

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik  
der Universitätsklinik Eppendorf  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Leiter: Prof. Dr. Gisbert Richard

## **Neuroprotektion von Photorezeptoren mit lentiviral transduzierten mesenchymalen Stammzellen in dem *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mausmodell**

### **DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Preet Mohinder Singh  
aus Kopenhagen

Hamburg 2014

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.03.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Udo Bartsch**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Nicolaus Kröger**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. Christian Bernreuther**

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>1.1 STAMMZELLEN</b>	<b>8</b>
1.1.1 ADULTE STAMMZELLEN	10
1.1.2 EMBRYONALE STAMMZELLEN	16
1.1.3 INDUZIERTE PLURIPOTENTE STAMMZELLEN	20
1.1.4 MESENCHYMALE STAMMZELLEN	22
<b>1.2 WACHSTUMSFAKTOREN</b>	<b>26</b>
1.2.1 CILIARY NEUROTROPHIC FACTOR	26
<b>2 MATERIAL UND METHODE</b>	<b>30</b>
<b>2.1 VERSUCHSTIERE</b>	<b>30</b>
<b>2.2 ISOLIERUNG VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN</b>	<b>31</b>
<b>2.4 EXPANSION DER MESENCHYMALEN STAMMZELLEN</b>	<b>32</b>
<b>2.5 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN</b>	<b>32</b>
<b>2.6 POLYCISTRONISCHE LENTIVIRALE VEKTOREN</b>	<b>33</b>
<b>2.7 HERSTELLUNG DER LENTIVIRALEN PARTIKEL</b>	<b>33</b>
<b>2.8 TRANSDUKTIONEN VON 3T3-ZELLEN</b>	<b>35</b>
<b>2.9 TRANSDUKTION UND SELEKTION VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN</b>	<b>35</b>
<b>2.10 KLONIERUNG VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN</b>	<b>36</b>
<b>2.11 IMMUNZYTOCHEMIE UND HISTOLOGIE</b>	<b>36</b>
2.11.1 IMMUNZYTOCHEMISCHE ANALYSE VON TRANSDUZIERTEN MESENCHYMALEN STAMMZELLEN	36
2.11.2 WESTERN BLOT	38
<b>2.12 INTRAVITREALE ZELLTRANSPLANTATIONEN</b>	<b>41</b>
<b>2.13 HISTOLOGISCHE ANALYSEN DER EMPFÄNGER-NETZHÄUTE</b>	<b>42</b>
<b>2.14 PHOTOREZEPTOR ZÄHLUNG</b>	<b>44</b>
<b>2.15 VERWENDETE LÖSUNGEN</b>	<b>46</b>
2.15.1 ALLGEMEINE LÖSUNGEN	46
2.15.2 MEDIEN FÜR MESENCHYMALE STAMMZELLEN	47
<b>2.16 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE</b>	<b>48</b>
2.16.1 CHEMIKALIEN	48

2.16.2 MEDIEN, SUPPLEMENTE, WACHSTUMSFAKTOREN	50
2.16.3 PRIMÄRE ANTIKÖRPER	51
2.16.4 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	51
2.16.5 GERÄTE	52
2.16.6 GEBRAUCHSWAREN	53
2.16.7 VERSUCHSTIERE	54
2.16.8 SOFTWARE	54
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>3.1 MURINE MESENCHYMALE STAMMZELLEN</b>	<b>55</b>
<b>3.2 TRANSDUKTION VON MESENCHYMALEN STAMMZELLEN</b>	<b>57</b>
<b>3.3 KLONIERUNG</b>	<b>60</b>
<b>3.4 NACHWEIS DER CNTF EXPRESSION UND SEZERNIERUNG</b>	<b>62</b>
3.4.1 WESTERN BLOT ANALYSE VON KULTURÜBERSTÄNDEN	62
3.4.2 IMMUNZYTOCHEMISCHE ANALYSEN DER CNTF EXPRESSION	63
<b>3.5 ANALYSE DES NEUROPROTEKTIVEN EFFEKTS CNTF EXPRIERENDER MESENCHYMALER STAMMZELLEN AUF PHOTOREZEPTOREN IN DER <i>PDE6B<sup>RD1</sup></i> MUTANTE</b>	<b>67</b>
<b>3.6 QUANTITATIVE ANALYSE DER NEUROPROTEKTION VON PHOTOREZEPTOREN</b>	<b>69</b>
<b>3.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG</b>	<b>77</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>78</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>86</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>88</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>90</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>91</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>92</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>93</b>

## ZIEL DER ARBEIT

Für degenerative retinale Erkrankungen mit einem progredienten Verlust der Photorezeptoren wie beispielsweise die Retinitis pigmentosa oder die altersbedingte Makuladegeneration existieren derzeit keine effektiven Behandlungsmöglichkeiten. Zu den Therapiestrategien, die gegenwärtig intensiv bearbeitet werden, gehört der Ersatz von dysfunktionalen oder degenerierten Photorezeptoren über Zelltransplantationen, die korrektive Gentherapie, die Implantation von elektronischen Sehprothesen, die optogenetische Therapie, und neuroprotektive Therapieansätze. Bei den neuroprotektiven Therapieansätzen wird eine kontinuierliche intraokuläre Applikation von neurotrophen Faktoren dadurch erreicht, indem die Faktoren entweder über viralen oder nicht-viralen Gentransfer in endogenen retinalen Zellen exprimiert werden, oder indem genetisch modifizierte Zellen mit einer ektopischen Expression solcher Faktoren intraokulär transplantiert werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen einer Stammzell-basierten, kontinuierlichen intraokulären Applikation von neurotrophen Faktoren auf den Verlauf der Photorezeptordegeneration in einem Mausmodell für Retinitis pigmentosa, der *Pde6b<sup>rd1</sup>* Maus, zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden murine mesenchymale Stammzellen mit polycistronischen lentiviralen Vektoren genetisch so modifiziert, dass sie stabil eine sezernierbare Variante des neuroprotektiven Faktors „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF) exprimierten. CNTF ist ein Mitglied der Interleukin-6 (IL-6) Familie und weist eine starke neuroprotektive Wirkung auf Photorezeptoren und retinale Ganglienzellen auf. Stabil CNTF-exprimierende mesenchymale Stammzellen wurden selektioniert und kloniert, und das neuroprotektive Potential von klonalen Zelllinien mit der stärksten CNTF Expression wurde in der *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mausmutante analysiert. Dazu wurden die modifizierten mesenchymalen Stammzellen zu Beginn der Photorezeptordegeneration intravitreal in das Mausmodell transplantiert und die Auswirkungen der transplantierten Zellen auf die Degenerationskinetik der Photorezeptoren analysiert. Als Negativkontrolle wurden mesenchymale Stammzellen intravitreal in die *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutante transplantiert, die mit einem lentiviralen Kontrollvektor transduziert wurden.

# 1 Einleitung

Bei der Behandlung von degenerativen Erkrankungen des Nervensystems stehen Wissenschaft und Medizin vor großen Herausforderungen, denn das Nervensystem hat zusammen mit wenigen anderen Geweben nur eine sehr begrenzte Fähigkeit zu autologen Reparatur- und Regenerationsmechanismen. Die meisten Schädigungen sind irreversibel und führen zu einem permanenten Funktionsverlust. Die Parkinson-Krankheit, die Alzheimer-Krankheit (Morbus Alzheimer) und der sogenannte „Veitstanz“ (Morbus Huntington) sind neurodegenerative Erkrankungen, bei denen es zu einer kontinuierlichen und irreversiblen Degeneration spezifischer Nervenzellen (dopaminerge, GABAerge und cholinerge Neuronen) kommt. Klassische Krankheitssymptome sind zunehmende Einschränkungen der Bewegungs- und Empfindungsmöglichkeit sowie der geistigen Funktion. Fortschritte sind in der Früherkennung dieser neurodegenerativen Erkrankungen zu verzeichnen, insbesondere durch die funktionelle Bildgebung (Morbus Parkinson) und genetische Untersuchungen (Morbus Huntington). Dennoch mangelt es an effektiven, sicheren und langfristig wirksamen Behandlungsstrategien.

Auch der Sehvorgang im Auge verläuft ausschließlich über ein komplexes Netzwerk von Nervenzellen. Die hereditären Netzhautdystrophien gehören zu den degenerativen retinalen Erkrankungen mit einem progredienten Verlauf und einer fortschreitenden Degeneration der lichtempfindlichen Photorezeptoren, die schließlich unweigerlich zur Erblindung führt. Das klinische Erscheinungsbild dieser Erkrankungen ist äußerst heterogen. Eine Unterteilung der hereditären Netzhautdystrophien ist z.B. durch die Beschreibung des topographischen Beginns der Photorezeptordegeneration möglich. Man unterscheidet Dystrophien mit peripherem (z.B. Retinitis pigmentosa, Atrophia gyrata) oder zentralem Beginn (z.B. Zapfendystrophie, Zapfen-Stäbchen-Dystrophie), regional begrenzte Netzhautdystrophien (z.B. Morbus Best, Morbus Stargardt) und Netzhautdystrophien als Bestandteil von übergeordneten Syndromen (z.B. Bardet-Biedl-Syndrom, Refsum-Syndrom). Für hereditäre Netzhautdystrophien existieren abgesehen von einigen durch

Stoffwechselstörungen bedingten Erkrankungen zum jetzigen Zeitpunkt keine effektiven Behandlungsmethoden.

Zu den Therapieansätzen für eine Behandlung hereditärer Netzhautdystrophien, an denen gegenwärtig intensiv geforscht wird, gehören die Inhibition proapoptischer Faktoren oder die Applikation von antiapoptischen Faktoren, die eine Degeneration von Photorezeptoren und anderen retinalen Zelltypen verlangsamt (Bennett et al., 1998; Cayouette et al., 1998; Chen et al., 1996; LaVail et al., 1998). Zu den weiteren therapeutischen Strategien gehören eine kontinuierliche intraokuläre Applikation von neuroprotektiven Faktoren (Tao, 2006; Tao et al., 2002), die korrektive Gentherapie (Acland et al., 2001; Ali et al., 2000; LaVail et al., 2000; Lewin et al., 1998; Vollrath et al., 2001), optogenetische Therapieansätze (Bi et al., 2006; Zhang et al., 2009), Zellersatzstrategien durch Transplantation von Zellen oder Geweben (Baker und Brown, 2009; Ben-Hur und Goldman, 2008; Conti et al., 2008; Suter und Krause, 2008) und intraokuläre Implantationen von elektronischen Sehprothesen (Zrenner et al., 2011).

In Bezug auf zellbasierte Therapieansätze hat sich das wissenschaftliche Interesse überwiegend auf induzierte pluripotente Stammzellen (Buchholz et al., 2009; Hiramani et al., 2009; Meyer et al., 2009; Parameswaran et al., 2010), embryonale Stammzellen (Aoki et al., 2006; Banin et al., 2006; Haruta et al., 2004; Idelson et al., 2009; Klimanskaya et al., 2004; Lamba et al., 2006; Lu et al., 2009; Meyer et al., 2009; Nistor et al., 2010; Osakada et al., 2009a; Vugler et al., 2007) und gewebespezifische Stammzellen (Das et al., 2006; Zhang et al., 2003; Zhang et al., 2004; Zhang und Wang, 2010) fokussiert. Dabei ist ein therapeutischer Einsatz von Stammzellen prinzipiell auf zwei Arten möglich. Eine Möglichkeit stellt die Zellersatzstrategie dar. Das Ziel dieser Therapieform ist es, von *in vitro* expandierten Stammzellen die jeweils benötigten therapeutisch relevanten Zelltypen abzuleiten und anschließend durch Transplantation dieser Zellen abgestorbene oder dysfunktionale endogene Zellen zu ersetzen (Baker und Brown, 2009; Ben-Hur und Goldman, 2008; Conti et al., 2008; Suter und Krause, 2008). Die zweite therapeutische Anwendungsmöglichkeit von Stammzellen stellt die *ex-vivo*-Gentherapie dar

(Chen et al., 2007; Dwain et al., 2006; Gregory-Evans et al., 2009; Jung et al., 2013; Li et al., 2006; Mapara et al., 2007). Hierbei werden die Stammzellen gentechnisch manipuliert und anschließend *in vitro* expandiert, um sie dann als „zelluläre Vektoren“ einzusetzen, um so therapeutisch wirksame Genprodukte in erkrankte Gewebe einzuschleusen.

