ITag wurde bereits in der Vergangenheit erfolgreich benutzt, um Zelllinien aus neonatalen Ratten OVZ herzustellen (Barnet, Franklin et al. 1993).

Das übertragene Gen SV40 ITag führt zur Hemmung der Differenzierung der Zellen. In diesem Experiment wurde eine temperatursensitive Variante benutzt. Diese Methode hat den Vorteil, daß je nach Temperatur das Genprodukt an- oder abgeschaltet ist. Bei der permissiven Temperatur von 33°C ist das Produkt stabil und verhindert die Arretierung der Zellen in G1 oder G2 des Zellzyklus. Die Zellen können bei dieser Temperatur expandiert werden. Bei 39°C führt die Inaktivierung des Genprodukts zum normalen Zellzyklus der Zellen mit der Möglichkeit zur Differenzierung (Jat and Sharp 1989). Diese Vorzüge machen die temperatursensitive Variante des ITag zu einem wertvollen Werkzeug zur Erforschung der Wachstumseigenschaften von Zellen.

Auch das Einfügen von c-myc Gens in das Genom unter der Kontrolle eines kraftvollen Promoters führt zu einer Veränderung des Zellzyklus. Dieses Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der bei kontinuierlicher Expression zu einem vermehrten Wachstum in vitro führt (Bouchard, Staller et al. 1998). Die bisher entstandenen Zelllinien durch Intergration des c-myc Gens gaben Anlaß zur Hoffnung, über diesen Mechanismus eine OPC Zelllinie herzustellen.

In den letzten Jahren wurden menschliche Zelllinien hergestellt, in denen Zellen das Telomerase Reverse Transkriptase Protein (hTERT) exprimieren (Bodnar, Ouellette et al. 1998; Counter, Hahn et al. 1998; Zhu, Wang et al. 1999). Dieses Protein ist die katalytische

Untereinheit der Telomerase. Die Expression aktiviert das Enzym und verhindert so die Verkürzung der Telomere. Normalerweise kommt dieses Enzym in seiner aktiven Form nur in wenigen somatischen Zellen vor.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Von diesen drei Genkonstrukten führte nur die Integration des ITag zur Entstehung einer OPC Zelllinie. Die expandierten Zellen, die nach Infektion mit dem Retrovirus das Onkogen c-myc enthielten, zeigten sich alle als positiv für den Fibroblasten-Marker THY.

Mit Hilfe der Markerprofile war es möglich, vielversprechende Zelllinien zu selektieren. Die grobe Unterscheidung gelang mit der Unterteilung zwischen Thy und NG2 positive Zellen. Dadurch wurde der Aufwand, alle Zelllinien auf alle anderen Marker zu prüfen, verringert. Die so erkannten NG2 positiven und Thy negativen Zellen wurden mit Hilfe der RT-PCR auf die Expression weiterer Marker für die OPC geprüft. Die RT-PCR erlaubt mit einem relativ geringen Aufwand die mRNA Level für bestimmte Markerproteine zu kontrollieren. Hierzu wurden Primer für NG2 und den PDGF- α -Rezeptor eingesetzt. So gelang es, die vielversprechendsten Zelllinien herauszufinden und auf weitere Marker mit Hilfe der ICC zu überprüfen.

Die Transfektionen ergaben 22 Zelllinien. Diese ließen sich expandieren und dann weiter untersuchen. Drei der Zelllinien zeigten dabei ein vielversprechendes Profil und wurden genauer untersucht. Als ausschlaggebend für diese Selektion war der Nachweis mit Hilfe der RT-PCR sowohl für NG2 als auch PDGF- α -Rezeptor. Beide Marker werden von den Vorläuferzellen expremiert und eigneten sich daher als Unterscheidungsmerkmal (Nishiyama, Lin et al. 1996). Die RT-PCR zeigen Banden in der erwarteten Produktgröße für die Zelllinien B, G, und L und führten zur Entscheidung, im weiteren Verlauf diese Zelllinien genauer zu betrachten.

