

Aus der Klinik für Neurologie und Neurophysiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkung intravenöser Immunglobuline auf die Proliferation und
Differenzierung von Oligodendrozyten Vorläuferzellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dirk Bernard

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Stangel
 2. Prof. Dr. J. Lünemann
 3. Prof. Dr. rer. nat. A. Hamann

Datum der Promotion:09.09.2011

Inhaltsverzeichnis		Seite
	Erklärung	6
	Abkürzungsverzeichnis	7
	Tabellen - und Abbildungsverzeichnis	8
1	Einleitung	9
1.1	Multiple Sklerose	10
1.1.1	Pathophysiologie der MS	10
1.1.2	Remyelinisierung	11
1.1.3	Therapie der MS	12
1.2	Intravenöse Immunglobuline	13
1.3	Zellen	14
1.3.1	Oligodendrozyten / Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ)	14
1.3.2	Mikroglia	18
1.3.3	Astrozyten	18
1.4	Studienansatz	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Medien, Lösungen und Zusätze für Zellverarbeitung und Kultur	20

2.1.1	Einzelsubstanzen (mit Herstellerangaben)	20
2.1.2	Medien und deren Inhaltsstoffe	21
2.1.3	Antikörper	22
2.2	<i>Zellkultur</i>	22
2.2.1	Gemischte Gliakultur	22
2.2.2	Co Kultur (Mikroglia und Oligodendrozyten – Vorläuferzellen)	23
2.2.3	Oligodendrozyten Vorläuferzellen – Kultur	23
2.2.4	Verwendete Intravenöse Immunglobuline	24
2.2.5	Kontrollen	25
2.3	Immunhistochemie	25
2.3.1	Proliferations Assay (A ₂ B ₅ /2' Bromo – desoxy – uridine)	25
2.3.2	Differenzierungs- Assay (A ₂ B ₅ /Galactocerebroside)	26
2.4	Statistik	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Gemischte Gliakultur	27
3.1.1	Proliferation	27
3.1.2	Differenzierung	27
3.2	Co Kultur	30
3.2.1	Proliferation	30
3.2.2	Differenzierung	30

3.3	Oligodendrozyten Vorläuferzellen Kultur	32
3.3.1	Proliferation	32
3.3.2	Differenzierung	34
3.4	Direkte Bindung von IVIgM an OVZ	34
4	Diskussion	36
4.1	Proliferation	36
4.2	Differenzierung	37
4.3	Schlussfolgerung	38
5	Zusammenfassung	39
6	Alphabetisches Literaturverzeichnis	41
7	Danksagung	47
8	Publikationsliste	48
9	Lebenslauf	49

Erklärung

„Ich, Dirk Bernard erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Wirkung intravenöser Immunglobuline auf die Proliferation und Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Dirk Bernard

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsentierende Zellen
BrdU	2-Bromo-desoxy-uridin
CNP	Cyclische Nukleotid Phosphodiesterase
DMEM	Dulbecco´s modified Eagles Medium
FKS	Fetales Kälber Serum
GalC	Galactocerebrosid
GFAP	Glial fibrillic acid protein
IFN	Interferon
IVIg	Intravenöse Immunglobuline
IVIgM	Intravenöse Immunglobuline mit hohem IgM Anteil
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin Basisches Protein
MMS	Monozyten Makrophagen System
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MP	Methylprednisolon
MS	Multiple Sklerose
NO	Stickstoffmonoxid
OVZ	Oligodendrozyten Vorläuferzellen
PBS	Phosphat Buffered Saline
PDGF α	Plated derived Growth Factor alpha
PLP	Proteolipid Protein
TNF α	Tumornekrosefaktor α
RRMS	Schubförmige Multiple Sclerosis
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sclerosis
TMVE	Theiler´s Virus Meningoenzephalitis
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Oligodendrozyten – Vorläuferzellen während ihrer Entwicklung	
Tabelle 2	Präparatenamen und Herstellerangaben verwendeter Chemikalien	
Abb. 1:	Wirkmechanismus intravenöser Immunglobuline	
Abb. 2:	Oligodendrozyten Vorläuferzellen mit A ₂ B ₅ gefärbt	
Abb. 3:	Jugendliche Oligodendrozyten in N ₂ B ₃ Medium	
Abb. 4:	Reife Oligodendrozyten in N ₂ B ₃ Medium	
Abb. 5:	Auswertung Proliferationsassay Gemischte Glia	IVIg Konzentration 1 mg/ml
Abb. 6:	Auswertung Proliferationsassay Gemischte Glia	IVIg Konzentration 10 mg/ml
Abb. 7:	Auswertung Differenzierungsassay Gemischte Glia	IVIg Konzentration 1 mg/ml
Abb. 8:	Auswertung Differenzierungsassay Gemischte Glia	IVIg Konzentration 10 mg/ml
Abb. 9:	Auswertung Proliferationsassay Co Kulturen	IVIg Konzentration 1 mg/ml
Abb. 10:	Auswertung Proliferationsassay Co Kultur	IVIg Konzentration 10 mg/ml
Abb. 11:	Auswertung Differenzierungsassay Co Kultur	IVIg Konzentration 1 mg/ml
Abb. 12:	Auswertung Differenzierungsassay Co Kultur	IVIg Konzentration 10 mg/ml
Abb. 13:	Auswertung Proliferationsassay OVZ	IVIg Konzentration 1 mg/ml
Abb. 14:	Auswertung Proliferationsassay OVZ	IVIg Konzentration 10 mg/ml
Abb. 15:	Auswertung Differenzierungsassay OVZ	IVIg Konzentration 1 mg/ml
Abb. 16:	Auswertung Differenzierungsassay OVZ	IVIg Konzentration 10 mg/ml

1 Einleitung

Immunglobuline zur intravenösen Anwendung (IVIg) sind Pharmaka, die in der Behandlung von immunologischen Erkrankungen bereits einen festen Stellenwert besitzen. Bislang zählen IVIg nicht zu den Basistherapeutika bei multipler Sklerose (MS), einer autoimmunen Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die genaue Wirkung dieser Präparate bei MS ist nicht geklärt. Postuliert werden verschiedene Angriffspunkte am Immunsystem. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass IVIg nach viral induzierter Demyelinisierung durch ein Picornavirus (Warrington et al. 2000) in der Lage sind, Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ) zu einer gesteigerten Remyelinisierung zu stimulieren. Bemerkenswert dabei war, dass monoklonale Antikörper gegen Oligodendrozyten vom IgM Typ eine größere Potenz aufwiesen, als IVIg Präparate ohne IgM Anteil. Dies warf die Frage auf, ob grundsätzlich IVIg Präparate mit hohem IgM Anteil (IVIgM) eingesetzt werden sollten und inwiefern sich diese Präparation in Bezug auf die Wirksamkeit auf Zellkulturebene, insbesondere auf Gliazellen, verhält. Auf reine, isolierte OVZ hatten polyklonale IVIg Präparate keinen direkten Einfluss (Stangel et al. 1999). Isolierte Mikroglia, die Immunzellen des Gehirns hingegen, reagierten nach Stimulation mit Pentaglobin, einem IgM angereicherten IVIg Präparat mit einer erhöhten Produktion von Zytokinen (Pul et al. 2002). Da sich im ZNS des lebenden Individuums stets alle Gliazellarten befinden und im Rahmen der MS diese Zellen sowohl der Immunantwort des Körpers als auch der darauf folgenden Therapie ausgesetzt sind, wurden im Rahmen dieser Promotion die Wirksamkeit von IVIgM auf OVZ in Anwesenheit von Mikroglia und Astrozyten untersucht. Des Weiteren ist auch interessant, inwiefern sich die Wirksamkeit von verschiedenen IVIg im Rahmen eines solchen Versuches unterscheiden, d.h. liefern IVIgM auch statistisch signifikante Ergebnisse und wenn dies der Fall ist, haben diese Ergebnisse dann auch eventuell eine klinische Konsequenz?

1.1 Multiple Sklerose (MS)

Die Multiple Sklerose (MS oder Enzephalomyelitis disseminata) ist eine entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), mit einem Erkrankungsgipfel zwischen dem 25.-40. Lebensjahr, wobei Frauen häufiger betroffen sind als Männer. In Deutschland wird die Anzahl der an MS erkrankten Menschen auf mindestens 120.000 geschätzt (Hein und Hopfenmüller 2000). Die Prävalenz von MS in Europa beträgt 30-95 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner (Rosati 2001). Klinisch äußert sich die Erkrankung in multiplen neurologischen Symptomen, wie Sensibilitätsstörungen, Gangstörungen mit belastungsabhängiger Schwäche der Beine und Gangunsicherheit, Sehstörungen durch eine Optikusneuritis und teilweise durch „versteckte“ Symptome wie verstärkte Ermüdbarkeit (Fatigue), Konzentrationsstörungen und depressiver Verstimmung. Es sind verschiedene Stadien und Verläufe von MS bekannt. Man unterscheidet zwischen dem klinisch - isolierten Syndrom (KIS), der schubförmigen Verlaufsform (Relapsing – remitting – RRMS), der sekundär progredienten (SPMS) und der primär progredienten (PPMS) Verlaufsform (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2008). Bisher kann die Progredienz dieser Erkrankung nur verlangsamt, nicht aber aufgehalten werden. Die gegenwärtig eingesetzten Therapien zielen hauptsächlich auf eine Reduktion der entzündlichen Aktivität ab. Dies beinhaltet die Rückbildung schubassoziierter Symptome, Vorbeugung weiterer Krankheitsschübe und der Verlangsamung der Krankheitsprogression. Aktuelle Therapien basieren auf Immunsuppression und Immunmodulation.

1.1.1 Pathophysiologie der MS

Im Rahmen von MS kommt zu einer autoimmun-entzündlichen Reaktion, wobei autoreaktive T-Zellen ein bisher noch nicht bekanntes Autoantigen auf der Oberfläche Antigen - präsentierender Zellen (APC) erkennen. Unter anderem werden Myelinproteine wie Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), Basisches Myelin Protein (MBP) oder Proteolipid Protein (PLP) diskutiert. Gleichzeitig werden ko - stimulatorische Faktoren (CD 28-B7, CD 40 – CD 40L) präsentiert. Nach Aktivierung durchwandern die autoreaktiven T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) durch Interaktion von Chemokinen und Proteinasen. Im ZNS kommt es dann zu einer erneuten Aktivierung, welche bei Monozyten und Makrophagen zu einer erhöhten Freisetzung an Mediatoren

wie Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α), Lymphotoxin (LT) und Stickstoffmonoxid (NO) führt, was die Demyelinisierung vorantreibt. Gleichzeitig kommt es durch die Produktion von Antikörpern durch aktivierte B-Zellen zu einer Aktivierung der Komplementkaskade, an deren Ende der lytische Komplex C5b-9 steht (Sospedra und Martin 2005). Durch die Interaktion von T-Zellen, Makrophagen, Mikroglia und Antikörpern kommt es zu einer ausgeprägten Demyelinisierung der Axone und einer Akkumulation axonalen Schadens, der letztendlich die irreversiblen Behinderungen bei MS verursacht. Am Ende dieses Prozesses finden sich im ZNS Glianarben und axonale Schäden als Zeichen einer abgelaufenen Entzündungsreaktion (Compston und Coles. 2002; Frohmann et al. 2006).

1.1.2 *Remyelinisierung*

Ziel der heutigen MS Therapie ist die Verminderung der Schubraten und somit eine Verlangsamung der Progredienz. Bestandteile aktueller und zukünftiger Therapieansätze sind aber auch Konzepte zur aktiven Neuroprotektion und Remyelinisierung. Bisher ist bekannt, dass Oligodendrozyten Reparaturvorgänge vornehmen können, welche von den Oligodendrozyten Vorläuferzellen (OVZ) ausgehen (Carroll und Jennings 1994, Keirstead und Blakemore 1997 Levine et al. 2001). Diese Remyelinisierung ist interindividuell unterschiedlich, findet unabhängig von der Verlaufsform statt (Patrikios et al 2006) und endet in den meisten Fällen inkomplett in Vernarbungen der MS Läsionen, den Glianarben. Es stellt sich die Frage, inwiefern die Potenz der OVZ zur Remyelinisierung gesteigert werden kann. Zur Bildung neuer, suffizienter Myelinscheiden im ZNS bedarf es der Proliferation vorhandener OVZ, der Migration in das Gebiet, in dem Bedarf an neuen OVZ besteht und einer Differenzierung von unreifer Vorstufe zum reifen Oligodendrozyten. Gesteuert werden diese Prozesse durch Wachstumsfaktoren und Zytokine, welche die eigentliche Entwicklung der Oligodendrozyten beeinflussen (Woodruff und Franklin 1999, Barres et al. 1994, Mc Kinnon et al. 1993). Bereits proliferierte Oligodendrozyten verlieren mit Beginn ihrer Differenzierung die Fähigkeit zur weiteren Proliferation und Migration. Das eigentlich physiologische Äquilibrium zwischen Myelinscheidenverlust und Wiederaufbau bzw. Reparatur (Van Engelen et al. 1994) ist im Rahmen einer akuten entzündlichen Demyelinisierung nicht gegeben und in Richtung Markscheidenverlust verschoben. Das Ziel einer regenerativen MS Therapie liegt also in der Förderung der reparativen Vorgänge aber auch zur Neuro- und Gliaprotektion.

1.1.3 *Therapie der MS:*

Die in den letzten zwei Dekaden zu beobachtende, positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufes von MS ist ein Resultat verschiedener Therapieschemata. Ein Hauptaugenmerk der medikamentösen Behandlung ist die Sekundärprävention und somit Verzögerung einer MS Progression. Therapie der ersten Wahl im akuten MS Schub, nach Ausschluss eines Infektes und Beachtung der Kontraindikationen, ist zum heutigen Zeitpunkt die intravenöse Gabe von 1g Methylprednisolon (MP) über einen Zeitraum von 3 bis 5 Tagen als Stoßtherapie. Bei ungenügender Besserung der neurologischen Symptome kann ein weiterer Therapieversuch mit 2g MP intravenös durchgeführt werden. Alternativ oder nach erfolgloser zweiten MP Stoßtherapie sollte eine Plasmapherese in Betracht gezogen werden. Die verlaufsmodifizierende Therapie bei schubförmiger MS besteht aus Immunmodulatoren wie Interferon beta 1b bzw. Interferon beta 1a und Glatirameracetat. Weiterhin stehen Natalizumab, Azathioprin und Mitoxantron als Therapeutika zur Verfügung. Intravenöse Immunglobuline werden zurzeit als Reservemedikamente bei Kontraindikationen oder Unverträglichkeiten der etablierten Medikamente empfohlen. Zurzeit stellt die Schwangerschaft bei Patientinnen mit schubförmiger MS die überzeugendste Indikation dar (Leitlinien nach Deutschen Gesellschaft für Neurologie 2008). Ein weiterer wichtiger Bestandteil der MS Therapie ist die krankengymnastische und physiotherapeutische Behandlung von MS Patienten.