## 1.1 Stammzellen

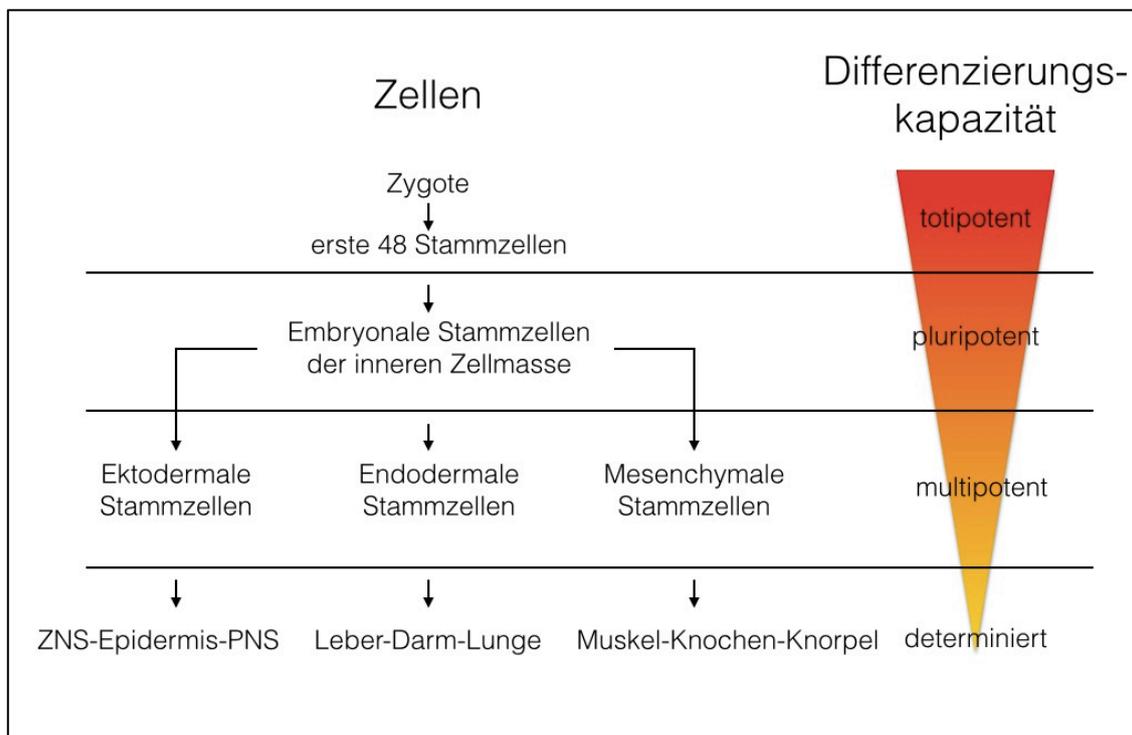
Seit je her verfolgen Wissenschaft und Medizin das Ziel, Erkrankungen des Menschen im Sinne einer Regeneration mit vollständiger Wiederherstellung der Funktion zu heilen. In der Vergangenheit konnte dieses Ziel nur sehr begrenzt erreicht werden. Zu komplex sind die Vorgänge in den menschlichen Organen, um sie mit den momentan zu Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten zu reparieren oder gar zu ersetzen. Mit der Entdeckung, Charakterisierung und intensiven Erforschung von Stammzellen ist die Hoffnung verknüpft, effektivere Behandlungsmöglichkeiten für eine Vielzahl bisher nicht oder kaum behandelbarer Erkrankungen entwickeln zu können.

Stammzellen sind Zellen von einem Embryo, Fötus oder einem erwachsenen Individuum, welche in der Lage sind, sich für einen längeren Zeitraum durch symmetrische oder asymmetrische Mitosen zu reproduzieren (Doe et al., 1998; Gage, 1998; McKay, 1997). Außerdem sind Stammzellen in der Lage, in einen oder mehrere spezialisierte Zelltypen zu differenzieren (Bryder et al., 2006). Bei den multipotenten gewebespezifischen Stammzellen handelt es sich dabei um die Zelltypen des jeweiligen Gewebes, aus dem die jeweilige Stammzelle entstammt (Morrison et al., 1997; Stemple und Anderson, 1992). Dagegen können aus den pluripotenten embryonalen Stammzellen (ES Zellen) (Thomson et al., 1998) oder induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS Zellen) alle Zelltypen des Körpers hervorgehen (Doe et al., 1998; Gage, 1998; McKay, 1997; Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Temple, 2001b; Yu et al., 2007). Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die in der Lage sind, sich über längere Zeiträume zu teilen, ohne dabei zu differenzieren (Grafi und Avivi, 2004). Wenn bei der Mitose zwei neue Stammzellen hervorgehen, spricht man

von einer symmetrischen Teilung. Wenn bei der Mitose eine Stammzelle und eine differenziertere Tochterzelle hervorgeht, spricht man von einer unsymmetrischen Teilung, wobei eine der Tochterzellen nicht mehr das vollständige Differenzierungspotential der Ausgangszelle besitzt. Die Tochterzelle verliert die Teilungsfähigkeit und differenziert in verschiedene spezialisierte Zelltypen. Hierdurch lässt sich eine wichtige Funktion der Stammzelle ableiten: Wachstum und Erneuerung von Zellen, welche durch Alter, Krankheit, oder Verletzungen absterben. Nur wenige Zelltypen können auf diese Weise im Säuger-Organismus kaum oder gar nicht ersetzt werden. Hierzu gehören beispielsweise die meisten Nervenzelltypen und die Herzmuskelzellen.

Stammzellen lassen sich nach ihrem Differenzierungspotential unterscheiden. Dieses korreliert direkt mit dem ontogenetischen Alter dieser Zellen (Abb.1). So unterscheidet man zwischen Zygote, embryonalen Stammzellen und adulten oder gewebespezifischen Stammzellen. Der klassische Weg der Zellentwicklung beginnt mit der Zygote. Die Zygote ist eine totipotente Zelle. Aus ihr können sich alle Zellen eines Embryos sowie Zellen, die nicht zum eigentlichen Embryo gehören (Trophoblast), entwickeln (Abb.1). Aus der Zygote entwickelt sich durch Zellteilung die Blastozyste. Aus der inneren Zellmasse der Blastozyste lassen sich die Embryonalen Stammzellen (ES) gewinnen. Bei den ES Zellen handelt es sich um sogenannte pluripotente Stammzellen, die in sämtliche Zelltypen des Körpers mit Ausnahme der Plazenta differenzieren können. Somit ist eine einzige pluripotente Stammzelle in der Lage, Zelltypen aller drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm, Ektoderm) hervorzubringen (Abb.1). Es folgen die multipotenten adulten oder gewebespezifischen Stammzellen (Czyz et al., 2003; Lange et al., 2005). Diese lassen sich aus verschiedenen Geweben des Embryos oder des erwachsenen Organismus isolieren und können in die verschiedenen Zelltypen des jeweiligen Ursprungsgewebes differenzieren. Aus diesen Stammzellen entwickeln sich die Vorläuferzellen, die ein eingeschränktes Selbsterhaltungspotential und Differenzierungspotential aufweisen. So können sich Vorläuferzellen nur noch einige Male teilen, bevor sie endgültig ausdifferenzieren. Sie sind nicht mehr in

der Lage, sämtliche Zelltypen des Ursprungsgewebes zu bilden, sondern können sich nur noch in ganz spezifische Zelltypen differenzieren (Gage, 2000).



**Abb.1: veranschaulicht schematisch das unterschiedliche Differenzierungspotential der verschiedenen Stammzelltypen.**

### 1.1.1 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen in den verschiedenen Geweben und Organen, die sich praktisch ohne Beschränkung teilen können. Im Gegensatz zu den ES Zellen, die nur in einem bestimmten Zeitraum während der Embryogenese vorhanden sind, sind adulte Stammzellen in fast allen Organen zeitlebens vorhanden. Wie bei den ES Zellen entstehen bei asymmetrischen Teilungen von adulten Stammzellen wieder eine Stammzelle und eine Tochterzelle. Die Tochterzelle differenziert sich in eine spezialisierte gewebespezifische Zelle, und ist dann nicht mehr teilungsfähig. Adulte Stammzellen, die nur einen Zelltyp hervorbringen, werden als unipotent bezeichnet. Hierzu gehören z.B. die Basalzellen der Hautepidermis oder die Zellen der Krypten im Dünndarm. Adulte Stammzellen, die in mehrere

verschiedene spezialisierte Zelltypen differenzieren können, werden als multipotent bezeichnet. Hierzu gehören z.B. die hämatopoetischen Stammzellen, aus denen eine Vielzahl verschiedener myeloischer und lymphatischer Zelltypen hervorgehen können. Adulte Stammzellen spielen damit eine wichtige Rolle beim normalen Wachstum und beim Ersatz dysfunktionaler oder degenerierter Zelltypen. Nur wenige Zelltypen können auf diese Weise im Säuger-Organismus nicht ersetzt werden. Hierzu gehören z.B. die meisten Nervenzellen und die Herzmuskelzellen.

Adulte Stammzellen sind für therapeutische Anwendungen auch deswegen von Interesse, da hier anders als bei ES Zellen keine ethischen oder juristischen Einwände bestehen. Adulte Stammzellen sind in fast allen Organen nachweisbar, wie beispielsweise Fettgewebe, Knochengewebe, Zahnpulpa, Knorpel, Knochenmark, peripheres Blut, Gehirn, Hautepithel, Verdauungsapparat, Cornea, Blutgefäße, Retina, Leber und Skelettmuskel. Zudem existieren für viele dieser Stammzellen Protokolle für die Isolation, Kultivierung und Differenzierung in gewebespezifische Zelltypen.

Eine große Welle der Euphorie über mögliche therapeutische Einsatzmöglichkeiten von adulten Stammzellen basierte auf einer Vielzahl von Veröffentlichungen, die den adulten Stammzellen eine Transdifferenzierung zusprachen. Nach diesen Publikationen sollte sich das Differenzierungspotential bestimmter adulter Stammzellen nicht nur auf die Zelltypen des jeweiligen Ursprungsgewebes beschränken. Vielmehr sollten diese Zellen das Potential aufweisen, auch in Zelltypen anderer Gewebe und sogar anderer Keimblätter zu transdifferenzieren (Alison et al., 2000; Austin und Lagasse, 2003; Bjornson et al., 1999; Brazelton et al., 2000; Krause et al., 2001; Lagasse et al., 2000; Mezey et al., 2000; Morrison, 2001; Raff, 2003; Schwartz et al., 2002). Diese Eigenschaften wurden unter anderem auch mesenchymalen Stammzellen zugesprochen, die aus therapeutischer Sicht besonders interessant sind, da sie sich einfach isolieren lassen und damit potentiell auch für autologe Transplantationen interessant sind. Im direkten Gegensatz dazu stehen Publikationen, die *in vivo* und *in vitro* zu dem Ergebnis kommen, dass es sich bei der Veränderung der Stammzellen nicht um eine

“Trans-Differenzierung“, sondern um eine spontane Zellfusion handelt (Alvarez-Dolado et al., 2003; Terada et al., 2002; Vassilopoulos und Russell, 2003; Wang et al., 2003; Ying et al., 2002). Friedenstein et al. legten 1966 mit der Identifizierung fibroblastenartiger Zellen des Knochenmarkes, die bei der Kultivierung *in vitro* undifferenziert blieben und in Zellen des Stütz- und Bindegewebes differenziert werden konnten, den grundlegenden Meilenstein in der Erforschung adulter Stammzellen (Friedenstein et al., 1966).

#### **1.1.1.1 Neurale Stammzellen**

Als neurale Stammzellen (NSZs) bezeichnet man multipotente Zellen, die aus dem Gehirn von Säugetieren gewonnen werden und die sich in die verschiedenen Zelltypen des Nervensystems differenzieren können. Hierzu gehören die Neurone, die Astrozyten und die Oligodendrozyten (Gage, 2000). Diese Stammzellen liegen nicht in allen Arealen des Gehirns, es gibt vielmehr Regionen, die bevorzugt diese Zellen enthalten. Zu diesen Regionen zählen die lateralen Wände der Ventrikel und der Hippocampus. Sie sind aber auch im Vorderhirn (Temple, 2001a) oder der Retina (Das et al., 2006) enthalten. Für die Kultivierung dieser Zellen stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Entweder werden diese Zellen als frei schwimmende Zellaggregate, sogenannte Neurosphären (Reynolds und Weiss, 1992), oder als adhärenente Monolayer-Kulturen (Conti et al., 2005) expandiert. Um sie über viele Passagen kultivieren zu können, müssen die Kulturmedien mit Wachstumsfaktoren wie „epidermal growth factor „ (EGF) oder „fibroblast growth factor-2“ (FGF-2) versetzt werden. Um aus den NSZs in die drei Zelltypen des Nervensystems – Astrozyten, Oligodendrozyten und Nervenzellen- abzuleiten, existieren zahlreiche gerichtete Differenzierungsprotokolle, bei denen die Wachstumsfaktoren gegen verschiedene Differenzierungsfaktoren ausgetauscht werden (Gage, 2000; Galli et al., 2003; McKay, 1997).