Zur Kontrolle der erfolgreichen Transfektion wurden diese Zellen mit einem Antikörper für ITag gefärbt. Alle drei Zelllinien zeigten dabei positive Immunoreaktivität zu diesem Antikörper. Die Expression des ITag und seine Wirkung auf die Zellproliferation zeigten sich auch bei dem Wachstumsverhalten der Zellen bei verschiedenen Temperaturen. So ergab die Proliferationskontrolle mit Hilfe der Inkorporation von BrDU bei 33°C einen Einbau von BrDU, während sich nach dem Kultivieren der Zellen bei 39°C nahezu keine Inkorporation

nachweisen ließ. Dieser Nachweis deckt sich auch mit der Beobachtung, daß sich bei 39°C das Wachstum der Zellen stark verlangsamt.

Die Zellen wurden mit einer Anzahl von Antikörpern gefärbt, um ihr Antigen-Profil zu bestimmen. Dabei zeigte sich für die Zelllinien eine unterschiedliche Verteilung von Antigenen.

Die Zelllinie B zeigt zunächst Immunreaktivität zu den beiden Vorläuferzellmarkern NG2 und anti-PDGF-Rezeptor. Dies bestätigt die Ergebnisse aus der RT-PCR, bei der bereits die mRNA für beide Proteine gefunden wurden. Bemerkenswert ist allerdings auch die Immunreaktivität sowohl für GFAP, einem typischen Marker für Astrozyten als auch für CNPase, einem Indikator für unreife, aber terminal differenzierte Oligodendrozyten. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob die Zellen in der Lage sind, in Analogie zu den O-2A-Zellen bei der Ratte, *in vitro* zwei verschiedene Differenzierungswege zu beschreiten und das Potential für eine Entwicklung sowohl in Oligodendrozyten als auch Astrozyten bergen (Raff, Williams et al. 1984).

Auch die Zelllinie G zeigt die frühen Differenzierungsmarker der OPC-Linie NG2 und PDGF-Rezeptor. Zusätzlich zu diesen ist eine positive Reaktion für den Antikörper gegen das Protein CNPase gefunden worden. Dieses periphere Myelinprotein kennzeichnet in den Differenzierungsstadien den Beginn der terminalen Differenzierung und damit den unreifen Oligodendrozyt. Diese Zelllinie scheint in der Lage zu sein, das Stadium der Vorläuferzelle zu verlassen und zu unreifen Oligodendrozyten zu differenzieren. Dieses Zellstadium wird in der Abfolge der Differenzierungsgrade gefolgt von dem reifen, zur Myelinisierung fähigen Oligodendrozyt und ist somit in der Entwicklungslinie bereits recht weit fortgeschritten (Pfeiffer, Warrington et al. 1993).

Ein Entwicklungspotential von der Vorläuferzelle bis hin zu reiferen Stadien läßt sich auch bei der Zelllinie L finden. Hier sind die frühen Stufen gekennzeichnet durch die Expression von NG2 und A2B5. Letzterer ist ebenso wie PDGF-Rezeptor ein früher Marker der Oligodendrozytenlinie. Die im Verlauf der Kultur beobachtete Immunreaktivität zu CNPase zeigt das Potential zu weiterer Differenzierung.

Bei der Untersuchung mit Hilfe der RT-PCR wurde eine Vielzahl von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren gefunden. Diese positiven Funde weisen auf mögliche Mitogene der Zellen hin, deren Wirkung auf diese Zellen weiter untersucht werden müssen.

5.3 Schlußfolgerungen

Es ist gelungen, drei menschliche Zelllinien herzustellen und zu charakterisieren, die alle die Merkmale von OPC zeigen. Somit wurde ein Werkzeug geschaffen, mit dem weitere Untersuchungen zur Biologie der menschlichen OPC erleichtert werden.

In weiteren Versuchen wird es wichtig sein, genaue Wachstumsanforderungen der Zellen zu definieren. Besonders die Anforderungen an Wachstumsfaktoren muss in Zukunft Gegenstand der Arbeit mit diesen Zellen sein, um die optimalen Bedingungen für Wachstum und Differenzierung herauszufinden. Die aus Versuchen mit Zellen tierischer Herkunft bekannten Mitogene sowie das bereits bekannte Rezeptorprofil bieten hierfür eine Vielzahl von Ansatzpunkten. Weiterhin wäre es wünschenswert, durch geeignete Methoden die Klonalität der Zelllinien nachzuweisen.