1.2 Intravenöse Immunglobuline (IVIg)

Intravenöse Immunglobuline werden seit langer Zeit mit Erfolg bei autoimmun-vermittelten Krankheiten eingesetzt. Die genauen Wirkmechanismen dieser intravenösen Immunglobuline sind bisher nicht genau bekannt. Im Folgenden werden diskutierte Angriffspunkte der IVIg aufgezeigt:

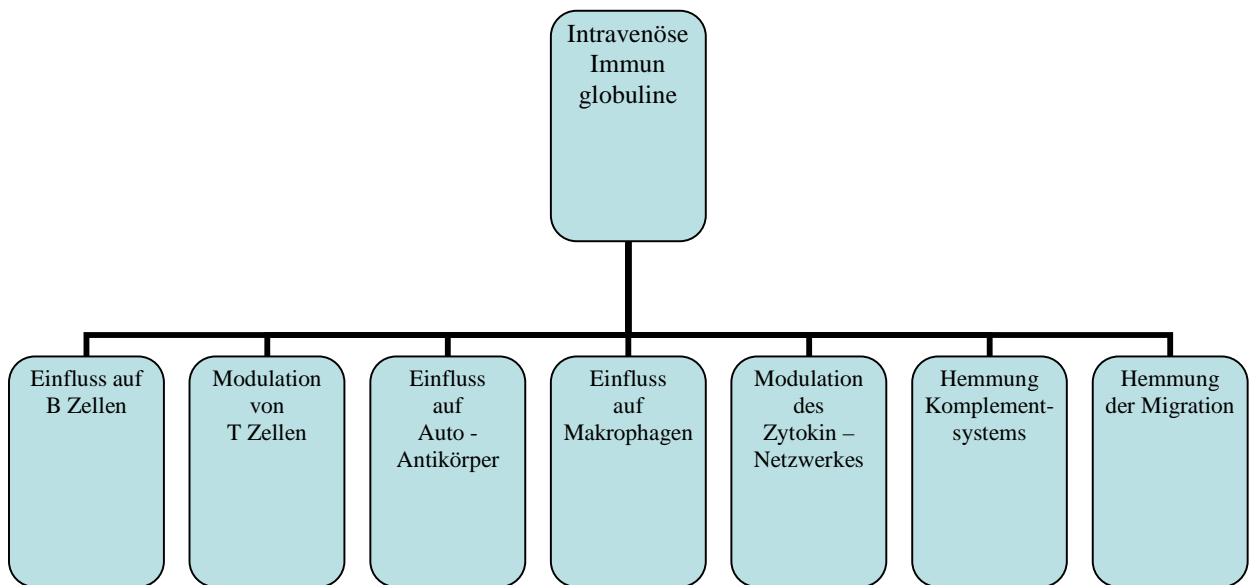


Abbildung 1: Mögliche Wirkmechanismen intravenöser Immunglobuline (IVIg)

Es ist nicht eindeutig geklärt, welcher der oben aufgeführten Mechanismen die Hauptwirkung erzielt, bzw. ob das Zusammenwirken einiger dieser Prozesse nötig ist. In Bezug auf die Gliazellen im ZNS konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass eine Stimulation von Mikroglia mit IVIg zu einer gesteigerten Produktion von Zytokinen führt (Pul 2002 et al., Stangel und Compston 2001, Chan et al. 2003). Eine direkte Wirkung auf OVZ durch Stimulation mit IVIg konnte nicht gezeigt werden (Stangel et al 1999, Stangel 2000). Inwiefern die Wirkung auf Mikroglia möglicherweise eine indirekte Wirkung auf OVZ im ZNS bei MS haben könnte, wird derzeit noch diskutiert. Hauptaugenmerk bei diesen Diskussionen liegt sicherlich bei der Frage, ob reparative Vorgänge inklusive einer Remyelinisierung durch OVZ positiv beeinflusst werden können. Forschungsergebnisse aus dem Bereich der experimentellen MS Modelle haben in den letzten

Jahren interessante Ergebnisse geliefert, welche wiederum Anlass für weitere Studien geworden sind. Bei einer dieser Arbeiten, bei der nach experimentell induzierter Demyelinisierung durch ein Picorna Virus, der Theiler Virus Meningo Enzephalitis (TVME) und anschließender Applikation von IVIg konnte eine statistisch signifikante Rate an OVZ zur Remyelinisierung angeregt werden (Van Engelen et al.1994, Warrington et al 2000). Bemerkenswert in diesem Fall war, das monoklonale Antikörper vom IgM Typ mit hoher Bindungsaffinität an Oligodendrozyten ein signifikant höheres Remyelinisierungspotential aufwiesen, als vergleichbare IgG Präparate unter denselben Bedingungen. Dies wirft die Frage auf, inwiefern sich verschiedene IVIg Präparate in Ihrer Wirkung auf OVZ unterscheiden. Alle bisherigen IVIg Präparate, die klinisch eingesetzt werden, sind Präparate mit einem hohen Anteil an IgG und teilweise kleinere Spuren anderer Immunglobuline. Therapiestudien zur Remyelinisierung bei MS durch IVIg konnten keine klinischen Verbesserungen zeigen, wobei alle Studien ausschließlich Präparate mit einem hohen Anteil an IgG eingesetzt haben (Noseworthy et al 2000; Stangel et al 2000; Noseworthy et al 2001). Im Rahmen erster klinischer Studien mit geringer Fallzahl bei Patienten mit schubförmiger MS konnte nach Gabe von IVG gezeigt werden, dass die Schubfrequenz und die entzündlichen Herde, welche kontrastmittelanreichernd im MRT zu identifizieren waren, reduziert werden konnten (Sorensen et al 1998, Achiron et al 1998, Fazekas et al 1997). In einer prospektive, randomisierten, doppelblinden Multicenterstudie aus dem Jahr 2008 an 127 Patienten mit schubförmiger MS (RRMS) wurde jedoch gezeigt, dass IVIg keine statistisch signifikante Verringerung der Schubrate bewirkt (Fazekas et al 2008).

1.3 Zellen

1.3.1 *Oligodendrozyten /Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ)*

Die Erstbeschreibung von Oligodendrozyten erfolgte im Jahr 1921 (Hortega und del Rio 1921). Adulte Oligodendrozyten machen insgesamt 5 – 8 % der Gesamtpopulation an Gliazellen im gesunden ZNS aus. Mit ihren Zellausläufern umhüllen die Oligodendrozyten die Neurone mehrfach. Diese Myelinscheide dient dem Neuron als Schutzhülle und sorgt zugleich für eine störungsfreie Impulsvermittlung. Oligodendrozyten haben wohl aber auch trophische Funktionen für die Axone. Bevor diese Zellen allerdings ihre wichtige Funktion am Neuron erfüllen können, müssen sie aus Vorläuferzellen hervorgehen und reifen. Diese Reifungsprozesse von den Vorläuferzellen zum

adulten Oligodendrozyten lassen sich gut beobachten, da in den verschiedenen Entwicklungsstufen spezifische Oberflächenrezeptoren exprimiert werden, die sich immunhistochemisch anfärben lassen (Levine et al 2001; Mc Kinnon et al. 1993; Reynolds und Wilkin 1988; Scolding et al. 1989). Auch die Zellmorphologie eines Oligodendrozyten verändert sich im Laufe seiner Reifung (Zhang 2001). Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ) haben einen ovalen Zellkernus mit typischerweise 2-3 Ausläufern und zentral gut sichtbarem Zellkern. Im ersten Entwicklungsstadium, in dem noch keine Fortsätze gebildet wurden, wird auch vom Pro- Progenitor Oligodendrozyt gesprochen, welcher durch Anfärbung des Oberflächenmarkers Plated derived growth factor α -Rezeptor (PDGF α -R)) zu identifizieren ist (Pringle und Richardson 1993). Mit weiterer Reifung zum Progenitor wird die OVZ bipolar und exprimiert zusätzlich die Oberflächenmarker NG₂, GD₃ und A₂B₅ (Abb.2).

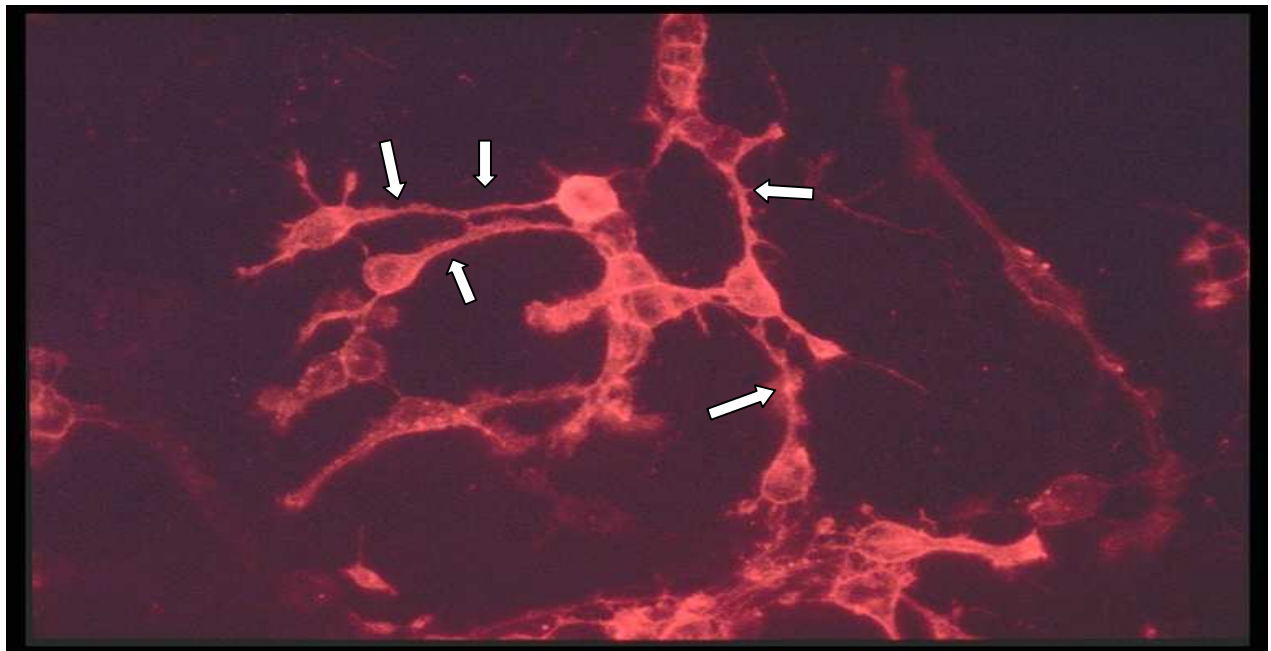


Abbildung 2: Oligodendrozytenvorläuferzellen (OVZ) im Entwicklungsstadium des Progenitors angefärbt mit einem Antikörper gegen A₂B₅ (rot) unter einem Fluoreszenzmikroskop (Fa, Carl Zeiss, 30fache Vergrößerung,, Kulturzellen). Zu sehen sind OVZ mit ihrem ovalen Zellkernus und teilweise bi – und multipolaren Fortsätzen (Pfeile)

Die nächste Entwicklungsstufe wird als Pro-Oligodendrozyt bezeichnet Die Zelle hat in dieser Reifungsstufe die Fähigkeit verloren, A₂B₅ zu exprimieren und ist nun durch den Marker O₄ identifizierbar. In der jugendlichen Form präsentiert sich der Oligodendrozyt als rundovale Zelle mit gut sichtbarem Zellkern. Zellausläufer sind multipel vorhanden und bilden scheinbar ein Netz um die Zelle (Abb. 3 & 4). Sowohl in jugendlicher als auch in reifer Form exprimiert der

Oligodendrozyt die Oberflächenmarker Galactocerebroside (GalC) und Cyclische Nucleotid Phosphodiesterase (CNP), als auch Basisches Myelin Protein (MBP), Proteolipid Protein (PLP), Myelin assoziiertes Glykoprotein (MAG) und Myelin Oligodendrozyt Glykoprotein (MOG) (Scolding et al 1989).

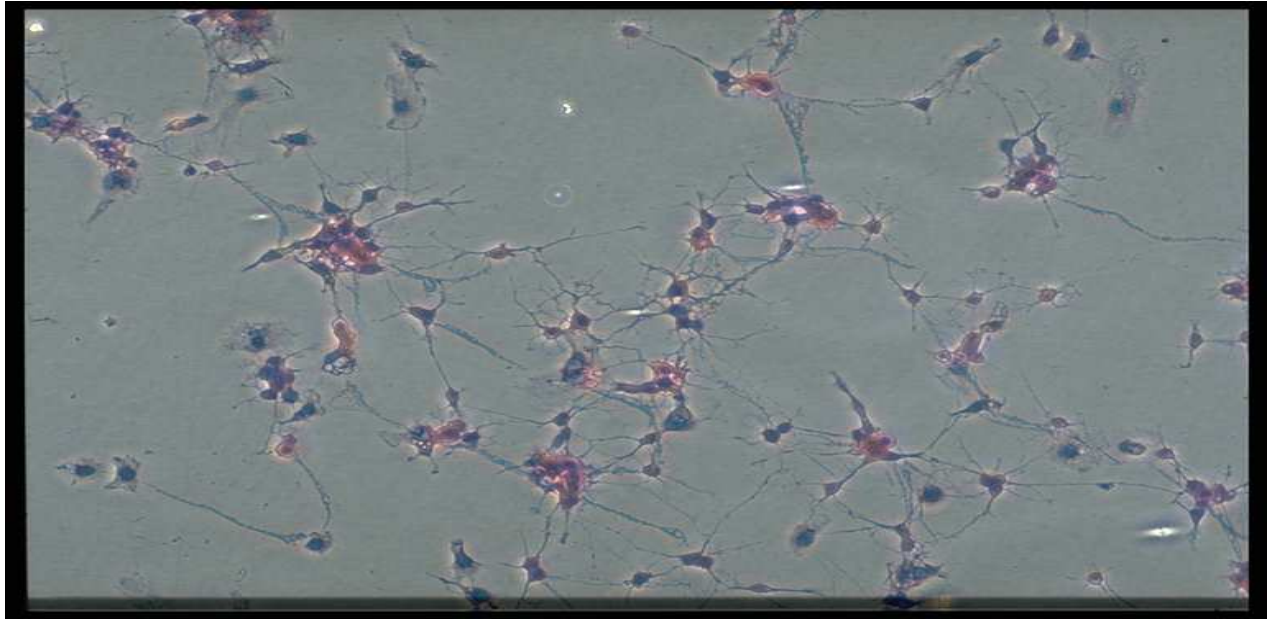


Abbildung 3: Jugendliche Oligodendrozyten unter einem Lichtmikroskop (Fa. Leica, 20 fache Vergrößerung, OVZ Kultur). Zu sehen sind Konglomerate von Oligodendrozyten, die netzartig miteinander in Verbindung zu stehen scheinen (Pfeile).