#### **1.1.1.1 Einsatz von neuronalen Stammzellen bei retinalen Erkrankungen**

Neurale Stammzellen wurden bereits intravitreal, subretinal oder intraretinal in verschiedene Tiermodelle für degenerative retinale Erkrankungen transplantiert, um in diesen Krankheitsmodellen das Integrations- und Differenzierungspotential der Zellen zu analysieren. In vielen dieser Studien wurde ein ausgeprägtes Integrationspotential der transplantierten NSZs in die Empfänger-Netzhäute beobachtet (Van Hoffelen et al., 2003). Obwohl bisher noch nicht vollständig geklärt werden konnte, welche Faktoren diese massive Integration der NSZs fördern, scheint das Alter der Empfängertiere und eine reaktive Astroglie in den Empfänger-Netzhäuten einen Einfluss auf das Integrationspotential zu haben. Eine starke Integration in junge oder erkrankte Netzhäute wurde auch für intravitreal transplantierte NSZs beobachtet, die aus ES Zellen abgeleitet wurden (Banin et al., 2006; Meyer et al., 2006). Obwohl in mehreren Arbeiten Spenderzellen nachgewiesen werden konnten, deren Morphologie eine große Ähnlichkeit zu der endogener retinaler Zelltypen aufwies, fehlen schlüssige Beweise, dass transplantierte NSZs in authentische retinale Zelltypen wie beispielsweise in Photorezeptoren oder in Ganglienzellen differenzieren können (Mellough et al., 2007; Takahashi et al., 1998; Young et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit humanen neuronalen Stammzellen erzielt. Interessanterweise konnte in diesen Versuchen aber beobachtet werden, dass die subretinal transplantierten humanen NSZs in dem „Royal College of Surgeons“ (RCS) Rattenmodell für Retinitis pigmentosa die Degeneration der Photorezeptoren verlangsamten. Wie genau die transplantierten NSZs ihre neuroprotektiven Effekte in diesem Tiermodell ausüben, ist noch unbekannt. Diskutiert wird die Sekretion von endogen exprimierten neurotrophen Faktoren. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit basiert auf der Tatsache, dass die Photorezeptordegeneration in dem RCS Modell durch eine gestörte Phagozytose der Photorezeptoraussensegmente durch die RPE Zellen verursacht wird. Da die humanen NSZs phagozytotische Aktivitäten aufweisen, könnte ihre neuroprotektive Aktivität auch dadurch erklärbar sein, dass sie zumindest teilweise die dysfunktionalen RPE Zellen in der RCS Ratte ersetzen (Gamm et al., 2007; Wang et al., 2008).

### **1.1.1.2 Hämatopoetische Stammzellen**

Das blutbildende System im Knochenmark ist hierarchisch aufgebaut. Am Anfang dieser Hierarchie steht die hämatopoetische Stammzelle (HSZ). Sie ist Ursprung der Hämatopoese. Aus ihr gehen alle Typen des reifen Blutsystems hervor wie z.B. die Leukozyten, die Makrophagen, die Thrombozyten, die Plättchen und die Erythrozyten. Viele dieser Zellen haben eine kurze Lebenszeit und müssen kontinuierlich nachproduziert werden. Durchschnittlich benötigt der Mensch einige Millionen neue hämatopoetische Zellen am Tag (Laird et al., 2008). Die kontinuierliche Nachlieferung dieser Zellen ist Aufgabe der hämatopoetischen Stammzellen, die die einzige Quelle dieser Zellen darstellen.

Von den verschiedenen Zelltypen des blutbildenden Systems sind die HSZs die einzigen Zellen, die die Eigenschaft zur Selbsterhaltung aufweisen. Aus einer HSZ kann eine weiter ausgereifte Vorläuferzelle entstehen. Diese ist noch multipotent und kann in verschiedene spezialisierte Tochterzellen erzeugen. Dieser Zelle folgen in der Entwicklung dann die Linien-spezifischen Vorläuferzellen, wie z.B. für die Leukozyten Linie, die myeloische Linie oder die erythroide Linie.

Die Erforschung der hämatopoetischen Stammzellen begann nach den Atombombenangriffen auf Hiroshima und Nagasaki 1945. Die radioaktive Strahlung hatte unter anderem auch verheerende Auswirkung auf das hämatopoetische System. Bei den Exponierten waren in den ersten Tagen nur geringe Schädigungen am Zentralnervensystem und dem Gastrointestinaltrakt festzustellen. Sechs bis zehn Tage nach der Strahlenexposition war dann aber der Höhepunkt einer schweren Panzytopenie erreicht, welche eine 100%ige Letalität zur Folge hatte. 1956 konnte gezeigt werden, dass durch Knochenmarkstransplantation eine direkte Regeneration des blutbildenden Systems möglich ist (Marinone und Corso, 1956). Hieraus ergab sich ein Therapiekonzept für Erkrankungen des blutbildenden Systems wie z.B. bei fehlendem Knochenmark, maligne entartetem Knochenmark (z.B. Leukämie),

funktionell defektem Knochenmark oder iatrogen geschädigtem Knochenmark (z.B. nach Radio-/Chemotherapie eines soliden Tumors).

Knochenmarkstransplantation ist mittlerweile ein Synonym für Transplantation für hämatopoetische Stammzellen geworden, obwohl das Knochenmark immer seltener als Quelle für die Gewinnung dieser Zellen dient. Dies liegt an einer invasiven Therapie zur Entnahme dieser Zellen, welche unter Anästhesie durchgeführt werden muss. Bei erwachsenen Personen, bei denen der gesundheitliche Zustand stabil ist, befindet sich die Mehrheit der HSZ im Knochenmark. Eine Mobilisierung dieser Zellen vom Knochenmark in das periphere Blut kann durch Stress, Endotoxine, Chemotherapie (Cyclophosphamid, VP16) oder Zytokine induziert werden. Bei der Zytokin-induzierten Stammzellmobilisierung zeigte das „granulocyte-colony stimulating factor“ (G-CSF) die stärkste Wirkung auf die Mobilisierung dieser Zellen (Thomas et al., 2002). Die Gewinnung der HSZ aus dem peripheren Blut ist für den Spender wesentlich angenehmer als die Gewinnung aus dem Knochenmark. Bei den aus dem Knochenmark mobilisierten Zellen im peripheren Blut handelt es sich um eine Mischung aus HSZ und Vorläuferzellen. Diese Transplantate, welche Verunreinigungen im Sinne ihrer zellulären Bestandteile enthalten, müssen strikt von den tatsächlich reinen MSZ-Transplantaten unterschieden werden, die ausschließlich MSZ und keine weiteren Zelltypen beinhalten. Die „unreinen“ Transplantate erfahren aber eher einen routinemäßigen Einsatz als die „reinen“ Transplantate.

#### **1.1.1.2.1 Einsatz von hämatopoetischen Stammzellen bei retinalen Erkrankungen**

Beim therapeutischen Einsatz von HSZs für retinale Erkrankungen fokussiert sich das Interesse auf die Regeneration des Gefäßkomplexes, der sich an der vitrealen Oberfläche der Netzhaut befindet. Im Vordergrund steht dabei die Rettung von retinalen Neuronen, welche sekundär aufgrund vaskulärer retinaler Erkrankungen (wie z.B. bei der diabetischen Retinopathie) verloren gehen (Friedlander et al., 2007; Otani et al., 2004; Otani et al., 2002). Durch die Injektion von HSZ in das Auge konnte die retinale Blutzirkulation verbessert

werden. Auch verlängert sich die Überlebenszeit von äußeren retinalen Neuronen sowie des Sehvermögens in Mausmodellen für ischämische und nicht-ischämische retinale Dystrophien (Otani et al., 2004; Ritter et al., 2006). Zudem existieren Untersuchungen mit Hinweisen darauf, dass HSZs in Empfänger-Netzhäute integrieren, dort neuronal differenzieren, und die äußeren retinalen Zellen ersetzen (Arnhold et al., 2007; Tomita et al., 2002; Wang et al., 2010a)

### **1.1.2 Embryonale Stammzellen**

Embryonale Stammzellen werden aus Blastozysten aus einer Gruppe von Zellen gewonnen, die als innere Zellmasse bezeichnet werden. Diese Zellen sind ein Teil des frühen (4.-5. Tag) Embryos. Humane ES-Zelllinien, die aus der inneren Zellmasse gewonnen wurden, sind keine *in vitro* Äquivalente zu den entsprechenden Zellen *in vivo*. Werden die Zellen in Zellkultur gehalten, sind sie extrinsischen Einflüssen ausgesetzt, die die Genexpression und somit die Eigenschaften dieser Zellen verändern. Aus diesem Grund müssen ES Zellen als ein Artefakt der Zellkultur angesehen werden, welche Gemeinsamkeiten zu frühen Keimzellen und primitiven Ektoderm haben (Zwaka und Thomson, 2005b).

Die zwei besonderen Merkmale der ES Zellen sind ihre Pluripotenz und ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Dies bedeutet, dass diese Zellen bei der Teilung die Fähigkeit haben Kopien von sich selbst herzustellen, ohne dabei zu differenzieren. Diese Eigenschaft weisen diese Zellen *in vivo* allerdings nur über einen kurzen Zeitraum auf. Mit dem Begriff Pluripotenz wird die Fähigkeit von ES Zellen zusammengefasst, in Zelltypen aller drei Keimblätter und in alle Zelltypen des Körpers differenzieren zu können, selbst nach Monate langer Haltung in Kultur (Amit et al., 2000; Thomson et al., 1998; Zwaka und Thomson, 2005a).

Die Gewinnung von murinen ES (mES) Zellen wurde erstmals 1981 von Evans und Kaufmann (Evans und Kaufman, 1981) sowie von Martin (Martin, 1981) beschrieben. Die Isolierung und Kultivierung von humanen ES (hES) Zellen

gelang etwa 20 Jahre später Thomson und Mitarbeitern (Thomson et al., 1998). Die erfolgreiche Kultivierung von hES Zellen basierte auf Erkenntnissen aus der Erforschung von ES Zelllinien von Rhesusaffen (Thomson et al., 1995) und Zwergseidenäffchen (Thomson et al., 1996).

Humane ES Zellen, die bei experimentellen Versuchen eingesetzt werden, stammen in der Regel von Spendern aus künstlichen Befruchtungen. Da bei der künstlichen Befruchtung mehrere Eizellen befruchtet werden, entstehen dabei „überzählige“ entwicklungsfähige Embryonen, die als Quelle für hES Zellen genutzt werden. Ethische und moralische Aspekte bei dieser Art der hES Zell-Gewinnung werden kontrovers diskutiert (Daley et al., 2007; Gruen und Grabel, 2006), da hierbei ein menschlicher Embryo zerstört wird. In Deutschland verbietet der Gesetzgeber die Erzeugung und Tötung von Embryonen für die Gewinnung von embryonalen Stammzellen. Aus diesem Grund werden in Deutschland keine hES Zelllinien hergestellt. Eine andere Möglichkeit, hES Zelllinien zu etablieren, basiert auf der Präimplantationsdiagnostik. Hierbei wird an dem frühen Embryo, der sich noch außerhalb des Mutterleibes befindet, eine Untersuchung auf eventuelle genetische Schädigungen vorgenommen. Nach einem Protokoll von Robert Lanza (Klimanskaya et al., 2006) entnimmt man der Blastozyste im 8-Zell Stadium eine Zelle, aus der man wieder eine eigene Zelllinie gewinnt, ohne dass die Spender-Blastozyste hierbei getötet wird. In Deutschland gilt die juristische Auffassung, dass das Verfahren der Präimplantationsdiagnostik sich nicht in Einklang mit dem Embryonenschutzgesetzes (ESchG) bringen lässt. Daher wird auch dieses Verfahren in Deutschland nicht angewendet. Da außerdem ethisch-moralische Einwände gegen den Gebrauch dieser Zellen erhoben werden, ist auch das Arbeiten mit diesen Zellen in Deutschland abgesehen von streng geregelten Ausnahmen gesetzlich verboten. So besagt das deutsche Stammzellgesetz, dass nur embryonale Stammzelllinien, die bis zum 1. Mai 2007 erzeugt wurden, aus dem Ausland eingeführt werden dürfen. Mit diesen Zellen darf in Deutschland unter der Voraussetzung gearbeitet werden, dass tierische embryonale Stammzellen für die geplanten Arbeiten nicht als Forschungsobjekte ausreichen oder sich nicht eignen

(Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 1990). Obwohl theoretisch das therapeutische Potential von ES Zellen aufgrund ihrer Pluripotenz und Fähigkeit zur Selbsterhaltung nahezu unbegrenzt erscheint, gibt es bei der praktischen Anwendung dieser Zellen erhebliche Einschränkungen:

Da die Zellen nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Embryogenese gewonnen werden können, stehen diese Zellen nicht sofort für die jeweilige Behandlung zur Verfügung.

Sollte der Empfänger der hES einen anderen genetischen Code haben als der Spender der hES, lassen sich nach Zelltransplantationen Immunreaktionen nicht ausschließen.