Trotz der Limitierungen, die ein *in vitro* System mit genetisch manipulierten Zellen zwangsläufig beinhaltet, können Untersuchungen mit diesen Zellen das Wissen über menschliche OPC vermehren. Dieses könnte besonders bei der Entwicklung von therapeutischen Strategien, die die Remyelinisierung bei Patienten mit MS unterstützen von entscheidender Bedeutung sein.

Literaturverzeichnis

- Almazan, G. and R. McKay (1992). "An oligodendrocyte precursor cell line from rat optic nerve." Brain Res. **579**(2): 234-245.
- Althaus, H. H., S. Kloppner, et al. (1992). "Nerve growth factor induces proliferation and enhances fiber regeneration in oligodendrocytes isolated from adult pig brain." Neurosci Lett **135**(2): 219-23.
- Barres, B. A., M. A. Lazar, et al. (1994). "A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development." development **120**(5): 1097-1108.
- Barres, B. A., M. Raff, et al. (1994). "A crucial role for neurotrophin-3 in oligodendrocyte development." Nature **367**: 371-375.
- Barnett, S. C., R. J. M. 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." European Journal of Neuroscience **5**: 1247-1260.
- Baumann, N., C. Jacque, et al. (1983). "Myelin in normal and diseased states." Neurol Clin **1**(3): 701-27.
- Baumann, N. and D. Pham-Dinh (2001). "Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System." **81**(2): 871-927.
- Blakemore, W. F., J. M. Gilson, et al. "Transplanted glial cells migrate over a greater distance and remyelinate demyelinated lesions more rapidly than endogenous remyelinating cells." J.Neurosci.Res.2000.Aug.1.;61.(3.):288.-94. **61**(3): 288-294.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, et al. (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." Science **279**(5349): 349-352.

- Bouchard, C., P. Staller, et al. (1998). "Control of cell proliferation by Myc." Trends Cell Biol. **8**(5): 202-206.
- Bunge, M. B., R. P. Bunge, et al. (1961). "Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord." J Biophys Biochem Cytol **10**: 67-94.
- Carroll, W. M., A. R. Jennings, et al. (1998). "Identification of the adult resting progenitor cell by autoradiographic tracking of oligodendrocyte precursors in experimental CNS demyelination." Brain **121**(Pt 2): 293-302.
- Counter, C. M., W. C. Hahn, et al. (1998). "Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **95**(25): 14723-14728.
- Dawson, M. R., J. M. Levine, et al. "NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors?" J.Neurosci.Res.2000.Sep.1.;61.(5.):471.-9. **61**(5): 471-479.
- Dibello, c., M. r. l. Dawson, et al. (1999). "Generation of oligodendroglial progenitors in acute infalmmatory demyelinating lesions of rat brain stem is associated with demyelination rather than inflammation." journal of neurocytology **28**: 365-381.
- Eisenbarth, G. S., F. S. Walsh, et al. (1979). "Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(10): 4913-7.
- Engel, U. and G. Wolswijk (1996). "Oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells derived from adult rat spinal cord: in vitro characteristics and response to PDGF, bFGF and NT-3." GLIA **16**(1): 16-26.
- Felts, P. A. and K. J. Smith (1992). "Conduction properties of central nerve fibers remyelinated by Schwann cells." Brain Res **574**(1-2): 178-92.
- Ffrench-Constant, C. and M. C. Raff (1986). "Proliferating bipotential glial progenitor cells in adult rat optic nerve." Nature **319**(6053): 499-502.
- Gensert, J. M. and J. E. Goldman (1997). "Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS." Neuron **19**(1): 197-203.
- Ghatak, N. R., A. Hirano, et al. (1973). "Remyelination in multiple sclerosis with peripheral type myelin." Arch Neurol **29**(4): 262-7.

- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5." Virology **54**(2): 536-9.
- Grinspan, J. B., J. L. Stern, et al. (1993). "Trophic effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on differentiated oligodendroglia: a mechanism for regeneration of the oligodendroglial lineage." J Neurosci Res **36**(6): 672-80.
- Gumpel, M., F. Lachapelle, et al. (1987). "Transplantation of human embryonic oligodendrocytes into shiverer brain." Ann N Y Acad Sci **495**: 71-85.
- Jat, P. S. and P. A. Sharp (1989). "Cell lines established by a temperature-sensitive simian virus 40 large- T-antigen gene are growth restricted at the nonpermissive temperature." Mol Cell Biol **9**(4): 1672-81.
- Jung, M., A. J. Crang, et al. (1994). "In vitro and in vivo characterisation of glial cells immortalised with a temperature sensitive SV40 T antigen-containing retrovirus." J.Neurosci.Res. **37**(2): 182-196.
- Kawasaki, E. S. (1990). "PCR Protocols: A guide to Methods and Applications.": 21-27.
- Kelekar, A. and M. D. Cole (1987). "Immortalization by c-myc, H-ras, and Ela oncogenes induces differential cellular gene expression and growth factor responses." Mol Cell Biol **7**(11): 3899-907.
- Levine, J. M. and R. Reynolds (1999). "Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination." Exp Neurol **160**(2): 333-47.
- Levine, J. M., R. Reynolds, et al. (2001). "The oligodendrocyte precursor cell in health and disease." Trends Neurosci **24**(1): 39-47.
- Levine, J. M. and W. B. Stallcup (1987). "Plasticity of developing cerebellar cells in vitro studied with antibodies against the NG2 antigen." J Neurosci **7**(9): 2721-31.
- LeVine, S. M. and J. E. Goldman (1988). "Spatial and temporal patterns of oligodendrocyte differentiation in rat cerebrum and cerebellum." J Comp Neurol **277**(3): 441-55.

- Lucchinetti, C., W. Bruck, et al. (1999). "A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases." Brain **122**(Pt 12): 2279-95.
- Ludwin, S. K. (1997). "The pathobiology of the oligodendrocyte." J Neuropathol Exp Neurol **56**(2): 111-24.
- Mattson, M. P. (2000). Human Fetal Brain Culture. Methods in Molecular Medicine: Human Cell Culture Protocols. G. E. Jones. Totowa, NJ: 53-62.
- McKinnon, R. D., G. Piras, et al. (1993). "A role for TGF-beta in oligodendrocyte differentiation." J Cell Biol **121**(6): 1397-407.
- McMorris, F. A. and M. Dubois-Dalcq (1988). "Insulin-like growth factor I promotes cell proliferation and oligodendroglial commitment in rat glial progenitor cells developing in vitro." Journal of Neuroscience Research **21**: 199-209.
- McMorris, F. A. and R. D. McKinnon (1996). "Regulation of Oligodendrocyte Development and CNS Myelination by Growth Factors: Prospects for Therapy of Demyelinating Disease." Brain Pathology **6**: 313-329.
- Moore, K. L. and T. V. N. Persaud (1993). Embryologie. Stuttgart
New York, Schattauer.
- Mulligan, R. C. (1993). "The basic science of gene therapy." Science **260**(5110): 926-32.
- Nishiyama, A., X. H. Lin, et al. (1996). "Co-localization of NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells in the developing rat brain." J.Neurosci.Res. **43**(3): 299-314.
- Nishiyama, A., M. Yu, et al. (1997). "Normal and reactive NG2+ glial cells are distinct from resting and activated microglia." J.Neurosci.Res. **48**(4): 299-312.
- Peden, K. W., C. Charles, et al. (1989). "Isolation of rat Schwann cell lines: use of SV40 T antigen gene regulated by synthetic metallothionein promoters." **185**(1): 60-72.
- Pfeiffer, S. E., A. E. Warrington, et al. (1993). "the oligodendrocytes and its many cellular processes." Trends in cell biology **3**: 191-197.