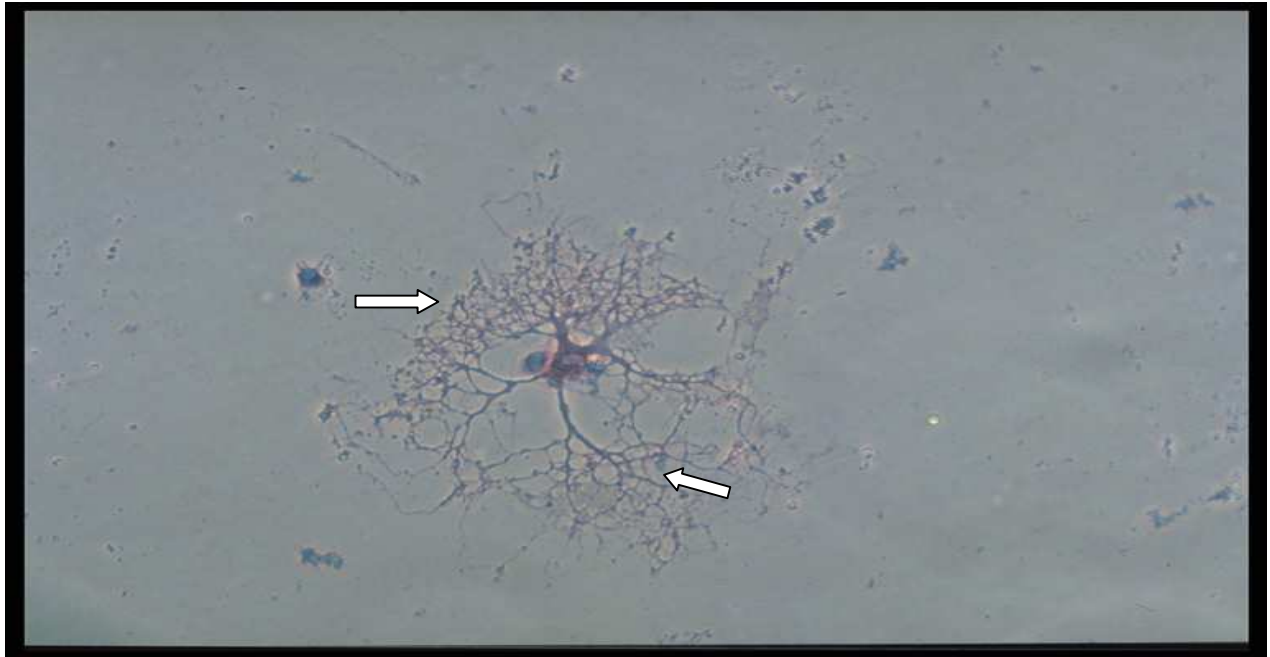


Abbildung 4: Einzelner adulter Oligodendrozyt unter dem Lichtmikroskop (Fa. Leica, 20 fache Vergrößerung,). Bemerkenswert bei dieser Abbildung ist das baumwurzeltartige Geflecht aus Zellfortsätzen (Pfeile) um den ovalen Zellkorpus.

Während seiner Entwicklung zum reifen Oligodendrozyten exprimiert der OVZ teilweise mehrere Oberflächenmarker (siehe Tabelle 1), die ihn immunhistochemisch eindeutig kennzeichnen.

Tabelle 1: Oligodendrozyten – Vorläuferzellen während ihrer Entwicklung und ihre Marker

Pro-Progenitor	Progenitor	Pro-Oligodendrozyt	Unreifer Oligodendrozyt	Reifer Oligodendrozyt
O2	A2B5	O4	O1	O1
PDGF α -R	PDGF α -R	GD3	O4	GalC
	GD3	NG2	GalC	CNP
	NG2		CNP	PLP
			MBP	MAG
				MOG
				MBP

Abk: GalC – Galactocerebroside; CNP – Cyclische Nukleotid Phosphodiesterase; PLP – Proteolipidprotein; MAG – Myelin assoziiertes Glykoprotein; MOG – Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein; MBP Myelin Basisches Protein

Die Entwicklung eines Oligodendrozyten wird durch ein komplexes System an Faktoren beeinflusst, welche einerseits von Gliazellen selbst und andererseits von Neuronen produziert werden. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone (Barres et al. 1994). Weiterhin ist zu erwähnen, dass nur 50 % aller aus den Stammzellen hervorgegangenen Oligodendrozyten diesen Entwicklungsprozess überstehen und zu OVZ reifen.

1.3.2 *Mikroglia*

Mikroglia zählen zu den Zellen im ZNS, welche hauptsächlich phagozytotische Aufgaben übernehmen. Aus diesem Grund werden sie auch als „Makrophagen des Gehirns“ bezeichnet. Ursprünglich entstammen diese Zellen dem hämatopoetischen System des Knochenmarks bzw. dort dem Monozyten-Makrophagen-System (MMS). Mikroglia bilden ca. 10-20 % der Gesamtpopulation an Gliazellen im gesunden, adulten ZNS. Bei Schädigung oder Stimulation dieser Zellen kommt es zur Produktion von Zytokinen, wie z.B. TNF α und Stickstoffmonoxid (NO) (Spranger und Fontana 1996; Gonzales - Scarano und Baltuch 1999)

1.3.3 *Astrozyten*

Astrozyten bilden den Hauptanteil der Gliazellen. Es wird vermutet, dass sie gemeinsam mit Oligodendrozyten aus gemeinsamen Zellen, den Glioblasten entstehen (Rao und Mayer – Proschel 1997). Morphologisch besitzen Sie mehrere, radiär verlaufende Zellausläufer und bilden untereinander ein dichtes Zellnetzwerk. Das Zytoplasma enthält Intermediärfilamente vom Typ Glial Fibrillar Acid Protein (GFAP). Mit Hilfe von Antikörpern gegen GFAP lassen sich Astrozyten immunhistochemisch identifizieren. Die genauen Funktionen der Astrozyten sind noch nicht genau bekannt.

1.4 Studienansatz

Aus Voruntersuchungen geht hervor, dass bei einem experimentellen Modell der MS, der Theiler'schen Virus Meningo-Enzephalitis (TVME), bei der es durch die Infektion mit einem Picorna Virus zu einer infektiologisch bedingten Demyelinisierung kommt, monoklonale Immunglobuline vom IgM Typ mit hoher Bindungsaffinität an Oligodendrozyten, eine höhere Potenz zur Remyelinisierung aufwiesen als vergleichbare IgG Präparate (Van Engelen et al. 1994, Warrington et al. 2000). Ausgehend von diesen Ergebnissen präsentieren wir folgenden Ansatz: OVZ sollen im Verlauf dieser Studie mit unterschiedlichen IVIg Präparaten mit verschiedenem Anteil an IgM behandelt werden, um im weiteren Verlauf zu beobachten, welche Effekte IVIgM auf diese Zellen haben. Die Zielpunkte der Studie waren die Proliferation und Differenzierung der OVZ, welche immunhistochemisch untersucht werden sollen. Als Marker für die Proliferation wurde der Oberflächenrezeptor A_2B_5 und als Marker für die Differenzierung der Oberflächenmarker Galactocerebroside (GalC) ausgewählt. Als unspezifische Eiweißkontrolle diente Albumin in identischer Konzentration wie IVIg und IVIgM. Am Ende dieser Arbeit möchten wir die Frage beantworten, ob IVIg, hier insbesondere IVIgM, eine höhere Potenz besitzen, OVZ in der Proliferation und Differenzierung zu stimulieren.

2 Material und Methoden

2.1 Medien, Lösungen und Zusätze für Zellverarbeitung und Kultur

2.1.1 Einzelsubstanzen mit Herstellerangaben

Tabelle 2: Präparatenamen und Herstellerangaben verwendeter Chemikalien

Präparatename	Hersteller
Albumin	DRK, Springe, Berlin
Biotin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
DNase	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
FKS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Goat Serum	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Hank's Puffer	Biochrom, Berlin, Deutschland
HEPES	Biochrom, Berlin, Deutschland
Interferon g	R & D Systems, Minneapolis, USA
IST	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
PenStrep	Biochrom, Berlin, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Poly - Lysin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Progesteron	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Putrescine	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tetraiodthyronin / T4	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trijodthoronin T 3	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

2.1.2 *Medien und deren Inhaltsstoffe*

Gliamedium

- 89 % DMEM
- 10 % FKS
- 1 % Penicillin/Streptomycinlösung

B 104 konditioniertes Medium

- 97 % DMEM
- 1 % ITS
- 1 % Glutamin
- 1 % Penicillin/Strptomycinlösung

N2B3-Medium

- 97,5 % DMEM
- 1 % ITS
- 1 % Penicillin/Streptomycinlösung
- 0,5 % FKS
- 0,001 % Progesteron
- 0,001 % Biotin
- 0,01 % Putrescin
- 0,001 % T3
- 0,001 % T4

2.1.3 Antikörper

Antikörpername	Hersteller
Cy 2 Conjugated – Anti Goat IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland
Cy 3 Conjugated – Anti Mouse IgM	Dianova, Hamburg, Deutschland
Mouse Anti A ₂ B ₅ monoklonal	ECACC / Hybrid Collection
Mouse Anti Rat GalC monoklonal	ECACC / Hybrid Collection
5-Bromo-2´desoxyuridine (BrdU) Mouse Anti Monoklonal (Clone BMC 9318 IgG1)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Biotin Conjugated Anti Human IgM	Serotec, Düsseldorf, Deutschland

2.2 Zellkultur

Alle Arbeitsschritte wurden in einem Zellkulturlabor unter sterilen Bedingungen (autoklavierte Instrumente, Händedesinfektion, Lamina – Flow und Mundschutz) durchgeführt. Vor jeder weiteren Manipulation der Zellkulturen erfolgte eine lichtmikroskopische Inspektion der Zellkultur.

2.2.1 Gemischte Gliakultur

Zellkulturen wurden nach bekanntem Protokoll erstellt (Mc Carthy und de Vellis 1980). Die Hemisphären neugeborener Ratten der Gattung Sprague – Dawley (Tierzucht Schönwalde) wurden entnommen, unter lichtmikroskopischer Sicht (Mikroskop von Fa. Leica bei 7,5facher Vergrößerung) von verbleibenden meningealen Resten und Gefäßen befreit und anschließend mechanisch und enzymatisch zerkleinert (enzymatisch durch 0,1 % Trypsin und DNase; Sigma Deisenhofen Germany, mechanisch durch eine Rasierklinge; Wilkinson). Die so entstandene Suspension wurde auf Polylysin beschichtete Plastikflaschen (NUNC Langensfeld, Deutschland) mit einer Fläche von 75 cm² aufgetragen. Die Verteilung erfolgte dabei nach dem Prinzip 1 Gehirn pro Flasche. Die Inkubation der Zellen erfolgte mit Gliamedium im Wärmeschrank bei 37 ° Celsius und 5 % CO₂ Gehalt. Nach fünf Tagen war ein dichter Rasen aus Astrozyten gewachsen, auf dem lose OVZ und Mikroglia anhafteten, die wir nun zur weiteren Verwendung gewinnen konnten.

2.2.2 Co-Kultur

Die Co-Kulturen enthielten OVZ und Mikroglia im Mengenverhältnis 3:1, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass ein Mengenverhältnis von 1:1 eher zu einem Untergang der noch verbleibenden OVZ führt. Mikroglia und OVZ stammten stets aus der gleichen Primärkultur. Die Gewinnung von Mikroglia erfolgte durch mechanisches Schütteln bei 200 U/min über ca. 30 Minuten bei 37 ° Celsius (Schüttler von Braun mit Temperaturkammer). Es wurde eine Vitalitätskontrollen mit Trypanblau (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und eine Zellzählung in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer durchgeführt. Gewonnene Mikroglia plattierten wir auf eine 6 Well Platte (NUNC) aus. Anschließend fluteten wir die Wells mit Gliamedium. Nach einer Ruhephase von ca. 3 Stunden wurden die verbliebenen Zellkulturflaschen für weitere 16 Stunden auf OVZ geschüttelt. Nach Erhalt, Vitalitätskontrolle und Zählung der OVZ, wurden die Mikroglia mechanisch aus der 6 Well Platte (NUNC) gelöst und zusammen mit den vitalen OPC auf Poly L- lysin beschichtete Glas – Deckgläschen in einer 24 Well Platte (NUNC) übertragen. Auf die Adhäsionsphase von 30 Minuten folgte erneut eine Flutung der Wells mit Gliamedium (350 µl / Well) unter Zusatz von IVIg.