Die hohe proliferative Aktivität und Pluripotenz von ES Zellen birgt gleichzeitig die Gefahr des unkontrollierten Wachstums. Daher besteht das Risiko von Teratombildungen bei der Anwendung von hES Zellen (Arnhold et al., 2004; Erdo et al., 2003).

Für die Wissenschaft sind diese Zellen trotz dieser Einschränkungen und Risiken von großer Bedeutung. So sind diese Zellen nicht nur für Zellersatzstrategien von potentieller Bedeutung, sondern eignen sich auch, um Pathomechanismen von Erkrankungen auf zellulärer und molekularer Ebene zu untersuchen („disease modeling“) oder um die Wirkung von Medikamenten zu analysieren.

#### **1.1.2.1 Einsatz von embryonalen Stammzellen bei retinalen Erkrankungen**

Für die Entwicklung ES Zell-basierter Zellersatzstrategien ist es notwendig, die hoch proliferativen und undifferenzierten Zellen *in vitro* kontrolliert in die jeweils therapeutisch relevanten Zelltypen differenzieren zu können. Eine große Rolle spielt hierbei die Simulierung der molekularen Umgebung, in welcher diese Zellen während der normalen Embryogenese eingebettet sind. Die ES Zellen sollen durch diese Simulationen die notwendigen morphogenetischen Veränderungen durchlaufen, die sie auch bei der natürlichen Entwicklung während der Embryogenese durchlaufen würden. Das Ziel ist dabei, in der

Zellkultur differenzierte Zellen zu generieren, die den entsprechenden Zelltypen *in vivo* möglichst ähnlich sind.

Die Forschung hat mittlerweile erhebliche Fortschritte gemacht, wenn es um das Verständnis der Stimuli zur Differenzierung von ES Zellen in retinale Neurone und Photorezeptor Vorläuferzellen *in vitro* geht. Erfolgreiche Protokolle existieren bereits für murine ES Zellen (Hirano et al., 2003; Ikeda et al., 2005; Osakada et al., 2008; Osakada et al., 2009a; Sugie et al., 2005) und humane ES Zellen (Aoki et al., 2006; Banin et al., 2006; Lamba et al., 2006; Meyer et al., 2009; Nistor et al., 2010; Osakada et al., 2008; Osakada et al., 2009a; Osakada et al., 2009b). Auch für die Differenzierung von ES Zellen in retinale Pigmentepithelzellen (RPE Zellen) existieren bereits Protokolle für murine ES Zellen (Kawasaki et al., 2002) und humane ES Zellen (Idelson et al., 2009; Klimanskaya et al., 2004; Meyer et al., 2009; Osakada et al., 2008; Osakada et al., 2009a). RPE Zellen, die *in vitro* von ES Zellen abgeleitet wurde, konnten bereits erfolgreich in Tiermodellen mit dysfunktionalen RPE angewendet werden. Nach subretinalen Transplantationen von ES Zell-abgeleiteten RPE Zellen integrierten die Spenderzellen in das Empfänger-RPE und differenzierten in funktionale RPE Zellen, die eine in diesen Tiermodellen normalerweise stattfindende Degeneration von Photorezeptoren verhindern konnten (Haruta et al., 2004; Lu et al., 2009). Bemerkenswerterweise wurden bei Analysen von Empfängeräugen 220 Tage nach subretinalen Injektionen von aus ES Zellen abgeleiteten RPE Zellen in einem Ratten-Modell keine Tumorformationen festgestellt (Lu et al., 2009). Dennoch gibt es zur Zeit keine Untersuchungen, die eindeutige Beweise für die Ableitung von voll funktionsfähigen RPE Zellen aus ES Zellen liefern, welche für eine vollständige Reparatur der Retina benötigt werden (Vugler et al., 2007). Abgesehen von technischen Schwierigkeiten und den ethischen Debatten stehen noch die Risiken von immunologischen Abstoßungsreaktionen bei der Transplantation von Zellen allogener Herkunft im Raum, die zu den limitierenden Faktoren bei dem therapeutischen Einsatz von humanen ES Zellen zu zählen sind.

### **1.1.3 Induzierte pluripotente Stammzellen**

In einer bahnbrechenden Arbeit konnten über die ektopische Expression von vier Transkriptionsfaktoren Fibroblasten der Haut in pluripotente Stammzellen reprogrammiert werden, die Eigenschaften aufweisen, die denen von ES Zellen stark ähneln (Takahashi und Yamanaka, 2006). Für mögliche therapeutische Anwendungen haben solche reprogrammierten, sogenannten „induzierten pluripotenten Stammzellen“ (iPS Zellen) eine nicht abzusehende Bedeutung. Zum einen ist man bei der Forschung an pluripotenten Stammzellen nicht mehr auf ES Zellen angewiesen und kann so die ethischen/moralischen Bedenken umgehen, die gegen den Einsatz dieser Zellen bestehen. Da man inzwischen verschiedenste, leicht zu isolierende terminal differenzierte Zelltypen in iPS Zellen reprogrammieren kann, ist es außerdem möglich, pluripotente Zellen von Patienten herzustellen. Diese Option ermöglicht ein „disease modeling“ mit bisher nicht oder nur schwer zu beschaffenden humanen Zelltypen. Außerdem eröffnet diese Technik, „drug screenings“ an Patientenzellen durchzuführen. Schließlich kann über den Einsatz körpereigener iPS Zellen bei Zellersatzstrategien das Problem der Immunreaktion durch autologe Transplantationen vermieden werden.

#### **1.1.3.1 Einsatz von induzierten pluripotenten Stammzellen bei retinalen Erkrankungen**

In Tiermodellen wurden aus iPS Zellen abgeleitete RPE-artige Zellen in den subretinalen Raum der Retina transplantiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zellen über lange Zeiträume in den Empfänger-Netzhäuten überleben und typische Marker für RPE Zellen exprimieren. Bemerkenswerterweise konnte in Tiermodellen, in denen Photorezeptoren aufgrund von RPE Defekten degenerieren, eine signifikante Protektion der endogenen Photorezeptoren durch die transplantierten RPE Zellen beobachtet werden (Buchholz et al., 2009; Hiramani et al., 2009; Meyer et al., 2009; Parameswaran et al., 2010).

Durch die Ableitung von photorezeptorartigen Zellen aus ES entwickelte sich auch das Differenzierungsprotokoll für photorezeptorartige Zellen aus iPS (Branford und Yost, 2002; Hiramani et al., 2009; Ikeda et al., 2005; Osakada et al., 2008; Osakada et al., 2009a; Parameswaran et al., 2010). Es handelt sich hierbei um Zellen *in vitro*, welche in vielen Aspekten phänotypisch Photorezeptoren ähneln. Die Entwicklung von „echten“ Photorezeptoren erweist sich *in vitro* als äußerst schwierig. Photorezeptoren befinden sich in der äußeren nukleären Schicht der äußeren Retina, wo sie dicht gepackt aneinander liegen. Ihr inneres Segment hat über tight junctions Verbindung zu Müller Zellen. Die Außensegmente liegen dem RPE an. Die Differenzierung von Photorezeptoren *in vivo* wird durch den direkten Kontakt von benachbarten Zellen beeinflusst und kann daher nicht ohne weiteres *in vitro* simuliert werden. Allerdings sind für therapeutische Zellersatzstrategien Photorezeptor-Vorläuferzellen deutlich geeigneter als terminal ausdifferenzierte Photorezeptoren. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass subretinal transplantierte postmitotische Photorezeptor-Vorläuferzellen aus der sich entwickelnden Retina in gesunde und dystrophe Netzhäute integrieren, wo sie in authentische und funktionelle Photorezeptoren differenzieren (Bartsch et al., 2008; Kwan et al., 1999; Lakowski et al., 2011; MacLaren et al., 2006; Pearson et al., 2012).

Im einem klinischen Szenario wäre das Ziel, autologe Photorezeptoren aus iPS Zellen des erkrankten Individuums abzuleiten. Bei genetisch bedingten Erkrankungen würden die so abgeleiteten Zellen den genetischen Defekt tragen. Es besteht die Möglichkeit, Gendefekte in iPS Zellen über gentherapeutische Ansätze zu reparieren (Dimos et al., 2008; Hanna et al., 2007; Wernig et al., 2008). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass aus iPS Zellen abgeleitete Photorezeptor-Vorläuferzellen in Zapfen und Stäbchen Photorezeptor-Vorläufer hervorbringen, welche in der Lage sind, in dystrophe Netzhäute zu integrieren und Synapsen mit endogenen retinalen Nervenzellen auszubilden. Hierdurch konnte eine teilweise Reparatur nicht nur der retinalen Morphologie sondern, auch der retinalen Funktion erreicht werden (Homma et al., 2013; Lamba et al., 2010; Tucker et al., 2011).

#### **1.1.4 Mesenchymale Stammzellen**

Aufgrund seiner Versuche mit Injektionen von Anillin-Farbstoff stellte Conheim bereits 1867 die Vermutung auf, dass Zellen mit fibroblastoider Morphologie auch außerhalb von hämatopoetischen Geweben zu finden sind. Mittlerweise konnten mesenchymale Stammzellen (MSZs) im Knochenmark und im Fett- und Bindegewebe von erwachsenen Menschen nachgewiesen werden (Friedenstein et al., 1966; Nakahara et al., 2005; Sampath et al., 1984; Somerman et al., 1987). Weiterhin konnten MSZs auch im Fruchtwasser, in der Plazenta, im Nabelschnurblut oder in Venen (Erices et al., 2003; In 't Anker et al., 2003; Panepucci et al., 2004) identifiziert werden. Weiterhin findet man diese Zellen in fötalen Geweben wie z.B. dem Knochenmark, dem Blut, der Leber, der Milz und der Lunge (Campagnoli et al., 2001; Gotherstrom et al., 2003; In 't Anker et al., 2003).

MSZs sind in der Lage, in Knochen, Knorpel, Muskel, Knochenmark-Stroma, Sehnen, Fett und andere Bindegewebe zu differenzieren. In der Klinik stellen Knochenmarksaspirate eine einfach zugängliche Quelle für Knochenmarkstammzellen dar. Thrombozytenreiches Plasma in Kombination mit MSCs aus dem Beckenkamm wird erfolgreich zur Therapie von Knochendefekten eingesetzt (Yamada und Ueda, 2006).

Da diese Zellen fast überall im Körper zu finden sind, stellt sich die Frage, was die natürliche Funktion der MSZs ist und wo sich die Nische dieser Zellen im Körper befindet. Neueste Erkenntnisse und klinische Erfahrungen deuten an, dass MSZs natürlicherweise als perivaskuläre Zellen anzutreffen sind und zusammenfassend ggf. als Perizyten bezeichnet werden sollten (Crisan et al., 2008). Diese Zellen finden sich vor allem an Verletzungsstellen, wo sie große Mengen von bioaktiven Faktoren abgeben, welche sowohl immunregulatorische wie auch trophische Funktionen haben. Die immunmodulatorischen Eigenschaften der MSZs inhibieren die Aktivität von Lymphozyten in den geschädigten Geweben und verhindern so überschießende Reaktionen des Immunsystems. Die trophische Aktivität inhibiert eine durch Ischämie oder andere Ursachen induzierte Apoptose und Vernarbung. Außerdem können MSZs eine stimulierende Wirkung auf die Angiogenese und die Proliferation

von gewebespezifischen Vorläuferzellen ausüben. Aufgrund dieser verschiedenen Eigenschaften wird gegenwärtig das therapeutische Potential von MSZs bei einer Vielzahl sehr unterschiedlicher Erkrankungen intensiv untersucht (Caplan, 2008).

Auffällig bei den Untersuchungen der MSZ ist, dass zwar alle Forschungsgruppen die gleichen Zellen untersuchen, aber unterschiedliche Protokolle für die Isolierung und Kultivierung der MSZs benutzen. Auch bezüglich der Nomenklatur dieser Zellen besteht keine Einigkeit. So untersuchen einige Forschungsgruppen „marrow stem cells“ und stellen diese mit „mesenchymal stem cells“ oder „mesenchymal progenitor cells“ gleich. Die intensive internationale Forschung an mesenchymalen Stammzellen erfordert eine einheitliche Definition dieser Stammzellen. Deshalb hat die „Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) Kriterien festgelegt, über die MSZs definiert werden (Abb.2). So müssen die Zellen auf Kulturplastik adhärent wachsen, wenn sie unter Standardkulturbedingungen gehalten werden. Außerdem werden MSZs durch die Expression von CD105, CD73 und CD90 definiert. Eine Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR Oberflächenmoleküle spricht gegen eine Charakterisierung als MSZs. Schließlich müssen MSZs *in vitro* in der Lage sein, in Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten zu differenzieren (Dominici et al., 2006).