- Poeck, H. (1998). Multiple Sklerose. Neurologie. Berlin, Heidelberg, New York, Springer. **10**: 499-509.
- Prineas, J. W., R. O. Barnard, et al. (1993). "Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions." Ann.Neurol. **33**(2): 137-151.
- Prineas, J. W., R. O. Barnard, et al. (1993). "Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions." Brain **116**(Pt 3): 681-693.
- Prineas, J. W. and F. Connell (1979). "Remyelination in multiple sclerosis." Ann Neurol **5**(1): 22-31.
- Prineas, J. W., E. E. Kwon, et al. (1989). "Multiple sclerosis. Oligodendrocyte proliferation and differentiation in fresh lesions." Lab Invest **61**(5): 489-503.
- Raff, M. C., L. E. Lillien, et al. (1988). "Platelet-derived growth factor from astrocytes drives the clock that times oligodendrocyte development in culture." Nature **333**(6173): 562-5.
- Raff, M. C. and R. H. Miller (1983). "A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium." Nature **303**: 390-396.
- Raff, M. C., B. P. Williams, et al. (1984). "The in vitro differentiation of a bipotential glial progenitor cell." EMBO J. **3**(8): 1857-1864.
- Raine, C. S. (1997). The neuropathology of Multiple Sclerosis. Multiple Sclerosis. C. S. M. Raine, H. F.; Tourtellotte, W. W. London Weinheim New York Tokyo Melbourne Madras, Chapham and Hall Medical: 160-170.
- Raine, C. S., L. Scheinberg, et al. (1981). "Multiple sclerosis. Oligodendrocyte survival and proliferation in an active established lesion." Lab Invest **45**(6): 534-46.
- Raine, C. S. and E. Wu (1993). "Multiple sclerosis: remyelination in acute lesions." J Neuropathol Exp Neurol **52**(3): 199-204.
- Raine, C. S. M., H.F.; Tourtellotte, W.W., Ed. (1997). Multiple Sclerosis. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.

- Redwine, J. M. and R. C. Armstrong (1998). "In vivo proliferation of oligodendrocyte progenitors expressing PDGFalphaR during early remyelination." J.Neurobiol. **37**(3): 413-428.
- Sable, D. S. and J. Yeh (1995). "Growth Factor Receptor Messenger RNA Expression in Human Fetal Brain Regions." Obstetrics and gynecology **86**: 240-247.
- Scolding, N., R. Franklin, et al. (1998). "Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis." Brain **121**(Pt 12): 2221-2228.
- Scolding, N. J., P. J. Rayner, et al. (1995). "A proliferative adult human oligodendrocyte progenitor." Neuroreport. **6**(3): 441-445.
- Seilhean, D., A. Gansmüller, et al. (1996). "Myelination by transplanted human and mouse central nervous system tissue after long-term cryopreservation." Acta Neuropathol.(Berl.) **91**(1): 82-88.
- Shi, J., A. Marinovich, et al. (1998). "Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve." J.Neurosci. **18**(12): 4627-4636.
- Smith, K. J., W. F. Blakemore, et al. (1981). "The restoration of conduction by central remyelination." Brain **104**(2): 383-404.
- Sommer, I. and M. Schachner (1981). "Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system." Dev.Biol. **83**(2): 311-327.
- Vaziri, H. and S. Benchimol (1998). "Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span." Curr Biol **8**(5): 279-82.
- Weinshenker, B. G. (1994). "Natural history of multiple sclerosis." Ann Neurol **36**(Suppl): S6-11.
- Westerman, K. A. and P. Leboulch (1996). "Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific recombination." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **93**(17): 8971-8976.

- Wigler, M., S. Silverstein, et al. (1977). "Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells." Cell **11**(1): 223-32.
- Wilson, H. C., C. Onischke, et al. (2003). "Human oligodendrocyte precursor cells in vitro: phenotypic analysis and differential response to growth factors." Glia **44**(2): 153-65.
- Wolswijk, G. (1998). "Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells." J.Neurosci. **18**(2): 601-609.
- Wolswijk, G., P. M. Munro, et al. (1991). "Origin, growth factor responses, and ultrastructural characteristics of an adult-specific glial progenitor cell." Ann.N.Y.Acad.Sci. **633:502-4.**: 502-504.
- Wolswijk, G. and M. Noble (1989). "Identification of an adult-specific glial progenitor cell." development **105**: 387-400.
- Yang, Z., M. Watanabe, et al. (2005). "Optimization of oligodendrocyte progenitor cell culture method for enhanced survival." J Neurosci Methods **20**: 20.
- Zhang, S. C., B. Ge, et al. "Tracing human oligodendroglial development in vitro." J.Neurosci.Res.2000.Feb.1.;59.(3.):421.-9. **59**(3): 421-429.
- Zhang, S. C., C. Lundberg, et al. (1998). "Generation of oligodendroglial progenitors from neural stem cells." J.Neurocytol. **27**(7): 475-489.
- Zhu, J., H. Wang, et al. (1999). "Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **96**(7): 3723-3728.