2.2.3 Oligodendrozyten Vorläufer (OVZ) Zellkultur

Aus oben beschriebener gemischter Gliakultur gewannen wir nach ca. sieben Tagen OVZ durch mechanisches Schütteln. Die Zellkulturflaschen wurden dicht mit Parafilm verschlossen und auf einem mechanischen Schüttler bei 160 U/ min und 37 ° Celsius über mindestens 16 Stunden geschüttelt. Der Überstand mit darin enthaltenen OVZ ruhte für ca. 20 Minuten in einer neuen Zellkulturflasche (75 cm² Oberfläche NUNC) im Zellkulturschrank. Dieser Schritt diente der Adhäsion von Mikroglia an die Plastikoberfläche einer unbehandelten Zellkulturflasche. Nach erfolgter Prozedur entnahmen wir den Überstand mit den darin enthaltenen OVZ, führten eine Vitalitätskontrolle mit Trypan-Blau (Sigma) und eine Zellzählung in der Fuchs-Rosenthal Zählkammer durch. Danach plattierten wir 5×10^4 OVZ auf Poly L- lysin beschichtete Glas Cover Slips aus, welche sich in einer 24 Well Inkubationsplatte (NUNC) befanden. An eine Adhäsionsphase von ca. 20 Minuten im Wärmeschrank schloss sich eine Flutung der Wells mit N₂B₃ Medium (siehe Tabelle) und IVIg an. OVZ Kulturen enthielten Oligodendrozyten Vorläuferzellen mit einer Reinheit von ca. 85 %. Diese Reinheit wurde anhand von

stichpunktartigen immunhisochemischen Färbungen aller Gliazellarten in der OVZ Kultur durchgeführt, um Kontaminationen mit anderen Gliazellen abschätzen zu können.

2.2.4 *Verwendete Intravenöse Immunglobuline*

Alle in dieser Arbeit verwendeten IVIg Präparate wurden uns freundlicherweise von der Firma Biotest zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um insgesamt drei Präparate, welche sich in ihrem Immunglobulinsubklassengehalt unterschieden. Im Folgenden sind alle IVIg Präparate mit ihrem jeweiligen Immunglobulingehalt dargestellt.

Tabelle 2 : Verwendete IVIg Präparate in dieser Arbeit

Präparatename	Anteil IgG	Anteil IgM	Anteil IgA	Stabilisatoren
Intraglobin CP	97,6	0,01	2,33	Glycin
Pentaglobin	79,1	11,0	9,9	Glucose
IVIgM	9,3	65,2	25,5	Glycin

Dargestellt sind alle IVIg Präparate, welche in dieser Arbeit verwendet wurden. Markiert sind hier der sehr hohe Anteil an IgM im Pentaglobin und im IVIgM Präparat.

Die Reinheitsprüfung erfolgte durch die Biotest Quality Control der Firma Biotest Pharma Dreieich. Zu erkennen ist der sehr hohe IgG Anteil im Intraglobin CP bei zu vernachlässigendem IgM Anteil und sehr niedrigem IgA Anteil. Pentaglobin und IVIgM weisen alle drei IgG Subklassen auf, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen. Bei diesen hier vorliegenden Präparaten dominiert eindeutig das IVIgM Präparat mit dem höchsten Anteil an IgM. Als Stabilisatoren diente Glycin im Intraglobin CP und IVIgM, während Pentaglobin Glucose enthielt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, das Glycin auf die empfindlichen Zellen toxisch wirkt und dies zu einem vermehrten Zelluntergang und nicht auswertbaren Zellkulturen führte. Alle IVIg Präparate wurden daraufhin gegen PBS (Biochrom, Berlin; Deutschland) dialysiert. Nach Dialyse kam es nicht zu erneuten Zelluntergängen, so dass dieses Verfahren für die IVIg Präparate weiter durchgeführt wurde

2.2.5 Kontrollen

Als Kontrollen für IVIg diente Humanalbumin (DRK, Springe, Deutschland) zur intravenösen Gabe als unspezifisches Protein. Als Positivkontrolle im Proliferationsassay verwendeten wir Medium, das mit der Neuroblastoma Zelllinie B 104 konditioniert war (B 104 konditioniertes Medium; siehe Tabelle). OVZ in diesem Medium proliferierten gut, differenzierten aber nicht zu reifen Oligodendrozyten aus. Als Positivkontrolle für das Differenzierungsassay dienten Zellen, die mit N₂B₃ Medium behandelt wurde, welche zu reifen OVZ ausdifferenzierten ohne übermäßig zu proliferierten. Bei Kulturen, die Mikroglia enthielten (gemischte Gliakultur und Co Kultur), wurde außerdem eine Kontrolle mit Interferon γ (Konzentration 100 U/ml; R & D Systems, Minneapolis, USA) durchgeführt. Negativkontrolle war das jeweilige Zellmedium (Gliamedium oder N₂B₃ Medium) ohne jegliche Zusätze

2.3 Immunhistochemie

Grundsätzlich wurden nur Kulturen gefärbt, die nach lichtmikroskopischer Kontrolle verwertbare Zellmengen (dichter Zellrasen) aufwiesen. Die Inkubationszeiten betragen für alle Antikörper stets 60 Minuten.

2.3.1 Proliferationsassay

Ziel des Assays war, unterschiedliche Proliferationsraten der einzelnen OVZ unter verschiedenen Bedingungen quantitativ erfassen zu können. Alle oben bereits genannten Zellkulturen wurden nach ca. sieben Tagen gefärbt. Medium mit enthaltenen IVIg bzw. IFN γ bzw. Albumin wurde vorsichtig abpipettiert und durch neues Gliamedium ohne Zusätze ersetzt. Insgesamt drei Waschschrte mit PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland) und Auftragen des erforderlichen Primärantikörpers für A₂B₅ erfolgten. Nach erneuten Waschschrten mit PBS wurde der Sekundärantikörper für A₂B₅ (Cy₂) aufgetragen. Damit der Primär AK für BrdU an die in den Zellen befindliche DNA binden konnte, erfolgte zuerst eine Behandlung mit - 20° Celsius kaltem Methanol über 10 Minuten und daraufhin eine Inkubation in 2M Salzsäure (Sigma, Deisenhofen) für 60 Minuten bei 37 ° Celsius im Wärmeschrank. Zur Neutralisierung des pH Wertes folgten nun drei Waschschrte mit einem Borat

Puffer (0,1 molar, pH 8,5). Danach erfolgten wiederum Waschschrirte mit PBS und das Auftragen des Primärantikörpers gegen BrdU. Nach Inkubation, Waschschrirten und Auftragen des Sekundärantikörpers für BrdU (Cy₃) inkubierten die Zellen bei Raumtemperatur für ca. 30 Minuten. Dreimaliges Waschen mit PBS, vorsichtiges abpipettieren des Zellüberstandes und die Übertragung der Poly – L - lysin beschichteten Deckgläschen auf Objektträger erfolgten vor der endgültigen Auswertung am Immunfluoreszenzmikroskop (Fa, Carl Zeiss, 30fache Vergrößerung). Die Deckgläschen wurden auf dem Objektträger mit Nagellack versiegelt, gekühlt (-20 ° Celsius) und verdunkelt gelagert.

2.3.2 Differenzierungsassay

Wie bei allen anderen Färbungen erfolgten hier erst Waschschrirte mit Medium. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wurden die vorhandenen Zellen mit einem Gemisch aus zwei Primärantikörpern (A₂B₅ und GalC) inkubiert. Es folgten erneute Waschschrirte und Auftragen beider Sekundärantikörper (Cy₂ und Cy₃). Nach abgeschlossener Inkubation erfolgten wieder gründliche Waschschrirte mit Medium und eine weitere lichtmikroskopische Kontrolle. Letztendlich erfolgte noch eine Fixierung der Zellen mit 2 % Paraformaldehyd (Sigma) über mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Deckgläschen mit Medium gespült und auf Objektträger übertragen. Die Ränder der Deckgläschen versiegelten wir mit Nagellack. Lichtgeschützte und gekühlte Aufbewahrung im Kühlfach bei - 20° Celsius der Färbungen bis zur Auswertung war nötig, um den Zerfall der empfindlichen Antikörperfluoreszenz zu verhindern.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-Test für nicht-parametrische Verteilung. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,05$ angesehen. Die Messergebnisse werden als Einzelpunkte in einem Koordinatensystem dargestellt (•), die Mittelwerte der einzelnen Versuchsreihen als Querbalken (–). Statistisch signifikante Ergebnisse sind im Koordinatensystem mit einem Sternchen gekennzeichnet (*).

3. Ergebnisse

3.1 Gemischte Gliakultur

3.1.1 Proliferation

Nach Zugabe von IVIgM in einer Konzentration von 10 mg/ml kam es zu einer Hemmung der OVZ Proliferation. Diese Hemmung war bei einer Konzentration von 10 mg/ml statistisch signifikant ($p = 0,028$). In niedrigerer Dosierung (1 mg /ml) konnte ich weder beim IVIgM Präparat, noch bei allen weiteren IVIg Präparaten in beiden Konzentrationen eine statistisch signifikante Veränderung nachweisen. Die Zellen in B 104 konditioniertem Medium proliferierten stark. Dieses Ergebnis war ebenfalls statistisch signifikant im Vergleich zum Gliamedium ($p = 0,0285$). Weder die Zugabe von IFN γ in einer Konzentration von 100 U/ml noch Albumin als unspezifisches Eiweiß zeigte eine spezifische Wirkung auf die Proliferation von OVZ in der gemischten Gliazellkultur (Abbildungen 5 und 6).

3.1.2 Differenzierung

Im Differenzierungsassay der gemischten Gliazellkultur untersuchten wir das Differenzierungsverhalten der OVZ nach Zugabe der bereits genannten Substanzen und Kontrollen. Die Zugabe von Intraglobin CP, Pentaglobin und IVIgM in den Konzentrationen 1 mg/ml und 10 mg/ml hatten keinen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der OVZ. Albumin als unspezifische Eiweißkontrolle hatte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss. Die Zellen im B 104 konditionierten Medium proliferierten stark, zeigten aber ein gehemmtetes Differenzierungsverhalten. Die Zugabe von IFN γ in einer Konzentration von 100 U/ml hatte keinen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten der OVZ in der gemischten Gliazellkultur (Abbildungen 7 und 8).

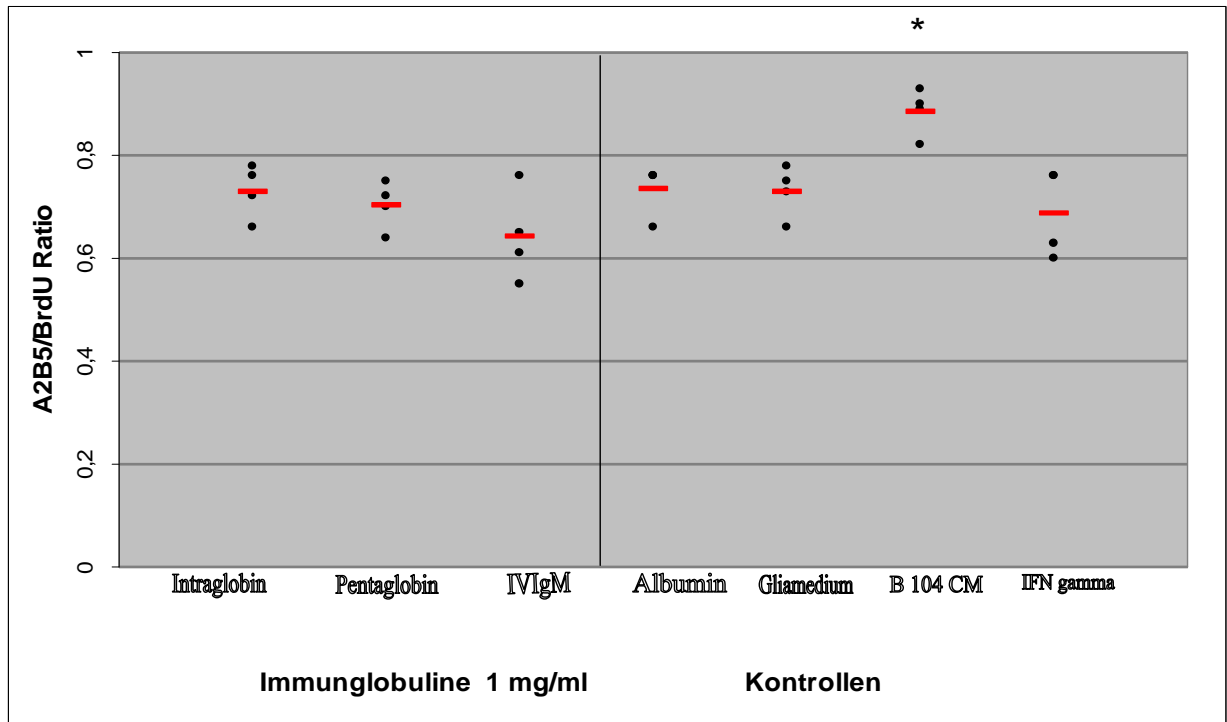


Abbildung 5: Gemischte Gliakultur im Proliferationsassay mit einer IVIg Konzentration von 1 mg/ml. Messwerte (•); Mittelwerte (—); statistische Signifikanz (*)

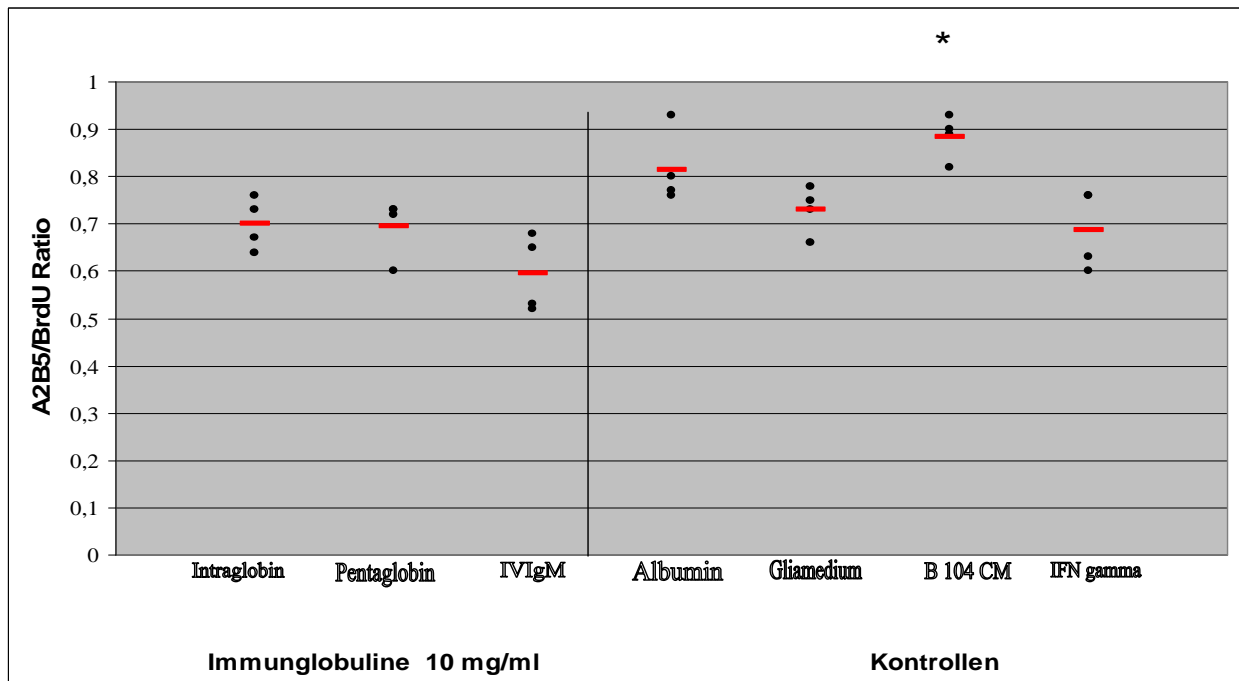


Abbildung 6: Gemischte Gliakultur im Proliferationsassay und einer IVIg Konzentration von 10 mg/ml. Messwerte (•); Mittelwerte (—); statistische Signifikanz (*)