## Kriterien zur Charakterisierung von MSCs nach ISCT

### Plastikadhärenz bei Kultivierung unter Standardbedingungen.

Phänotyp	positiv ( ≥95%+)	negativ ( ≤2%+)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 oder CD11b
		CD97a oder CD19
		HLA-DR

*In vitro* Differenzierung in Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten, wobei die Zelltypen über die Expression Zelltyp-spezifischer Antigene identifiziert werden.

Abb.2: Kriterien zur Charakterisierung von MSCs nach ISCT.

#### 1.1.4.1 Anwendungen von mesenchymalen Stammzellen in der Medizin

Begriffe wie „tissue engineering“ und „regenerative Medizin“ beschreiben den Versuch, komplexe Gewebe und Organe in der Zellkultur zu generieren. Das Ziel besteht in der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für Patienten mit schweren Verletzungen oder chronischen Erkrankungen, bei denen die körpereigene Heilung nicht in der Lage ist, das beschädigte Gewebe oder Organ funktionell zu ersetzen. Dabei verfolgt das „tissue engineering“, Gewebe und Organe durch den Einsatz von Zellen und Biomolekülen zu rekonstruieren. Die „regenerative Medizin“ befasst sich mit den Selbstheilungsfähigkeiten des menschlichen Körpers und dem therapeutischen Einsatz von Stammzellen.

Zahlreiche Studien zeigen, dass MSZs vielversprechende Zellen für zellbasierte Therapieansätze sind. Transplantationen von MSZs aus dem Knochenmark gelten als sicher und ihr therapeutisches Potential konnte weltweit in klinischen Untersuchungen bei kardiovaskulären (Ripa et al., 2007; Ripa et al., 2013) neurologischen (Baek et al., 2013) und immunologischen Erkrankungen (Lazarus et al., 2008) durch vielversprechende Ergebnisse bestätigt werden.

#### **1.1.4.2 Einsatz von mesenchymalen Stammzellen bei retinalen Erkrankungen**

Nach subretinalen Transplantationen von MSZs in mit einem ND:Yag Laser geschädigte Augen der Ratte konnte eine Verbesserung im Heilungsverlauf und in der retinalen Funktion gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Zhang et al., 2003). Dieselben Autoren kommen auch zu dem Ergebnis, dass ein Teil der transplantierten MSZs in Retina-artige Zelltypen differenziert, wobei das Differenzierungsverhalten davon abhängig war, ob die Zellen in gesunde oder in ND:Yag Laser geschädigte Augen transplantiert wurden (Zhang et al., 2004). Außerdem konnte nach Transplantationen von GFP-transduzierten MSZs in eine Rhodopsin knockout ( $\rho(-/-)$ ) Maus ein positiver Einfluss der Spenderzellen auf die Überlebensdauer der Photorezeptoren festgestellt werden. Zudem wurde eine Differenzierung der transplantierten MSZs in RPE-artige Zellen beobachtet (Arnhold et al., 2007). Auch Xenotransplantationen von Maus MSZs in den subretinalen Raum von Kaninchen nach einer Laserkoagulation der Retina stimulierten die Heilungsprozesse in der geschädigten Retina (Gundorova et al., 2008). Schließlich zeigten MSZs, die subretinal in die RCS-Ratte transplantiert wurden, einen signifikanten neuroprotektiven Effekt auf die Photorezeptoren (Inoue et al., 2007). Die Mechanismen, über die transplantierten MSZs die Degeneration von Photorezeptoren in verschiedenen Tiermodellen zu verlangsamen, sind noch nicht aufgeklärt. Viele Autoren schlagen jedoch vor, dass diese neuroprotektiven Eigenschaften der MSZs vor allem auf die Sekretion von neurotrophen Faktoren zurückzuführen sind. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass MSZs endogen verschiedene neurotrophe Faktoren exprimieren, von denen neuroprotektive Effekte auf retinale Nervenzelltypen bekannt sind, wie „fibroblast growth factor-2“ (FGF-2), „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) oder „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF).

## **1.2 Wachstumsfaktoren**

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Funktionen von allen Zellen des Nervensystems beeinflussen. Die Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren konnte in sich entwickelnden, adulten und dystrophen Netzhäuten und in retinalen Kulturen nachgewiesen werden (Beltran et al., 2005; Bugra und Hicks, 1997; Carwile et al., 1998; Gao und Hollyfield, 1995; Hallbook et al., 1996; Jing et al., 1996; Jomary et al., 1999; Rakoczy et al., 1993). Verschiedene Wachstumsfaktoren, wie „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF), „glial cell line-derived neurotrophic factor“ (GDNF), „fibroblast growth factor-2“ (FGF-2) oder „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF) weisen neuroprotektive Effekte auf Photorezeptoren auf. So konnten in verschiedenen Tiermodellen für hereditäre retinale Degenerationen gezeigt werden, dass die Degeneration von Photorezeptoren durch Applikation dieser Wachstumsfaktoren verlangsamt werden konnte und die retinale Funktion zumindest teilweise erhalten werden konnte (Buch et al., 2007; Chaum, 2003; LaVail et al., 1992; Wen et al., 2012; Wenzel et al., 2005).

### **1.2.1 Ciliary neurotrophic factor**

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Funktion von allen Zellen des Nervensystems beeinflussen. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) gehört zu den am intensivsten untersuchten Wachstumsfaktoren im Zusammenhang von neuroprotektiven Ansätzen bei degenerativen retinalen Erkrankungen. Obwohl eine Inaktivierung des CNTF-Gen bei Mensch und Tier (Masu et al., 1993; Takahashi et al., 1994) keine besonderen Abnormitäten verursacht, hat exogen appliziertes CNTF einen positiven Einfluss auf die Überlebensdauer und Differenzierung von einer Vielzahl von Neuronen des Nervensystems (Sleeman et al., 2000). In der Netzhaut hat CNTF einen starken neuroprotektiven Effekt auf Photorezeptoren (Cayouette und Gravel, 1997; LaVail et al., 1992; LaVail et al., 1998), retinale

Ganglienzellen (Drummond et al., 2014) und retinale Pigmentepithelzellen (RPE Zellen) (Li et al., 2011).

Durch Untersuchungen von intravitreal injizierten rekombinanten Wachstumsfaktoren konnten La Vail und Kollegen (LaVail et al., 1992) bereits 1992 neuroprotektive Effekte von CNTF auf Photorezeptoren in Tiermodellen für degenerative retinale Erkrankungen nachweisen.

Der protektive Effekt von CNTF konnte seitdem in diversen Untersuchungen an einer Vielzahl anderer Tiermodelle für degenerative retinale Erkrankungen bestätigt werden. Zudem konnten neuroprotektive Effekte von CNTF auf retinale Nervenzellen auch in verschiedenen Spezies gezeigt werden, wie beispielsweise der Maus (Bok et al., 2002; Cayouette et al., 1998; Cayouette und Gravel, 1997; LaVail et al., 1998; Liang et al., 2001a; Liang et al., 2001b; Schlichtenbrede et al., 2003), der Ratte (LaVail et al., 1992; Li et al., 2010; Liang et al., 2001a; Tao et al., 2002), der Katze (Chong et al., 1999) und dem Hund (Tao et al., 2002). In den meisten Studien wurde ein neuroprotektiver Effekt von CNTF auf Stäbchen-Photorezeptoren gezeigt. Einige Untersuchungen haben aber auch neuroprotektive Effekte des Cytokins auf Zapfen-Photorezeptoren nachgewiesen (Li et al., 2010; Talcott et al., 2011). Außerdem wurde berichtet, dass CNTF die Regeneration der äußeren Segmente von degenerierenden Zapfen fördert (Li et al., 2010). Somit ist CNTF ein geeigneter neuroprotektiver Faktor für den Aufbau neuroprotektiver Therapieansätze für die Behandlung degenerativer retinaler Erkrankungen. Dennoch gibt es auch Schwierigkeiten bei der therapeutischen Anwendung von CNTF. Ein Problem ist die kurze Halbwertszeit des Protein nach intraokulärer Injektion *in vivo*. So hat CNTF hat eine Halbwertszeit von nur 2,9 Minuten im Plasma nach intravenöser Injektion in Ratten (Dittrich et al., 1994). Zwar wurden in verschiedenen Studien intravitreale Injektionen von rekombinanten CNTF in Tiermodellen für degenerative retinale Erkrankungen durchgeführt, (Chong et al., 1999; LaVail et al., 1992; LaVail et al., 1998), wie erwartet wurden dabei jedoch nur kurzfristige neuroprotektive Effekte beobachtet. So war beispielsweise nach einer einmaligen Injektion von 10µg CNTF für ein Rattenauge ein neuroprotektiver Effekt der Behandlung nur über einen

Zeitraum von weniger als 3 Wochen nachweisbar (Wen et al., 2006). Aufgrund der chronischen Eigenschaft von retinalen Erkrankungen und der kurzen Halbwertszeit von CNTF wären daher häufige intraokuläre Injektionen erforderlich, bei denen dann jedoch mit verschiedenen Komplikationen wie z.B. Endophthalmitis, retinale Hemorrhagie und Katarakt zu rechnen ist (Kauper et al., 2012).

Auch systemische Applikationen scheiden als Methode aus, um neurotrophe Faktoren in neurales Gewebe einzuschleusen, da diese Faktoren gewöhnlich nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke oder die Blut-Retina-Schranke zu passieren (Wen et al., 2012). Die Blut-Retina-Schranke ist ein hochselektiver Filter, über den der Retina Nährstoffe zugeführt und Stoffwechselprodukte abgeführt werden (Cunha-Vaz, 1976). Diese Schutzfunktion verhindert, dass größere Moleküle ihren Weg in die Retina finden. Dies gilt auch für die Molekülgröße von Wachstumsfaktoren, die systemisch verabreicht werden (Tao, 2006).

Die Herausforderung bei der Anwendung von Wachstumsfaktoren bei retinalen Erkrankungen liegt also in der Entwicklung einer Methode, die eine lokale und kontinuierliche Applikation von Wachstumsfaktoren ermöglicht. Aktuelle Ansätze liegen in der intravitrealen Implantation von biologisch abbaubaren Transportvehikeln, die mit Wachstumsfaktoren beladen werden (Andrieu-Soler et al., 2005; Read et al., 2010; Tao, 2006; Tao et al., 2002). Eine alternative Strategie besteht darin, die Wachstumsfaktoren in endogenen retinalen Zellen über einen Gentransfer mit viralen oder nicht-viralen Vektoren zu exprimieren. In Tiermodellen konnten mit diesem Ansatz eindrucksvolle Ergebnisse erzielt werden (Bok et al., 2002; Cayouette et al., 1998; Cayouette und Gravel, 1997; Liang et al., 2001a; Liang et al., 2001b; McGee Sanftner et al., 2001; Miyazaki et al., 2003; Schlichtenbrede et al., 2003). Zu den Nachteilen dieses methodischen Ansatzes gehört allerdings die nicht oder nur begrenzt steuerbare Dosierung des exprimierten neuroprotektiven Faktors. Außerdem ist es nicht möglich, eine solche Behandlung gezielt abubrechen (Wen et al., 2012).

Schließlich wird der Ansatz verfolgt, Zellen *ex vivo* genetisch so zu modifizieren, dass sie bestimmte Wachstumsfaktoren ektopisch exprimieren. Über intraokuläre Transplantationen dieser genetisch modifizierten Zellen wird dann eine kontinuierliche Applikation der Faktoren angestrebt (Gamm et al., 2007; Jung et al., 2013). Diese Methode vermeidet damit eine genetische Modifikation endogener retinaler Zellen. Zudem hat sie den Vorteil, dass die Expressionsstärke des neuroprotektiven Faktors in den genetisch modifizierten Zellen vor der Transplantation gemessen werden kann und so die Menge des sezernierten Faktors im Auge beispielsweise über die Anzahl an transplantierten Zellen in einem bestimmten Rahmen kontrolliert werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es von besonderem Interesse, dass das therapeutische Potential einer zellbasierten kontinuierlichen intraokulären Applikation von CNTF bereits in klinischen Studien an Patienten mit Retinitis pigmentosa oder geographischer Atrophie evaluiert wird. Bei diesen Untersuchungen kommt die sogenannte „encapsulated cell technology“ (ECT) zum Einsatz, die von der Firma Neurotech entwickelt wurde (Tao et al., 2002). Bei der ECT wird eine humane RPE Zelllinie eingesetzt, die genetisch so modifiziert wurde, dass die Zellen CNTF sezernieren. Diese modifizierten RPE Zellen werden in kleine Kapseln eingeschlossen, die dann in den intravitrealen Raum der Patienten implantiert werden. Die Kapseln sind mit semipermeablen Membranen verschlossen, wodurch das überexprimierte CNTF aus den Kapseln in den intravitrealen Raum und zur Netzhaut diffundieren kann. Umgekehrt können aus dem Kammerwasser Nährstoffe zu den verkapselten RPE Zellen gelangen. Weiterhin schützen die Kapseln die modifizierten RPE Zellen vor dem Immunsystem des Empfängers. Schließlich kann vor Implantation der Kapseln *ex vivo* die Menge von sezerniertem CNTF gemessen werden und so definierte Mengen an CNTF in die Augen der Patienten eingebracht werden (Tao, 2006; Tao et al., 2002). In einer retrospektiven Untersuchung konnte gezeigt werden, dass intraokuläre ECT Implantate ein vorteilhaftes pharmakokinetisches Profil für die Behandlung von chronisch degenerativen retinalen Erkrankungen aufweisen. Dabei wurden NT-501 Implantate der Firma Neurotech untersucht. Es wurde festgestellt, dass die

Implantate über einen Zeitraum von mehr als 2 Jahren konstant CNTF produzierten. Im Serum der Probanden konnte weder CNTF, anti-CNTF Antikörper oder Antikörper gegen die eingekapselten Zellen nachgewiesen werden (Kauper et al., 2012).