6 Anhang

6.1 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Beato, Bertalanffy, Bien, Brandt, Cetin, Czubayko, Effendy, Fruhsdorfer, Geks, Gerst, Geus, Görg, Gotzen, Grau, Griss, Grzeschik, Happle, Heeg, Heufelder, Horn, Joseph, Jungclas, Kaiser, Katschinski, Kern, Kienapfel, Klose, Koolmann, Kraft, Krause, Kroh, Kroll, Kuni, Lange, Lennartz, Leppek, Löffler, Maisch, McGregor, Meinhardt, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Peter, Pfab, Printz, Ramaswamy, Rausch, Richter, Röhm, Rothmund, Schachtschnabel, Schmidt, Schultz, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Sturm, Voigt, Weihe, Welcke, von Wichert, Wirth, Wulf

Meine akademischen Lehrer in New York City waren:

Raine, Canella

6.2 Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die langjährige großzügige Unterstützung!
Ohne Eure Geduld wäre das so alles nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. C. S. Raine, AECOM, für die Bereitstellung von finanziellen Mitteln und der Möglichkeit, in seinem Labor zu arbeiten!

Herzlichen Dank an Heather C. Wilson, für eine intensive Betreuung in New York.

Insgesamt möchte ich mich bei dem Team im Labor von Prof. Raine im Forchheimer Bldg. für die Hilfe bedanken.

Ganz herzlichen Dank an Prof. Sommer, der die Betreuung der Arbeit in Marburg übernommen hat.

Ermöglicht wurde mir der Aufenthalt am Albert Einstein College durch die Gewährung eines Promotionsstipendiums durch die FAZIT-Stiftung, vielen Dank hierfür!

6.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Herstellung und Charakterisierung von menschlichen Oligodendrozytenvorläufer-Zelllinien“ in dem Zentrum für Nervenheilkunde unter der Leitung von Prof. Sommer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Postervortrages auf dem „World congress of Neurology 2001“ in London veröffentlicht.

Kiel, den 10.03.2006

6.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	05.03.1974
Geburtsort	Herford
Familienstand	ledig
Eltern	Wolfgang Onischke, Dipl.-Ing. Margret Onischke, geb. Diekmann, Fachlehrerin

Ausbildung

seit Jan. 2004	Assistenzarzt in der Inneren Abt. der Klinik Preetz
November 2003	drittes Staatsexamen
Okt. 2002-Aug. 2003	Praktisches Jahr erstes Tertial: Universitätsklinikum Kiel, Klinik für Neurologie zweites Tertial: Universitätsklinikum Kiel, I. Medizin drittes Tertial: Kreiskrankenhaus Rendsburg, Chirurgie
April 2002	Immatrikulation Christian-Albrechts-Universität, Kiel
April 1996-März 2002	Philipps-Universität, Marburg Studium der Humanmedizin
März 2002	zweites Staatsexamen
Sept. 2000	Amerikanisches Examen USMLE Step 1



März 1999	erstes Staatsexamen
April 1998	Physikum
Mai 1993	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
1984-1993	Gymnasium Löhne

Forschung

Sept. 2000- Sept. 2001	Forschungsaufenthalt am Albert-Einstein College of Medicine, NYC, USA im „Department of Neuropathology“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Raine zum Thema „Herstellung und Charakterisierung von menschlichen Oligodendrozyten-Vorläuferzelllinien“
Okt. 2000-Juli 2001	Promotionsstipendium der FAZIT-Stiftung
Juni 2001	Teilnahme am „World Congress of Neurology“ in London und Posterpräsentation