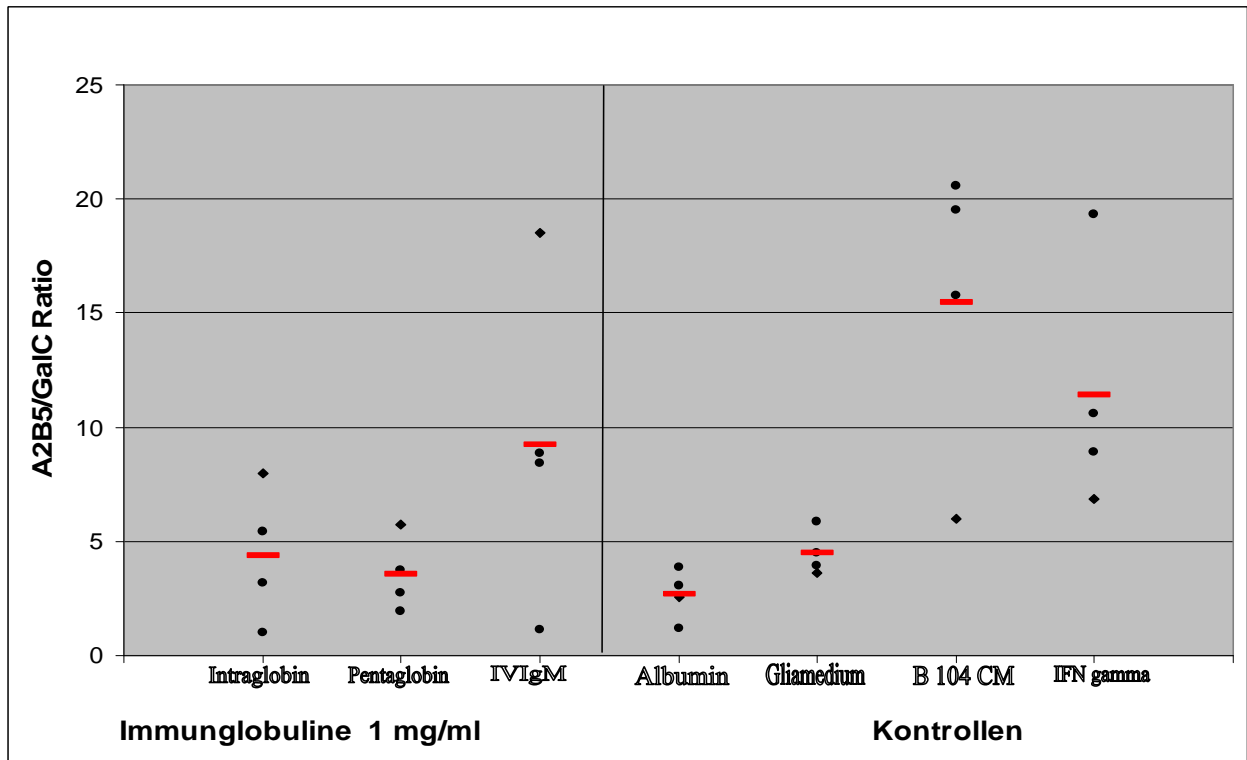


Abbildung 7: Differenzierungsassay in gemischter Gliakultur mit einer IVIg Konzentration von 1 mg/ml
Messwerte (•); Mittelwerte (—);

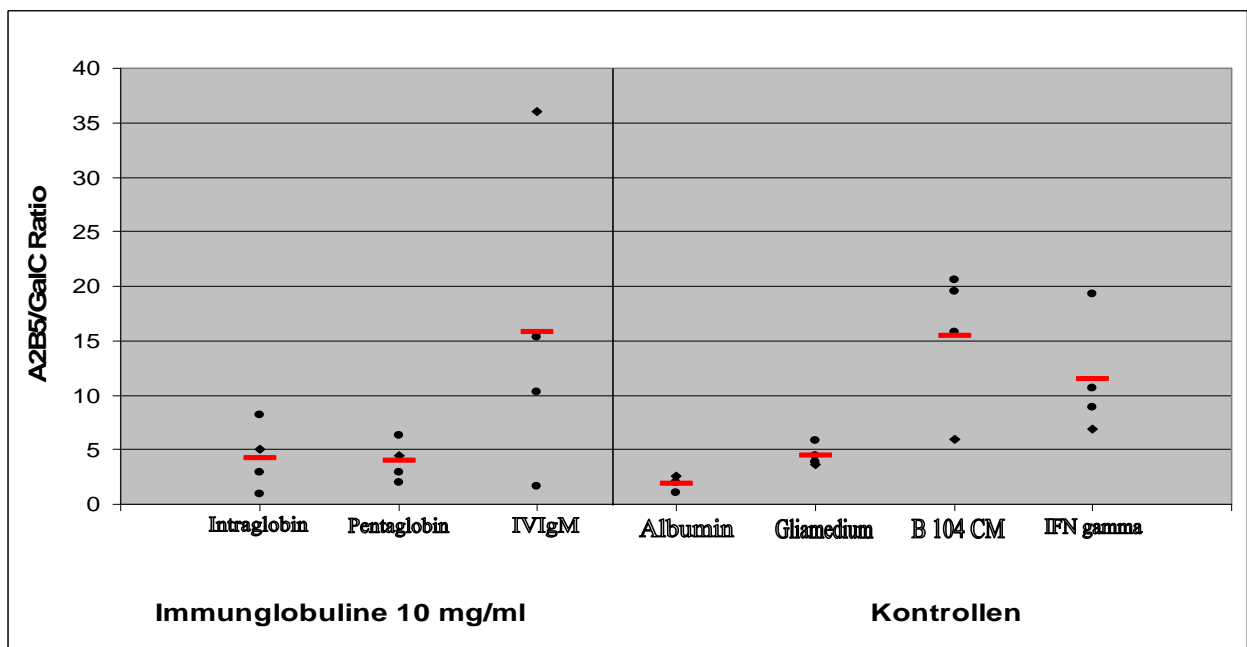


Abbildung 8: Differenzierungsassay mit gemischter Gliakultur in einer IVIg Konzentration von 10 mg / ml
Messwerte (•); Mittelwerte (—);

3.2 Co-Kultur (Mikroglia und Oligodendrozytenvorläuferzellen)

In den ersten Versuchsreihen, bei denen OVZ und Mikroglia in einem Mengenverhältnis von 1:1 kultiviert wurden, zeigte sich ein erhöhter Zelluntergang von OVZ. Aus diesem Grund kultivierte ich im Folgenden die Co-Kulturen in einem Mengenverhältnis von 3:1 (Oligodendrozyten:Mikroglia). Da dies in den folgenden Versuchsreihen nicht mehr zu einem erhöhten Zelluntergang der OVZ führte, übernahm ich dieses Mengenverhältnis für alle weiteren Folgeversuche.

3.2.1 Proliferation

Das Proliferationsverhalten der OVZ in der Co-Kultur wurde weder durch die Zugabe von Immunglobulinen in niedriger und hoher Konzentration, noch von Albumin beeinflusst. Wiederum proliferierten die Zellen im B 104 konditioniertem Medium stark. Dies war im Vergleich zum Gliamedium statistisch signifikant ($p = 0,0285$). IFN γ hatte keinen Einfluss auf die Proliferation von OVZ in der Co-Kultur (Abbildungen 9 und 10).

3.2.2 Differenzierung

Im Differenzierungsassay wurde wie bereits beschrieben vorgegangen. Auch hier zeigten die Zellen im B 104 konditioniertem Medium eine hohe Proliferation bei gleichzeitig geringer Differenzierung. Weder IVIgM noch Intraglobin CP oder Pentaglobin beeinflussten die Differenzierung der OVZ in der Co-Kultur. Albumin als unspezifische Kontrolle hatte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Differenzierung der OVZ. Bemerkenswerter Weise zeigte sich, dass die OVZ in der Co-Kultur, welche mit IFN γ in einer Konzentration von 100 U/ml behandelt wurde, eine Hemmung der Differenzierung aufwies. Dieses Ergebnis war zur Gliamediumkontrolle ($p = 0,028$) und zur Albuminkontrolle ($p = 0,02$) statistisch signifikant (Abb. 11 und 12).

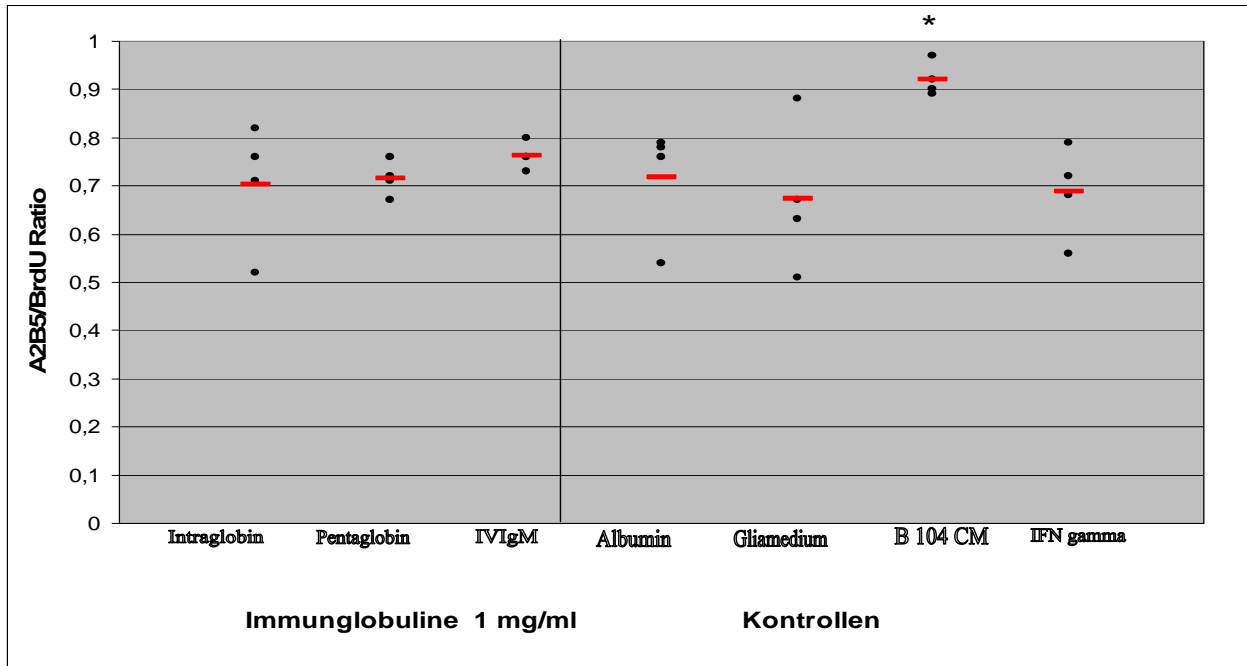


Abbildung 9: Proliferationsassay von Co Kulturen mit einer IVIg Konzentration von 1 mg/ml.
Messwerte (•); Mittelwerte (—); statistische Signifikanz (*)

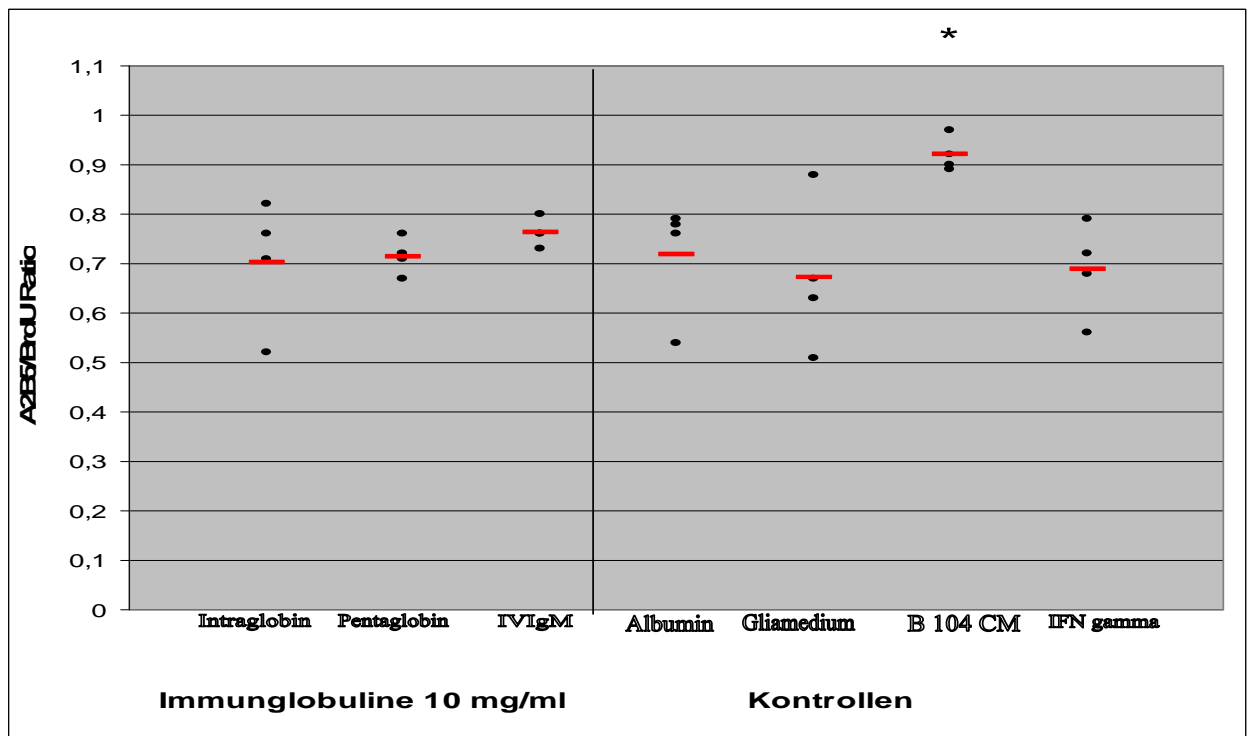


Abbildung 10: Proliferationsassay von Co Kulturen mit einer IVIg Konzentration von 10 mg/ml.
Messwerte (•); Mittelwerte (—); statistische Signifikanz (*)