## 2 Material und Methode

### 2.1 Versuchstiere

Mesenchymale Stammzellen wurden aus dem Knochenmark der Extremitäten einer 4 Monate alten transgenen Maus isoliert, in der das Reporter-gen EGFP unter Kontrolle des humanen Ubiquitin C Promoters exprimiert wird. Alle Transplantationen wurden an *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mäusen durchgeführt. Die *Pde6b<sup>rd1</sup>* Maus-Linie trägt eine Mutation im Gen für die Stäbchen-spezifische cGMP phosphodiesterase-β-Untereinheit (PDEβ), die zu einem Absterben der Stäbchen und in Folge auch zu einem Absterben der Zapfen führt (Bowes et al., 1990). Die Degeneration der Photorezeptoren bei der *Pde6b<sup>rd1</sup>* Maus beginnt etwa postnatal ab Tag 8. Nach 4 Wochen sind alle Photorezeptoren verloren. Die *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutante stellt damit ein Tiermodell für eine rezessive autosomale Retinitis pigmentosa da. Diese Mutation führt auch beim Menschen zu einer retinalen Dystrophie (McLaughlin et al., 1993).

Alle Versuchstiere wurden auf einem C57BL/6J genetischen Hintergrund gezüchtet und in herkömmlichen Käfigen mit freiem Zugang zu Futter und Wasser und in einem 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit Zyklus bei 200lux gehalten. Die *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mäuse wurden homozygot gezüchtet. Zur Genotypisierung der *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mäuse wurde mittels „polymerase chain reaction“ von mit den Primern 5'-CTT TCT ATT CTC TGT CAG CAA AGC-3' (forward primer), 5'-CAT GAG TAG GGT AAA CAT GGT CTG-3' (reverse primer) mit einem anschließenden diagnostischen Verdau mit dem Restriktionsenzym Hha1 gemacht (Chang et al., 2007). Die EGFP-transgenen Mausmutanten

stammten aus Verpaarungen zwischen einem Wildtyp-Tier und einem heterozygot EGFP-transgenen Tier. Sämtliche experimentelle Eingriffe an den Tieren wurden unter Beachtung und Einhaltung der geltenden Tierschutzgesetze durchgeführt.

## **2.2 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen**

EGFP-transgene Spendertiere wurden durch Genickbruch getötet und anschließend auf ein Korkbrett in Rückenlage fixiert. Die Extremitäten wurden durch Kanülen, welche durch die Pfoten gestoßen wurden, körperfern fixiert und die Korkunterlage und die Maus sorgfältig mit Alkohol (80 %) desinfiziert. Mit einer Pinzette wurde im Bereich des unteren Bauches das Fell fixiert und mit der Schere ein Längsschnitt bis durch die Unterhaut gesetzt. Durch diese Öffnung wurde ein Blatt der Schere in Richtung Pfote geführt und Fell samt Haut aufgetrennt. Die Muskulatur samt Knochen wurde von der Unterhaut abpräpariert. Die Pfote wurde nun vom Unterschenkel abgeschnitten. Der Unterschenkel wurde im Bereich der Pfote mit der Pinzette fixiert und gegen den Widerstand des Kniegelenkes überstreckt, bis sich der Unterschenkel aus dem Kniegelenk löste. Die Schere dient hierbei als Widerlager am Oberschenkel. Der Oberschenkel wurde im Bereich der Wirbelsäule gelöst, ohne dabei die Markräume zu eröffnen.

Danach wurde der Knochen mit der Schere an den Enden aufgeschnitten, um die Markräume zu öffnen. Eine 1 ml Spritze wurde mit Medium aufgezogen, die Kanüle in den Knochen geführt, und die Kanüle samt Knochen in ein Röhrchen mit Medium getaucht. Durch abwechselnde Aspirationen und Injektionen wurde dann das Knochenmark aus dem Knochen gewaschen. Vor der Überführung des Mediums mit den Zellen in eine Kulturflasche wurden zunächst mit der Spritze und anschließend mit einer 5ml Stabpipette durch mehrmaliges Auf- und Absaugen die Zellen vereinzelt. Die Kulturflasche wurde dann für 3 Tage in den Brutschrank gestellt und in der Folge das Expansionsmedium alle 3 Tage gewechselt, wobei die Kulturflasche jeweils vorher gründlich mit PBS

ausgespült wurde, um die nicht-adhärenenten Zellen aus der Flasche zu entfernen.

#### **2.4 Expansion der mesenchymalen Stammzellen**

Die in unbeschichteten Kulturflaschen adhärenent wachsenden mesenchymalen Stammzellen wurden jeweils spätestens bei einer etwa 70% Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen von den Kulturflaschen abgelöst, indem das Kulturmedium abgesaugt und die Kulturflaschen anschließend 3x mit PBS gewaschen wurden. Danach wurde für 5 Minuten 0,25% Trypsin auf die Zellen gegeben. Das Trypsin wurde durch Zugabe von Serum-haltigen Expansionsmedium inaktiviert. Die abgelösten Zellen wurden dann in ein 15ml Falconröhrchen überführt und bei 1200rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zell-Pellet durch vorsichtiges Titurieren in Einzelzellen dissoziiert, und die Zellen weiter in unbeschichteten Kulturflaschen mit einer Dichte von  $1,5 - 3 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  Expansionsmedium (siehe 2.8. „Verwendete Lösungen) kultiviert.

#### **2.5 Einfrieren und Auftauen von mesenchymalen Stammzellen**

Zum Einfrieren der Zellen wurden dichte Zellsuspensionen in Expansionsmedium in ein Kryoröhrchen überführt, die Zellsuspension mit einer Endkonzentration von 10% DMSO versetzt, und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend für 3 Tage bei dieser Temperatur gelagert. Zur weiteren Lagerung wurden die eingefrorenen Zellen entweder in eine  $-80^\circ\text{C}$  Truhe oder in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt. Eingefrorene Zellen wurden schnellstmöglich aufgetaut und in Zellkulturflaschen mit Expansionsmedium überführt. Nach 7-10 Tagen wurden die Zellen passagiert und es erfolgte ein Mediumwechsel.

## 2.6 Polycistronische lentivirale Vektoren

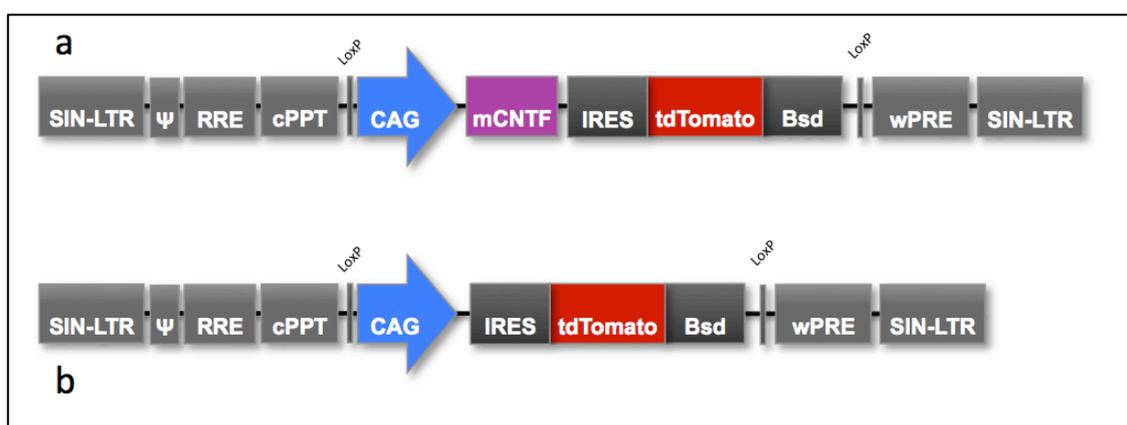
Der offene Leserahmen von Maus CNTF wurde in frame mit der Ig  $\kappa$ -chain Sequenz (Life Technologies) kloniert. Die sezernierbare Variante von CNTF wurde dann in lentiviralen Vektor pCAG-IRES-tdTOMATO/BSD eingebaut. Dieser Vektor basiert auf den lentiviralen „gene ontology“ (LeGO) Vektoren (Weber et al., 2008; Weber et al., 2010). Der resultierende Vektor pCAG-CNTF-IRES-tdTOMATO/BSD kodiert unter regulatorischer Kontrolle des „CMV enhancer/chicken  $\beta$ -actin“ (CAG) Promoters für die sezernierbare CNTF Variante, die „internal ribosome entry site“ (IRES) des Encephalomyocarditis Virus und ein Fusionsgen bestehend aus dem Reporter gen tdTOMATO und dem Resistenzgen Blasticidin (Abb. 3).

## 2.7 Herstellung der lentiviralen Partikel

Zur Herstellung der lentiviralen Partikel zur Transduktion von mesenchymalen Stammzellen wurde die Phoenix-Verpackungszelllinie benutzt, die von „Human Embryonic Kidney-293T-Zellen“ (HEK-293T) abgeleitet ist. Dazu wurden  $2,5 \times 10^6$  Phoenix-Zellen in  $150\text{cm}^2$  Kulturflaschen ausgesät. Die Phoenix-Zellen wurden dann für einen Tag in einem DMEM-Glutamax Medium mit 10% FCS, 20mM HEPES, 1mM Natriumpyruvat und Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Die Transfektion der Phoenix-Zellen mit den lentiviralen Vektoren (Abb.3), dem Gag/Pol-Plasmid (pMDLg/pRRE), dem Rev-Plasmid (pRSV-Rev) und dem Hüllprotein-Plasmid (Eco-Env) erfolgte mit der Calcium-Phosphat-Methode mit einem Calcium-Phosphat Transfektions-Kit (Promega Protection). Für die Transfektion von Phoenix-Zellen in einer  $150\text{cm}^2$  Kulturflasche wurden  $25\mu\text{g}$  des lentiviralen Vektors,  $25\mu\text{g}$  des Gag/Pol-Plasmids,  $12,5\mu\text{g}$  des Rev-Plasmids,  $10\mu\text{g}$  des Hüllprotein-Plasmids und  $156\mu\text{l}$  2M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit destilliertem Wasser auf  $1250\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die DNA/ $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurde dann tröpfchenweise zu  $1250\mu\text{l}$  eines zweifach konzentrierten Präzipitationspuffers (2x HBS) in ein 15ml Falconröhrchen gegeben, wobei die Lösung durch Einströmen von Luft ständig aufgewirbelt wurde. Das Gemisch wurde vor dem weiteren Gebrauch für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das

DMEM-Glutamax Medium wurde durch neues Medium mit 25µM Chloroquine ersetzt und die DNA-Lösung tröpfchenweise und unter leichtem Schwenken auf die Phoenix-Zellen gegeben. Nach einer Kultivierungsdauer von mindestens 6 bis maximal 12 Stunden wurde das Medium durch frisches DMEM-Glutamax Medium mit 20mM HEPES und Penicillin/Streptomycin ausgetauscht. Nach einer Kultivierungsdauer von weiteren 12 Stunden wurde das Medium mit den lentiviralen Partikeln abgenommen und bei 4°C gelagert. Nach weiteren 12 Stunden Kultivierung wurde erneut das Medium mit den lentiviralen Partikeln abgenommen und mit dem schon gesammelten Medium durch einen 0,45µm Filter filtriert, für 12 Stunden bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Dieser Vorgang wurde zwei weitere Male wiederholt.



**Abb.3: Schematische Darstellung der verwendeten lentiviralen Vektoren.**

Um CNTF in mesenchymalen Stammzellen zu exprimieren, wurde ein polycistronischer lentiviraler Vektor hergestellt, der unter Kontrolle des ubiquitär aktiven CAG Promoters für eine sezernierbare Variante von Maus CNTF und ein Fusionsgen bestehend aus dem Reportergen tdTomato und dem Resistenzgen Blasticidin (Bsd) kodiert (pCAG-CNTF-IRES-tdTomato/BSD; a). Als Kontrollvektor diente derselbe Vektor aber ohne die CNTF cDNA (pCAG-IRES-tdTomato/BSD; b).

Abkürzungen: Ψ, packaging signal; CAG, cytomegalovirus enhancer/chicken β-actin; CNTF, ciliary neurotrophic factor; cPPT, central polypurine tract; IRES, internal ribosome entry site; LoxP, recognition site of Cre recombinase; RRE, rev-responsive element; SIN-LTR, self-inactivating long terminal repeat; wPRE, woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; Bsd, Blasticidin.

## **2.8 Transduktionen von 3T3-Zellen**

Zur Abschätzung der Virentiter und der Qualität der verschiedenen „Virenernten“ wurden 3T3 Fibroblasten mit den lentiviralen Vektoren pCAG-CNTF-IRES-tdTomato/BSD und pCAG-IRES-tdTomato/BSD (Abb. 3) transduziert. Zur Transduktion wurden  $5 \cdot 10^4$  3T3-Zellen pro Position einer 24-Well-Platte ausplattiert. Nachdem sich die Zellen auf dem Kultursubstrat angeheftet hatten, wurde pro Virenernte in jeweils ein Well 400  $\mu$ l Virenüberstand auf 1 ml Kultivierungsmedium gegeben. Zur Verbesserung der Transduktionseffizienz wurde außerdem jedem Well 8  $\mu$ g/ml Polybren beigefügt und die Zellen dann mit dem Virenüberstand bei 2800 rpm und Raumtemperatur für 1 Stunde zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen für 1 Stunde im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Danach wurden die Zellen in einem frischen Medium ohne Virenüberstand und Polybren für einen weiteren Zeitraum von 48-72 Stunden kultiviert. Die jeweilige Transduktionseffizienz wurde fluoreszenzmikroskopisch über den Prozentsatz von Zellen abgeschätzt, die das Reportergen tdTomato exprimierten.

## **2.9 Transduktion und Selektion von mesenchymalen Stammzellen**

Zur Transduktion mesenchymaler Stammzellen wurden die Zellen in 6-well-Platten ausplattiert und in Expansionsmedium bis zur Subkonfluenz kultiviert. Das Medium wurde dann durch 0,5 ml unverdünnten Virenüberstand (polycistronischer lentiviraler Vektor) mit 8  $\mu$ g/ml Polybren ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde mit 2800rpm bei 32°C in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert (Weber et al., 2008; Weber et al., 2010). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 45-60 Min. im Brutschrank wurde der Virenüberstand durch frisches Expansionsmedium ersetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Die Zellen wurden täglich am Fluoreszenzmikroskop auf die Expression des Reportergens tdTomato analysiert. Ab dem Zeitpunkt einer deutlich detektierbaren tdTomato-Expression wurden alle Zellen in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Nach

24 Stunden wurde dem Expansionsmedium 4µg/ml Blastocidin (BSD) zugesetzt, um die positiven Zellen zu selektionieren.

Die Effizienz der Selektion wurde durch tägliche fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen kontrolliert. Beim Erreichen einer subkonfluenten Zelldichte wurden die transduzierten mesenchymalen Stammzellen passagiert und in Expansionsmedium mit regelmäßiger Zugabe von 4µg/ml Blastocidin weiter expandiert. Die CNTF-exprimierenden mesenchymalen Stammzellen werden im folgenden als "CNTF-MSCs" bezeichnet. Die Kontrollzellen, welche kein CNTF-exprimieren, werden im folgenden als "Kontroll-MSCs" bezeichnet.

## **2.10 Klonierung von mesenchymalen Stammzellen**

Klonale Stammzelllinien wurden über die Expression des Reportergens tdTOMATO mittels „fluorescence activated cell sorting“ (FACS; FACSAria, Becton Dickinson Bioscience) etabliert. Dabei wurden Zellen mit der stärksten Expression des Reportergens selektioniert und einzeln in die Positionen einer 96 Well-Platte verteilt, und anschließend erneut expandiert. Beim Erreichen einer subkonfluenten Zelldichte wurden die klonierten mesenchymalen Stammzellen in größere Kulturfラスchen passagiert und in Expansionsmedium mit regelmäßiger Zugabe von 4µg/ml Blastocidin weiter expandiert.

## **2.11 Immunzytochemie und Histologie**

### **2.11.1 Immunzytochemische Analyse von transduzierten mesenchymalen Stammzellen**

Um zu überprüfen, dass die selektionierten Reporter-gen-exprimierenden mesenchymalen Stammzellen den eingebrachten Wachstumsfaktor exprimieren, wurden die Zellen immunzytochemisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen Maus CNTF analysiert .

Tabelle 1: Für immunzytochemische Analysen verwendeter primärer Antikörper.

Antikörper	mono-/ polyklonal	Spezies	Verdünnung
anti-CNTF	polyklonal	Kaninchen	1:500

Tabelle 2: Für immunzytochemische Analysen verwendete sekundäre Antikörper.

Antikörper	mono-/ polyklonal	Spezies	Verdünnung	Konjugat
anti-Maus	polyklonal	Ziege	1:200	Cyanine (Cy5)
anti-Kaninchen	polyklonal	Ziege	1:200	Cyanine (Cy5)

Für immunzytochemische Analysen mit anti-CNTF Antikörpern wurden die Zellen zunächst für 10 Minuten in PBS mit 4% Paraformaldehyd fixiert, dann mit einem „Blocking-Puffer“ (PBS, 0,1% BSA, 0,3% Triton X-100) für 60 Minuten inkubiert und schließlich mit 70µl der entsprechenden primären anti-CNTF-Antikörperlösungen überschichtet. Nach einer Inkubation mit den primären anti-CNTF-Antikörpern für 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Zellen über Nacht im Kühlschrank bei 4°C mit dem primären Antikörper weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen mehrfach mit PBS gewaschen, dann für 1,5 Stunden mit den entsprechenden sekundären Antikörpern für 3 Stunden inkubiert, zur Darstellung der Zellkerne für 10 Minuten mit (4' ,6-Diamidin-2-phenylindol (Dapi), Firma DAKO) DAPI angefärbt und erneut mehrfach mit PBS gewaschen und mit Aqua-Polymount auf Objektträgern eingedeckelt. Als Kontrolle wurde dasselbe Protokoll auf mesenchymale Stammzellen angewendet, die mit pCAG-IRES-tdTomato-BSD transduziert waren. Zusätzlich wurden bei einigen Immunfärbungen als Negativkontrolle die Zellen mit PBS anstatt mit dem primären Antikörper inkubiert.

## 2.11.2 Western Blot

Um zu überprüfen, ob das ektopisch exprimierte CNTF von den mesenchymalen Stammzellen sezerniert wird, wurden Western Blot Analysen der Kulturüberstände durchgeführt. Hierzu wurden klonale CNTF-MSK und Kontroll-MSK Zelllinien für eine Woche in Expansionsmedium kultiviert, und anschließend die konditionierten Medien gesammelt. Die Konfluenz der Stammzellen lag bei ca. 90%.

### 2.11.2.1 Heparin-Agarose

10 ml der Expansionsmedien wurden über Nacht mit 20 µl Heparin Agarose Type I (Sigma) bei 4°C präzipitiert, für 5 Minuten bei 4°C mit 4000rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, und das Pellet mit der Heparin-Agarose und dem daran gebundenem Wachstumsfaktor in 1ml kaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde in ein Eppendorfröhrchen überführt und ein weiteres Mal für 5 Minuten bei 4°C mit 12.000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 4x Lämmli-puffer resuspendiert. Die Probe wurde dann 10 Minuten bei 95°C denaturiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf ein 12% SDS Gel aufgetragen.

### 2.11.2.2 Gele gießen

Tabelle 3: Polyacryamidgel Trenngel 12%

Substanz	Menge
Aqua dest.	2,08 ml
1,5M Tris pH 8,8	1,56 ml
10% SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat 10g/100ml H <sub>2</sub> O)	62,5 µl
30% Acrylamid-Bis	2,5 ml
1,5M Tris pH 8,8	1,56 ml
10% APS (Ammoniumperoxisulfat 10g/100ml H <sub>2</sub> O)	55,7 µl
TEMED ( Tetramethyldiamin)	5,57 µl

Tabelle 4: Sammelgel

Substanz	Menge
Aqua dest.	1,44ml
0,5M Tris pH 6,8	625µl
10% SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat 10g/100ml H <sub>2</sub> O)	25 µl
30% Acrylamid-Bis	415µl
1,5M Tris pH 8,8	01,56 ml
10% APS (Ammoniumperoxisulfat 10g/100ml H <sub>2</sub> O)	25 µl
TEMED ( Tetramethyldiamin)	2,5 µl

Für die Gelelektrophorese wurden zwei Glasplatten in eine Gießkassette eingespannt und auf dem Gießstand fixiert. Eine der Glasplatten ist mit einer Spacer-Palette versehen. Zuerst wurde das Trenngel mit einer Pipette in die Vorrichtung gegeben. Anschließend wurde 1ml Ethanol dazugegeben. Nach der Polymerisation wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel hinzugefügt. Die Auspolymerisation dauert ca. 20 Minuten.

### 2.11.2.3 Durchführung Elektrophorese

Tabelle 5: 10x Laufpuffer

Substanz	Menge
Glycin	144,2g
Tris pH 8,3-8,8	30,3g
SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat)	10g
Aqua dest.	ad 1000ml

Tabelle 6: 10x Transferpuffer

Substanz	Menge
Glycin	144,2g
Tris pH 8,0-10,0	30,3g
Aqua dest.	ad 1000ml

Tabelle 7: Blottingpuffer

Substanz	Menge
100% Methanol	200ml
10x Transferpuffer	100ml
Aqua dest.	ad 1000ml

### 2.11.2.3.1 Auftrennen

Zum Auftrennen wird das „Bio Rad System“ verwendet. Die „innere“ Kammer wurde mit Laufpuffer bis zum Rand gefüllt. Die „äußere“ Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt, bis der Boden damit bedeckt ist. Anschließend wurden die Proben aufgetragen. Der Lauf begann mit 15 mA, danach wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht.

### 2.11.2.3.2 Transfer

Für den Transfer wurden „fibre pads“, Whatman Papier und die Nitrocellulose-Membran in kaltem Blottingpuffer eingeweicht und in folgender Reihenfolge übereinander geschichtet: Auf ein „fibre pad“ wurde doppellagig das Whatman Papier aufgebracht, darauf folgte das Gel und die Nitrocellulosemembran und abschließend folgte erneut doppellagiges Whatman Papier sowie ein „fibre pad“. Der Transfer erfolgt bei 80V für 1 Stunde.

Tabelle 8: 10x TBS-Puffer

Substanz	Menge
NaCl	87,7g
Tris-HCl pH 7,5	12,1g

Tabelle 9: TBST-Waschpuffer

Substanz	Menge
1x TBS-Puffer	100ml
0,05% Tween-20	50 $\mu$ l

Tabelle 10: Sample-Buffer

Substanz	Menge
Aqua dest.	3ml
0,5M Tris pH 6,8	1ml
10% SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat 10g/100ml H <sub>2</sub> O)	1,6ml
Glycerol	1,6ml
Bromphenolblau	0,4ml
2-Mercapthoethanol	0,4ml

Die Membran wurde für 30 Minuten in 1% Skim-Milk (in TBS-Puffer) Blocking Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper wurde in TBS-Waschpuffer verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur die Inkubation mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper, der ebenfalls in TBS Waschpuffer angesetzt wurde. Zwischen den Inkubationsschritten mit dem primären Antikörper, dem sekundären Antikörper und der SuperSignal Lösung (Pierce) wurde die Membran jeweils zweimal mit TBSTWaschpuffer gewaschen. Die Membran wurde für 5 Minuten im Dunkeln mit der SuperSignal Lösung inkubiert und anschließend die Fotodokumentation durchgeführt.

## 2.12 Intravitreale Zelltransplantationen

Die genetisch modifizierten mesenchymalen Stammzellen wurden intravitreal in die Augen von acht Tage alten *Pde6b*<sup>rd1</sup> Mäusen transplantiert. Hierfür wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von Ketanest S (25mg/ml) und Rompun (2%) tief anästhesiert. Darauf hin wurde mit einer fein ausgezogenen Glaskanüle, die über einen Schlauch an eine Spritze verbunden war, 1  $\mu$ l

intravitreale Flüssigkeit aus dem intravitrealen Raum abgezogen. Durch dieselbe Injektionsstelle wurde dann ebenfalls mit einer sterilen und fein ausgezogenen Glaskanüle 1  $\mu$ l einer dichten Zellsuspension (30.000 Zellen/ $\mu$ l in PBS) von mesenchymalen Stammzellen in den intravitrealen Raum über einen Zeitraum von 1 Minute injiziert. Während der gesamten Zeit wurde die Zellsuspension bei 4°C gelagert und vor jeder intravitrealen Injektion tituriert, um während des ganzen Transplantationsvorgangs eine Einzelzellsuspension zu gewährleisten.