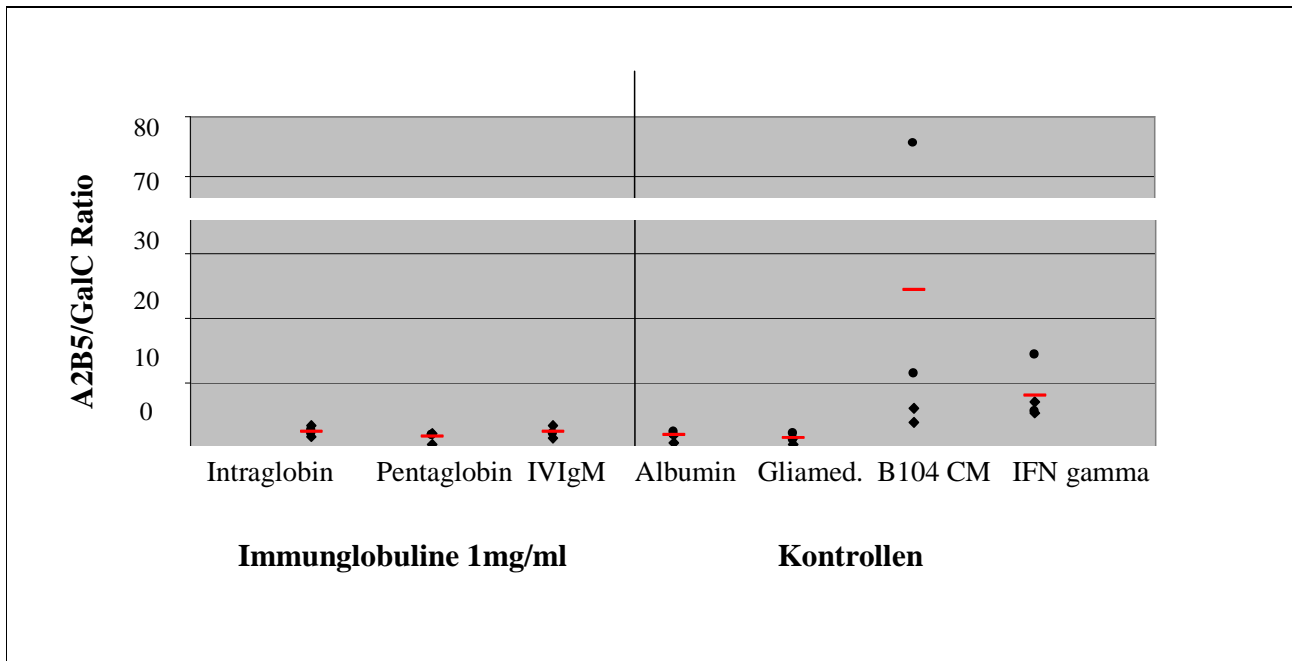


Abbildung 11: Differenzierungsassay einer Co – Kultur mit einer IVIg Konzentration von 1 mg/ml. Messwerte (•); Mittelwerte (—);

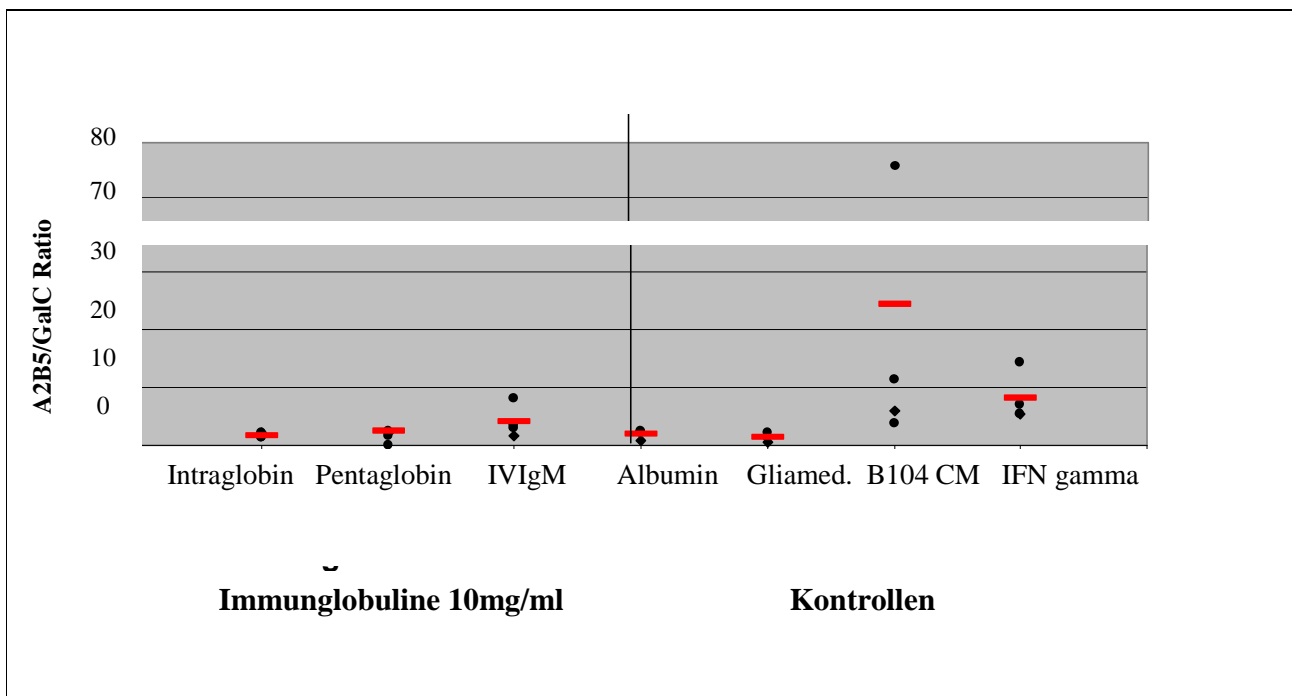


Abbildung 12: Differenzierungsassay einer Co Kultur mit einer IVIg Konzentration von 10 mg/ml. Messwerte (•); Mittelwerte (—)

3.3 Oligodendrozytenvorläuferzellen

3.3.1 Proliferation

Im Proliferationsassay mit reinen OVZ wurden die bereits erwähnten Behandlungsschritte mit IVIg und IVIgM nach Protokoll durchgeführt. In der Auswertung dieses Aufbaus konnten wir keine statistisch signifikante, höhere Proliferationstendenz bei IVIgM in einer Konzentration von 1 mg/ml beobachten. Die Zellen in B 104 konditioniertem Medium, proliferierten stark und statistisch signifikant gegenüber den Zellen in reinem Gliamedium. Von den verwendeten IVIg Präparaten zeigte Intraglobin bei einer Konzentration von 1 mg/ml eine leicht erhöhte, aber nicht statistisch signifikante Proliferationstendenz gegenüber den anderen IVIg Präparaten. In der IVIgM Konzentration von 10mg/ml konnten wir in einer einzelnen Versuchsauswertung eine sehr hohe Proliferation von OVZ beobachten, was zu einem einzelnen Ausreißer in der Auswertung führte. Die folgenden Versuche in der IVIgM Gruppe bei einer Konzentration von 10 mg/ml blieben aber ohne auffällig hohe Proliferationstendenz der OVZ, so dass dieser einzelne Messwert insgesamt keine statistische Signifikanz in der IVIgM Gruppe ausmachte. Die Positivkontrolle mit OVZ in B 104 konditioniertem Medium zeigte auch im Versuchsaufbau der IVI Konzentration 10 mg/ml eine statistisch signifikante Proliferation der OVZ (Abbildung 13 und 14).

3.3.2 Differenzierung

Auch im Differenzierungsassay zeigte sich nach Zugabe von IVIg und Albumin kein verändertes oder statistisch signifikantes Verhalten der OVZ. Wie bereits in den beiden anderen Versuchsreihen, zeigten die OVZ in der B 104 angereicherten Zellkultur eine sehr hohe, statistisch signifikante Proliferationstendenz bei niedrigem Differenzierungsindex (Abbildungen 15 und 16).

3.4 Direkte Bindung von IVIgM an OVZ

Um zu untersuchen, ob IVIgM direkt an die OVZ bindet, wurden OVZ Kulturen mit IVIgM in verschiedenen Konzentrationen behandelt (1 mg/ml; 10 mg/ml; 100 mg/ml) und danach immunhistochemisch mit einem Anti IgM Antikörper gefärbt. In keiner der oben angegebenen Hinweis darauf sein, dass IVIgM keinen direkten Einfluss auf OVZ haben (keine Abbildung vorhanden).

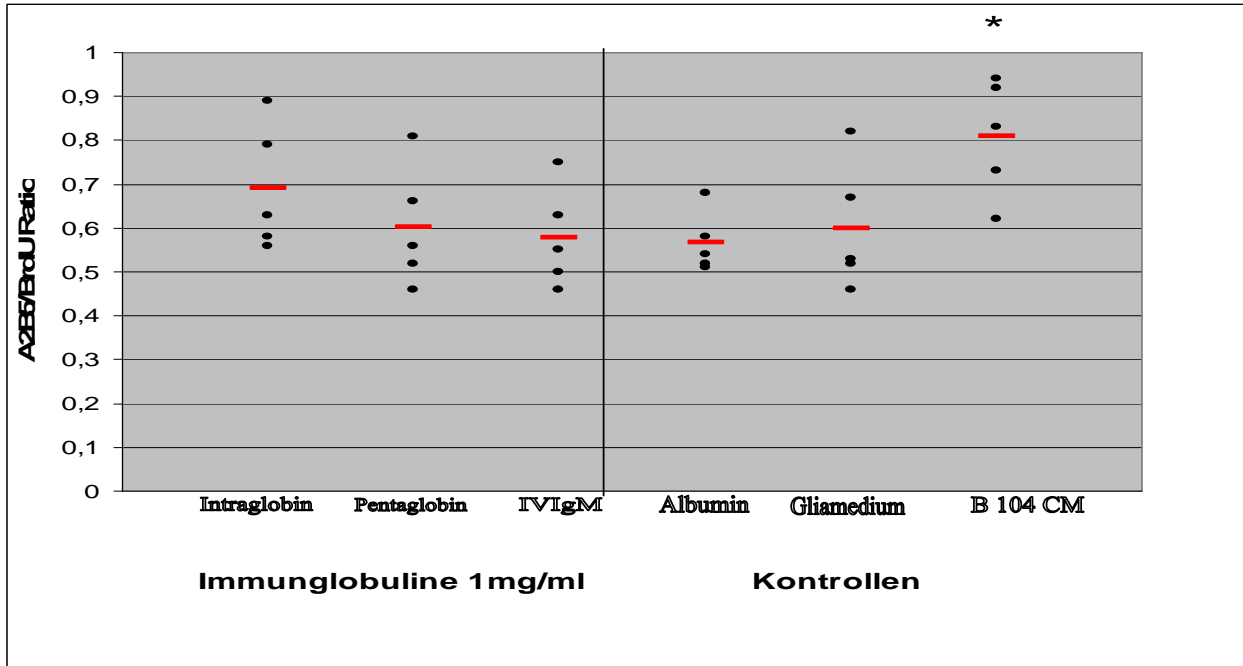


Abbildung 13: Proliferationsassay einer OVZ Kultur mit einer IVIg Konzentration von 1 mg/ml. Messwerte (•); Mittelwerte (—); statistische Signifikanz (*)

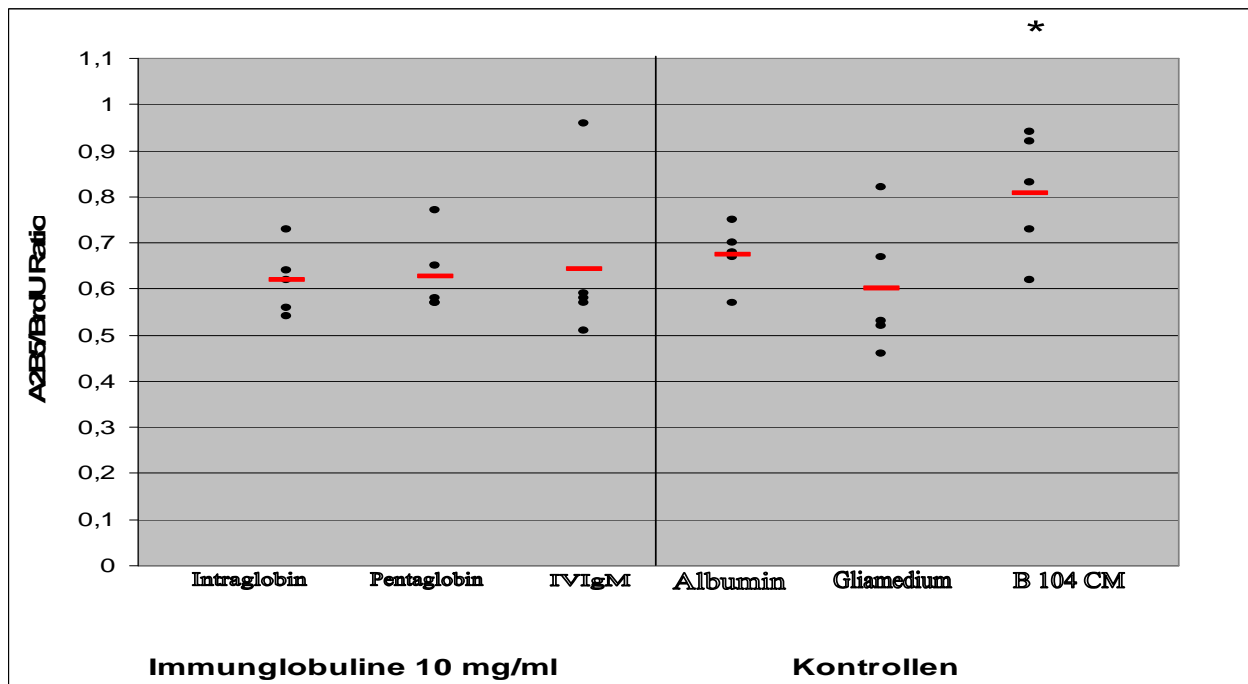


Abbildung 14: Proliferationsassay einer OVZ Kultur mit einer IVIg Konzentration von 10 mg/ml. Messwerte (•); Mittelwerte (—); statistische Signifikanz (*)

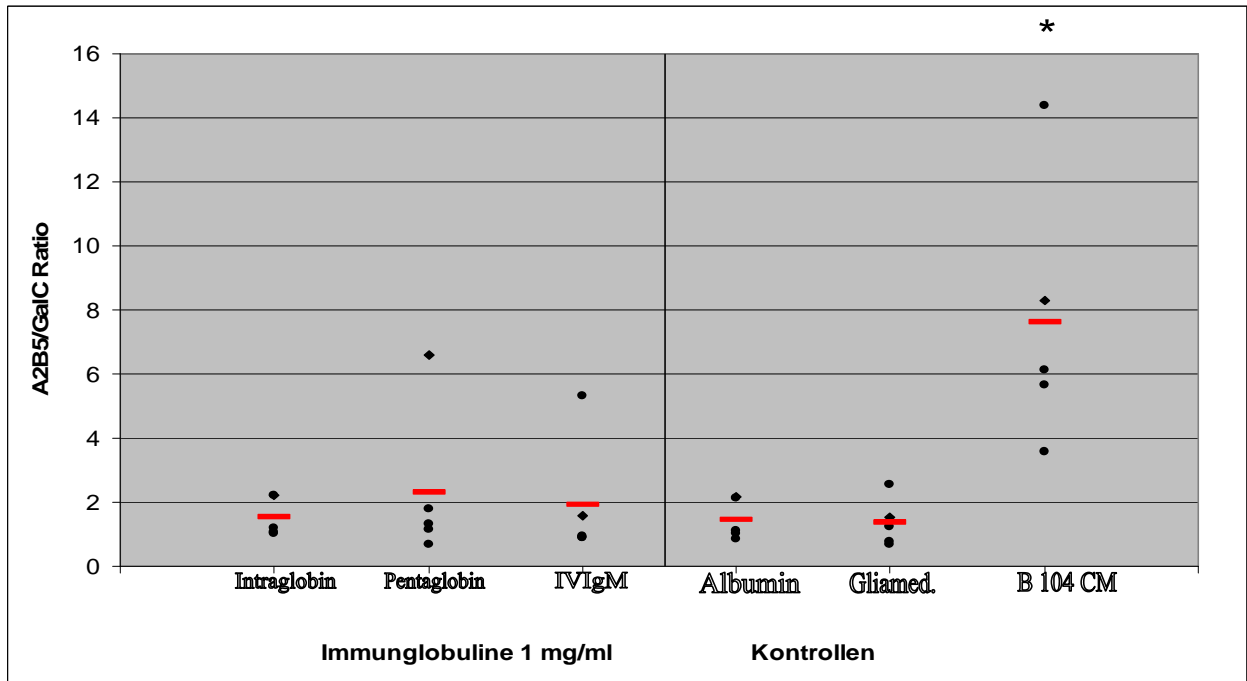


Abbildung 15: Differenzierungsassay einer OVZ Kultur mit einer IVIg Konzentration von 1 mg/ml. Messwerte (•); Mittelwerte (—)

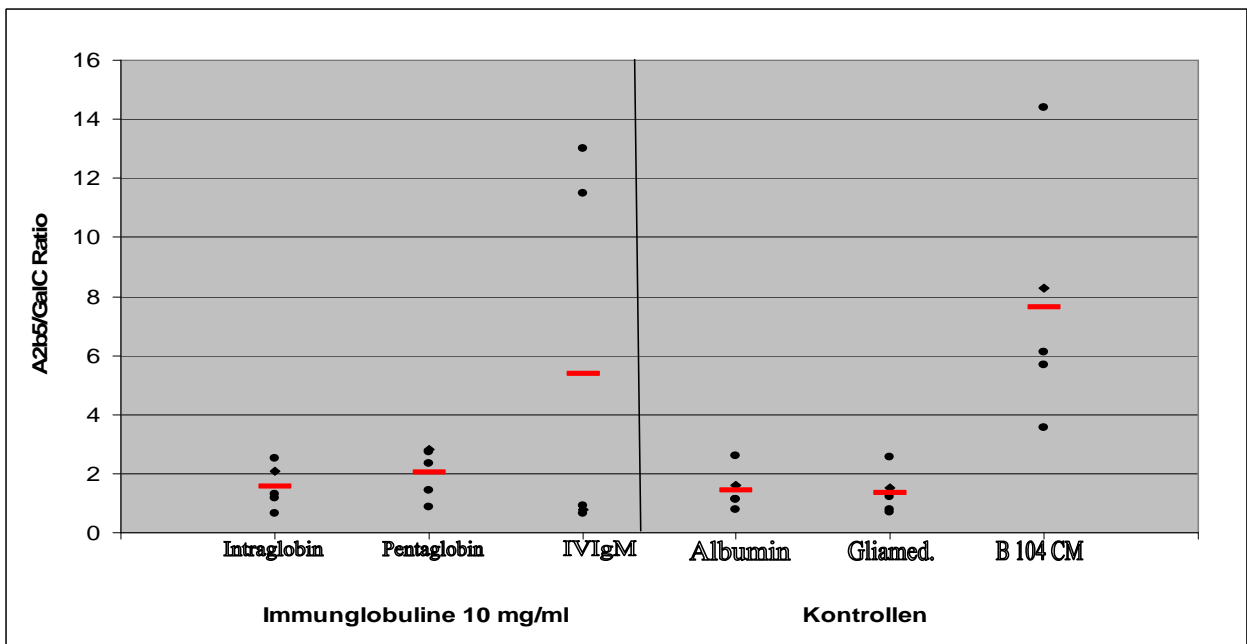


Abbildung 16: Differenzierungsassay einer OVZ Kultur mit einer IVIg Konzentration von 10 mg/ml. Messwerte (•); Mittelwerte (—)

4 Diskussion

4.1 Proliferation

Die Proliferation der OVZ wurde im Rahmen dieser Promotion durch immunhistochemische Färbung untersucht. Zielpunkt waren die Zellen, die nach Applikation von IVIg und IVIgM den Oberflächenrezeptor A₂B₅ exprimierten. In der gemischten Gliazellkultur kam es nach Applikation von IVIgM in einer Konzentration von 10 mg/ml zu einer statistisch signifikanten, gehemmten Proliferation von OVZ. In niedrigerer IVIgM Konzentration konnte dieser Effekt nicht gesehen werden. In der Co-Kultur mit Mikroglia und in der reinen OVZ Kultur hatten IVIgM in beiden Konzentrationen keinen statistisch signifikanten Proliferationseffekt auf die OVZ. Da diese Beobachtungen nur in der gemischten Gliakultur in einer hohen IVIgM Konzentration auftraten, könnte dies ein Hinweis für einen indirekten, dosisabhängigen Einfluss von IVIgM auf die Oligodendrozytenvorläuferzellen sein. Das Zustandekommen dieser indirekten Wirkung ist sicherlich im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beurteilbar, dennoch wollen wir an dieser Stelle die verschiedenen Möglichkeiten diskutieren. OVZ wurden in dieser Arbeit mit Mikroglia als Co-Kultur kultiviert. Eine statistisch signifikante Proliferationshemmung der OVZ nach Applikation von IVIgM in einer Dosierung von 1 und 10 mg/ml konnte hier nicht gesehen werden. Dies lässt vermuten, dass Mikroglia nicht ausschließlich an der indirekten Wirkung auf OVZ beteiligt waren. Die komplexe Wechselwirkung aller Gliazellen im ZNS ist eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt. Einen definitiven Beweis dafür können wir an dieser Stelle nicht erbringen. Ein weiterer Punkt ist die Tatsache, dass das hier verwendete IVIgM Präparat zum Zeitpunkt dieser Dissertation noch nie experimentell auf die Proliferation von unbeeinflussten OVZ untersucht wurde. Der hohe IgM Anteil von 65,2 % ist bisher in keinem auf dem Markt befindlichen Präparat enthalten. Der Vergleich mit Arbeiten anderer Autoren, die keinen Einfluss von polyklonalen IVIg auf die Proliferation von OVZ zeigen konnten (Stangel und Compston 1999) ist daher nicht möglich. Die hohe Dosis der IVIgM, die notwendig war um einen statistisch signifikanten Proliferationseffekt der OVZ zu erzeugen, muss ebenfalls in den Mittelpunkt des Interesses rücken. Inwiefern eine weitere Dosissteigerung einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der OVZ haben könnte, lässt sich nicht abschließend beurteilen.

4.2 Differenzierung

Die Differenzierung als eine der grundlegenden Voraussetzungen für eine suffiziente Remyelinisierung wurde in dieser Arbeit immunhistochemisch untersucht. Zielpunkt der Untersuchung waren die Zellen, welche nach Kultivierung mit IVIg und IVIgM den Oberflächenrezeptor Galactocerebroside (GalC) exprimierten. IVIgM konnte allen Versuchsaufbauten in beiden Konzentrationen keine statistisch signifikant höhere Differenzierung auslösen. Eine statistisch signifikante Hemmung der OVZ durch IVIgM konnte ebenfalls nicht gesehen werden. Diese Ergebnisse sind zwar bedauerlich, sollen an dieser Stelle aber weiter diskutiert werden. Mögliche Ursachen für diese Untersuchungsergebnisse könnte das IVIgM Präparat selber sein, welches einen sehr hohen IgM Anteil von 65,2 % aufwies und somit womöglich toxisch oder differenzierungshemmend auf die Zellen gewirkt haben könnte. Die technischen Bedingungen wurden bei allen Versuchsreihen gleich durchgeführt und scheiden daher als mögliche Ursachen für die frustrierten Untersuchungsergebnisse weitestgehend aus. Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass IVIgM keinen positiven Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von OVZ hat.

Nebenbefundlich konnten wir beobachten, dass OVZ in der Co-Kultur nach Zugabe von Interferon γ in ihrem Differenzierungsverhalten gehemmt wurden. Dieses Ergebnis war im Vergleich zu OVZ in reinem Gliamedium und der unspezifischen Kontrolle mit Albumin statistisch signifikant. Diesen Effekt konnten wir in der gemischten Gliakultur nicht nachweisen. Betrachtet man nun diesen Zufallsbefund kritisch in Bezug auf das Zusammenwirken von Gliazellen untereinander ohne die Wirkung von IVIgM, so ist eine indirekte Wirkung von Mikroglia auf die OVZ denkbar. Auch eine direkte Wirkung von Interferon γ auf die OVZ ist hier zu diskutieren. Diese Frage lässt sich leider mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht abschließend klären, ist aber zukünftig sicherlich in Bezug auf das Verständnis der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Gliazellen interessant.

4.3 Schlussfolgerung

Wir konnten zeigen, dass IVIgM in einer Konzentration von 10 mg/ml Oligodendrozyten-vorläuferzellen in ihrer Proliferation hemmen, wenn OVZ zusammen mit Mikroglia und Astrozyten kultiviert werden. Dieser Effekt wurde weder in der reinen OVZ Kultur, noch in der Co-Kultur gesehen. Eine statistisch signifikante Hemmung der Proliferation konnte in keinem Versuchsaufbau in keiner der IVIgM Konzentrationen gesehen werden.

Das Differenzierungsverhalten von OVZ wurde nicht von IVIgM statistisch signifikant beeinflusst. Lediglich Interferon γ konnte in der Co-Kultur die Differenzierung von OVZ hemmen. Aus diesen hier präsentierten Ergebnissen ziehen wir den Schluss, dass intravenöse Immunglobuline durchaus eine Wirkung auf OVZ haben. Da diese Wirkung nur in der Zellkultur auftrat, in der neben OVZ auch noch Mikroglia und Astrozyten kultiviert wurden, ist ein indirekter Effekt auf OVZ denkbar. Die Tatsache, dass OVZ in Co-Kultur mit Mikroglia weder in ihrem Proliferations-, noch in ihrem Differenzierungsverhalten beeinflusst wurden, deutet darauf hin, dass die indirekte Wirkung nicht ausschließlich von den Mikroglia ausgeht sondern wohl auf einem komplexen Miteinander der verschiedenen Gliazellen beruht. Da die unterschiedlichen Funktionen der einzelnen Gliazellen nicht bis in das letzte Detail geklärt sind, lässt sich nicht definitiv sagen, welche Zellen durch welchen Mechanismus eine Wirkung entfalten. Auch die Tatsache der hohen IVIgM Konzentration von 10 mg/ml muss mit in Betracht gezogen werden. Möglicherweise könnte der Effekt auf die OVZ dosisabhängig sein. Inwiefern eine weitere Dosissteigerung der IVIgM auf die OVZ und deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten wirkt, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht und ist daher ebenfalls nicht beurteilbar. Eine klinische Konsequenz lässt sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht herleiten, da das in dieser Promotion verwendete IVIgM Präparat bisher noch nie im klinischen Alltag eingesetzt wurde.

5 Zusammenfassung

Intravenöse Immunglobuline (IVIg) werden seit vielen Jahren mit Erfolg bei immunologischen Erkrankungen eingesetzt. Der genaue Wirkmechanismus dieser Medikamente ist bisher nicht genau bekannt. Verschiedene Angriffspunkte am Immunsystem werden diskutiert. IVIg werden auch im Zusammenhang mit Multipler Sklerose (MS) als mögliche Therapeutika diskutiert, konnten sich aber aufgrund der bisherigen Datenlage nicht als Medikamente der ersten Wahl durchsetzen. Bei MS kommt es zu einer schubförmigen Demyelinisierung der Axone im ZNS, was im weiteren Verlauf zu irreparablen Schäden mit lebenslanger Behinderung führt. Pathophysiologisch stellen Myelinscheiden und Axone des ZNS die Angriffspunkte bei MS dar. Nach abgelaufener, akuter Entzündungsreaktion kommt es zum Einwandern von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (MMS), welche mit Reparaturvorgängen beginnen. Unter Ihnen befinden sich auch Oligodendrozytenvorläuferzellen. Diese Zellen sind in der Lage, an den Ort der Schädigung zu migrieren, zu proliferieren und zu reifen Oligodendrozyten zu differenzieren. Dieser Prozess ist limitiert und oft inkomplett, eine Heilung dieser Erkrankung ist bisher nicht möglich. Die bisherige Behandlung von MS basiert auf einer Immunsuppression im akuten Schub bzw. einer Immunmodulation im weiteren Verlauf.

Die aktuellen Forschungen auf dem Gebiet der MS Therapien finden sowohl am Patienten, als auch im Tiermodell statt. In einem solchen Modell der MS, der Theiler'schen Virus Meningo Enzephalitis (TVME), bei der nach einer viral induzierten Demyelinisierung IVIg appliziert wurden, konnte eine statistisch signifikante Rate an OVZ zur Proliferation und Differenzierung angeregt werden. Bemerkenswert dabei war, das IVIg mit einem relativ hohen Anteil an IgM eine höhere Potenz zur Stimulierung der OVZ aufwies, als vergleichbare Präparate ohne IgM Anteil. Basierend auf den oben beschriebenen Ergebnissen muss die Frage diskutiert werden, ob IVIg mit erhöhtem IgM Anteil (IVIgM) möglicherweise eine höhere Potenz haben, OVZ zu beeinflussen. In dieser Promotion befassten wir uns mit der Fragestellung, inwiefern ein IVIgM Präparat mit sehr hohem Anteil an IgM die Proliferation und Differenzierung von OVZ beeinflussen kann und ob diese Beeinflussung im Vergleich zu anderen IVIg Präparaten statistisch signifikant ist.

Aus den Gehirnen neugeborener Sprague-Dawley Ratten wurden Oligodendrozyten Zellkulturen gewonnen, wobei wir OVZ in Reinkultur, in Anwesenheit von Mikroglia als Co-Kultur und als gemischte Gliakultur in Anwesenheit von Astrozyten und Mikroglia kultivierten. Nach Erhalt dieser

Zellkulturen wurden IVIg und IVIgM in einer Dosierung von 1 mg/ml und 10 mg/ml appliziert. Als Kontrolle diente Albumin als unspezifisches Eiweiß und unbeeinflusste Zellen in Kulturmedium. Nach Kultivierung der Zellen mit IVIg und IVIgM wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, wobei die Expressierung von Oberflächenrezeptoren der OVZ Hinweise darauf gaben, wie weit die Proliferation und Differenzierung fortgeschritten war.

In diesem Versuchsaufbau konnten wir nachweisen, dass IVIgM in einer Dosierung von 10 mg/ml die Proliferation von OVZ in der gemischten Gliazellkultur hemmte. Die Differenzierung von OVZ wurde von IVIgM in keiner Dosierung statistisch signifikant beeinflusst.

Unsere Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass IVIgM einen Einfluss auf die OVZ ausübt. Diese Wirkung könnte indirekt zustande gekommen sein, da sich zum Zeitpunkt der gehemmten Proliferation Astrozyten und Mikroglia in der Zellkultur befanden. Ob dieser Einfluss von den Mikroglia oder den Astrozyten ausgeht, ist nicht eindeutig beweisbar. Die Tatsache, dass dieser Effekt nicht in der Co-Kultur reproduzierbar war, könnte ein Hinweis darauf sein, dass Mikroglia nicht allein als indirekte Wirkungsvermittler fungieren. Ob ausschließlich Astrozyten an der indirekten Wirkung von IVIgM auf die OVZ beteiligt sind, oder ein komplexes Miteinander der Gliazellen notwendig ist, lässt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beurteilen.

Die hohe IVIgM Dosierung, welche zur statistisch signifikanten Hemmung der Proliferation von OVZ in der gemischten Gliakultur führte, muss ebenfalls diskutiert werden. Sicherlich müssen in Zukunft noch weitere Untersuchungen folgen, um die Wirkung auf Zellkulturebene zu verstehen.

Alphabetisches Literaturverzeichnis

Achiron A, Gabbay U, Gilad R, Hassin-Baer S, Barak Y, Girnish M, Elizur A, Goldhammer Y, Sarova-Pinhas I (1998) Intravenous Immunglobulin treatment in multiple sclerosis. Effects on relapses. *Neurology* 50, 398-402

Agresti C, D'Urso D, Levi G (1996) Reversible inhibitory effects of interferon γ and Tumor Necrosis Factor α on oligodendroglial lineage cell proliferation and differentiation in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 8, 1106 - 1116

Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, Raff MC (1992) Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 70, 31 - 46

Barres BA, Lazar MA, Raff MC (1994) A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. *Development* 120, 1097 – 1108

Bayas A; Gold R (2003) Lessons from 10 years of interferon – 1b (Betaferon / Betaseron) Treatment. *J. Neurol.* 250, Supplement 4, IV/3-IV/8

Carroll WM, Jennings AR (1994) Early recruitment of oligodendrocyte precursors in CNS Remyelination. *Brain* 117, 563 - 578

Chan, A. Papadimitriou C, Graf W, Toyka KV; Gold R (2003) Effects of polyclonal immunoglobulins and other immunomodulatory agents on microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T-cells. *J Neuroimmunol.* 135, 161-165

Compston A, Coles A. (2002) Multiple Sclerosis. *Lancet* Aug 24 1221-31

Fazekas F, Lublin FD, Li D, Freedman MS, Hartung HP, Rieckmann P, Sørensen PS, Maas-Enriquez M, Sommerauer B, Hanna K (2008) PRIVIG Study Group; UBC MS/MRI Research Group. *Neurol.* Jul 71,265-71

Fazekas F, Deisenhammer F, Strasser-Fuchs S, Nahler G, Mamoli B. for the Austrian Immunglobulin in Multiple Sclerosis Study Group (1997) Randomised placebo-controlled trial of monthly intravenous immunglobulin therapy in relapsing – remitting multiple sclerosis. *Lancet* 349, 589-59

Fernandez O, Fernandez V, de Ramon E (2004) Azathioprin and methotrexate in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci* 223, 29-34

Filippi M, Rocca MA (2003) MRI aspects of the inflammatory phase of multiple sclerosis. *Neurol. Sci.* 24, 275-278

Frohmann EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple Sclerosis. The plaque and it´s pathogenesis. *NEJM* 354, 942 - 955

Gold R (2000) Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the central nervous system. *Mol. Med. Today* 6, 88 - 91

Gold R (2008) Combination therapies in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2008; 255 Suppl. 1, 51 - 60

Gonzales – Scarano F, Baltuch, G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annuals Rev. Neurosciences* 22, 219-240

Hajihosseini M, Tham TN, Dubois-Dalcq M (1996) Origins of oligodendrocytes within the human spinal cord. *J. Neurosci.* 16, 7981 - 7994

Hein T, Hopfenmueller W (2000) Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany. *Nervenarzt* 71, 288 – 294

Hortega P, del Rio P. (1921) Estudios sobre la neuroglia . La glia de escasas radiciones (oligodendrogliá). *Boletín de la Real Sociedad Española de la Historia Natural* 21,63 - 92

Keirstead HS, Blakemore WF (1997) Identification of post mitotic oligodendrocytes incapable of remyelination within the demyelinated adult spinal cord. *J.Neuropathol.Exp. Neurol.* 56, 1191 - 1201

Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW (2000) The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 24, 39 - 47

Matsushima GK, Moree P (2001) The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol.* 11, 107 -116

McCarthy, K.D.; de Vellis J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell. Biology* 85, 890 – 892

Mc Kay R.D.G (1997) Stem cells in the central nervous system. *Science* 276, 66 - 71

McKinnon RD, Piras G, Ida JA Jr, Dubois-Dalcq M.(1993) A role for TGF β in oligodendrocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 121, 1397 - 1407

Miller HG, Foster JB, Newell DJ, Barwick DD Brewis RAL (1963) Multiple Sclerosis:therapeutic trials of cloroquine, soluble aspirin and gammaglobulin. *BMJ* 2 , 1436 - 1439

Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (2006) Escalating immunotherapy of multiple sclerosis; An Update. *Nervenarzt* 77, 1506-18.

Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG (2000) Multiple Sclerosis. NEJM. 343, 938 – 952

Noseworthy JH, O'Brien PC, Weinshenker BG, Weis JA, Petterson TM, Erickson BJ, Windebank AJ, Whisnant JP, Stolp-Smith KA, Harper CM Jr, Low PA, Romme LJ, Johnson M, An KN, Rodriguez M (2000) IV Immunglobulin does not reverse established weakness in MS. A double blind, placebo controlled trial. Neurology 55, 1135 – 1143

Noseworthy JH, O'Brien PC, Petterson TM, Weis J, Stevens L, Peterson WK, Sneve D, Cross SA, Leavitt JA, Auger RG, Weinshenker BG, Dodick DW, Wingerchuk DM, Rodriguez M (2001) A randomized trial of intravenous immunglobulin in inflammatory demyelinating optic neuritis. Neurology 56, 1514 - 1522

Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H (2006) Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. Brain 129, 3165 – 3172

Pringle NP, Richardson WD (1993) A singularity of PDGF α receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. Development 117, 525 - 533

Pul R, Nguyen D, Schmitz U, Marx P, Stangel M (2002) Comparison of Intravenous Immunglobulin Preparations on microglia function in vitro: More potent immunomodulatory capacity of an IgM/IgA enriched Preparation. Clin. Neuropharm. Sept-Oct. 25, 254 – 259

Rao MS, Mayer – Proschel M (1997) Glial restricted precursors are derived from multipotent neuroepithelial stem cells. Devel. Biol. 188, 48- 63

Reynolds R., Wilkin G.P (1988) Development of macroglial cells in rat cerebellum . An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. Development 102, 409 - 425

Robertson W.F. (1899); On a new method of obtaining a black reaction in certain tissue elements of the central nervous system (platinum method). *Scott. Med. Surg. J.* 4, 23-30

Rosati G. (2001) The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol. Sci.* 22, 117 – 139

Schwarz S, Meinck HM, Storch-Hagenlocher B (2009) Intravenöse Immunglobuline bei Multipler Sklerose. *Der Nervenarzt* 918 – 928

Scolding NJ, Frith S, Linington C, Morgan BP, Campbell AK, Compston DA (1989); Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein (MOG) is a surface marker for oligodendrocyte maturation. *J. Neuroimmunol.* 22, 169 – 176

Sospedra M., Martin, R (2005) Immunology of Multiple Sclerosis. *Ann. Review Immun.* 23, 683-747

Spranger M, Fontana A (1996) Activation of microglia a dangerous interlude in immune function in the brain. *Neuroscient.* 2, 293-299

Sorensen PS, Wanscher B; Jensen CV, Schreiber K; Blinkenberg M; Ravnborg M; Kirsmeier H; Larsen VA; Lee ML (1998) Intravenous Immunglobulin G reduces MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 50, 1273 - 1281

Stangel M, Boegner F, Klatt CH, Hofmeister C, Seyfert S (2000) A placebo controlled pilot trial to study the remyelating potential of intravenous immunglobulins in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 68, 89 - 92

Stangel M., Compston A., Scolding N (1999) Polyclonal immunglobulins for intravenous use do not influence the behaviour of cultured oligodendrocytes. *J. Neuroimmunol.* 96, 228 - 233

Stangel M, Compston A (2001) Polyclonal Immunglobulins (IVIg) modilate nitric oxide production and microglial functions in vitro via Fc – Receptor. *J. Neuroimmunol.* 112, 63 – 71

Van Engelen BG, Miller DJ, Pavelko KD, Hommes OR, Rodriguez M (1994) Promotion of remyelination by polyclonal immunglobulin in Theiler's virus induced demyelination and in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 57, 65 - 68

Warrington, Akasura, Bieber et al (2000) Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis. *PNAS* Vol. 97, 6820 - 6825

Wiendl, H.C. Lehmann, R. Hohlfeld, H.P. Hartung und B.C. Kieseier (2004) Multiple Sklerose: potentielle Therapieansätze und Update laufender Studien. *Der Nervenarzt* 75,536 - 552

Wolinsky JS (2006) The use of glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Advances Neurol.* 98, 273-292

Woodruff RH, Franklin RJ (1997) Growth factors and remyelination. *Histol. Histopathol.* 12, 889 - 990

Woodruff RH, Franklin RJ (1999) Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotactic injections of lysolecithin, ethidium bromide and complement / antigalactocerebroside: a comparative study. *Glia* 25, 216 - 228

Zhang SC (2001) Defining glia cells during CNS development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 840 – 843

7 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle besonders bei Herrn Prof. Dr. med. M. Stangel für die Bereitstellung des Promotionsthemas und seine Unterstützung bedanken.

Frau Lanka und Frau Trampenau haben mir in meiner Zeit als Doktorand im Labor immer mit Ihren Erfahrungen und Ratschlägen zur Seite gestanden. Auch Ihnen gilt mein Dank.

Herrn PD Dr. Dr. Hopfenmüller danke ich für die statistische Auswertung.

Frau PD Dr. med. A. D. Sperfeld danke ich für Ihre Unterstützung.

Großer Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern, Walther und Petra Bernard und meiner Großmutter, Frau Irmgard Quade, die mit viel Geduld und Enthusiasmus meine Motivation aufrechterhielten.

Frau Simone Kraft und Nicky Kraft danke ich für Ihre Geduld an den Tagen, wo die Arbeit an dieser Promotion die gemeinsame Zeit reduzierte.

8 Publikationsliste

Stangel M, Bernard D. (2003) Polyclonal IgM influence oligodendrocyte precursor cells in mixed glial cell cultures: implications for remyelination. *J Neuroimmunol.* 2003 May;138(1-2):25-30

.Die Vorveröffentlichung von Teilergebnisse dieser Promotion wurde angemeldet.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.