In ein Auge jedes Versuchstieres wurden CNTF-MSZs injiziert, und in das jeweils kontralaterale Auge wurden Kontroll-MSZs transplantiert. Der Erfolg der Transplantationen wurde visuell kontrolliert. Die Tiere wurden nach der Transplantation bis zum Aufwachen aus der Narkose kontinuierlich überwacht. Danach wurden die Tiere täglich auf mögliche, durch die Zelltransplantation verursachte okuläre Komplikationen überprüft.

### **2.13 Histologische Analysen der Empfänger-Netzhäute**

Sieben Tage nach der intravitrealen Transplantation von mCNTF transduzierten mesenchymalen Stammzellen wurden die Mäuse getötet und die Augen entnommen. Die Augen wurden durch Einschnitte der Cornea mit einer Mikroschere eröffnet und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur in PBS mit 4% Paraformaldehyd immersionsfixiert. Am folgenden Tag wurden die Augen von Bindegewebe und Muskulatur befreit und in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Sucrose cryoprotectiert. Dazu wurden die Augen zunächst für 24 Stunden in einer 7,5% Sucroslösung, dann für 24 Stunden in einer 15% Sucroslösung und schließlich für mindestens 24 Stunden in einer 30% Sucroslösung inkubiert. Danach wurden die Augen in Siliconformen in Tissue-Tek mit einer definierten Orientierung (Abb. 4) eingebettet. Dadurch wurde gewährleistet, dass später bei allen Versuchstieren definierte und vergleichbare Regionen der Netzhäute ausgewertet wurden (s.u.). Die Gewebe wurden anschließend in mit flüssigem Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan eingefroren und mit einem Cryostat mit einer Dicke von 25 $\mu$ m seriell

geschnitten. Die Schnitte wurden in 24-Well-Platten in PBS gesammelt. Um die Photorezeptorschicht darzustellen, wurden die Schnitte immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Recoverin, ein Photorezeptor-spezifisches Antigen, angefärbt.

Tabelle 11: Für immunzytochemische Analysen verwendeter primärer Antikörper.

Antikörper	mono-/ polyklonal	Verdünnung	Artikelbezeichnung
anti- Recoverin	polyklonal	1:5000	Rabbit anti-Recoverin Chemicon/AB5585/LOT LV 1480447/ Rabbit/ 26.10.09

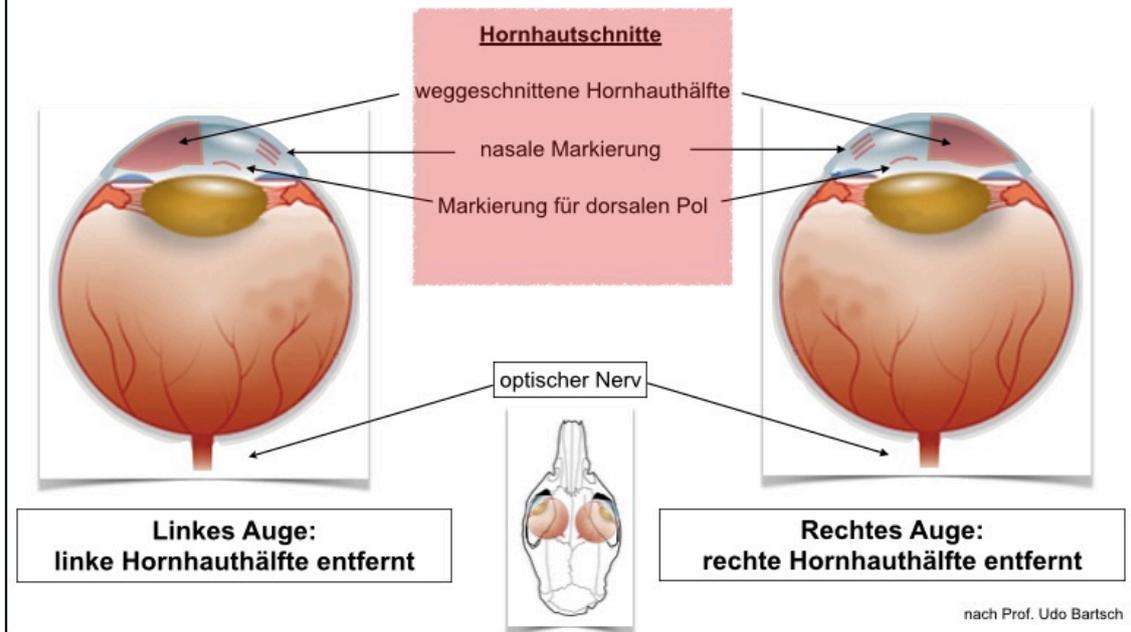
Tabelle 12: Für immunzytochemische Analysen verwendeter sekundärer Antikörper.

Antikörper	mono-/ polyklonal	Spezies	Verdünnung	Konjugat
anti- Kaninchen	polyklonal	Ziege	1:500	Indocarbocyanin (Cy3)

Für immunhistochemische Analysen mit anti-Recoverin Antikörpern wurden die Retina-Schnitte in 24-Well Platten zunächst mit einem „Blocking-Puffer“ (PBS, 0,1% BSA, 0,3% Triton X-100) für 60 Minuten und anschließend in 300µl der entsprechenden primären Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mehrfach mit PBS gewaschen, dann für 4 Stunden mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert, zur Darstellung der Zellkerne für 10 Minuten mit DAPI angefärbt, wiederum mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend mit Aqua-Polymount auf Objektträgern eingedeckelt. Die Schnitte wurden mit einem konfokalen Olympus FV 1000 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Germany, <http://olympus-global.com>) analysiert.

# Orientierung bei Präparation

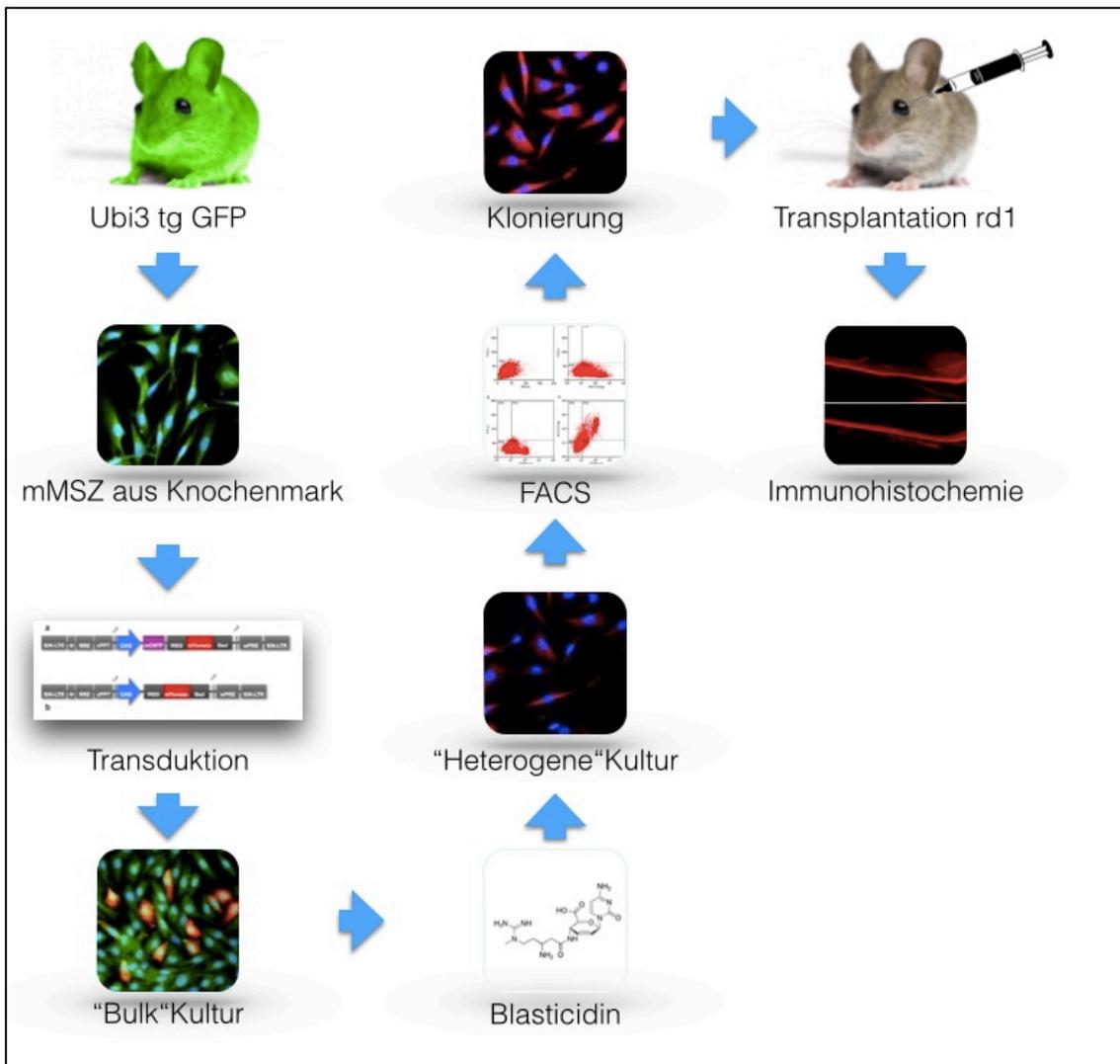
Wenn der optische Nerv zu einem hinzeigt und dorsale Markierung nach oben ausgerichtet ist.



**Abb.4:** zeigt die Hornhautschnitte, die zur Markierung angelegt wurden, bevor die Augen in Tissue-Tek eingebettet wurden. Die Temporale-Seite wurde durch die weggeschnittene Hornhauthälfte markiert. Durch drei horizontale Schnitte, welche lateral lagen, wurde die nasale Markierung erstellt. Ein horizontaler, zentraler Schnitt ist die Markierung für den dorsalen Pol.

## 2.14 Photorezeptor Zählung

Zentrale (in der Ebene des optischen Nerven) retinale Schnitte wurden über die gesamte Länge fotografiert und die Einzelaufnahmen mittels Photoshop CS4 Software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, <http://www.adobe.com>) zusammengesetzt. Mit Adobe Acrobat Pro (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, <http://www.adobe.com>) wurden die Längen der Netzhäute gemessen. Die Photorezeptoren wurden in zwei Bereichen an vorher definierten Positionen der Netzhäute ausgezählt. Diese Bereiche für die Photorezeptorauszahlungen befanden sich an Stellen, die 70% und 30% der Strecke vom optischen Nerven bis zur Peripherie der nasalen Netzhauthälfte entsprachen.



**Abb.5: zeigt eine schematische Zusammenfassung des experimentellen Vorgehens.**

## 2.15 Verwendete Lösungen

### 2.15.1 Allgemeine Lösungen

Phosphate buffered saline (PBS; 10x)

80g/l NaCl

17,99 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 g/l KCl

2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

in ddH<sub>2</sub>O (pH 7,4)

Paraformaldehyd (PA; 4%)

4g Paraformaldehyd

in 100ml PBS (pH 7,3)

Poly-L-Ornithin (PLO)

7,5ml PLO (0,01% Stammlösung)

in 50ml destilliertem H<sub>2</sub>O

Sucrose (7,5%, 15% oder 30%):

7,5g, 15g oder 30g

in 100ml PBS

## **2.15.2 Medien für mesenchymale Stammzellen**

### **2.15.2.1 Expansionsmedien**

Expansionsmedium für mesenchymale Stammzellen

DMEM/F12

20% FCS ( für Maus MSC, vorselektioniert )

10µl/ml L-Glutamin (200mM Stammlösung)

10µl/ml Penicillin (10.000 Units/ml Stammlösung)

10µl/ml Streptomycin (10mg/ml Stammlösung)

Expansionsmedium für mit Blastocidin-Resistenz transduzierte mesenchymale Stammzellen

DMEM/F12

20% FCS ( für Maus MSC, vorselektioniert )

10µl/ml L-Glutamin (200mM Stammlösung)

10µl/ml Penicillin (10.000 Units/ml Stammlösung)

10µl/ml Streptomycin (10mg/ml Stammlösung)

4µg/ml Blastocidin (4 µg/ml Stammlösung)

### **2.15.2.2 Medium für die Virenherstellung**

Medium 1

DMEM- Glutamax

10% inaktiviertes FCS

40µl/ml HEPES Puffer (0,5M Stammlösung )

10µl/ml Penicillin (10.000Units/ml Stammlösung)

10µl/ml Streptomycin (10mg/ml Stammlösung)

10µl/ml Natriumpyruvat (100mM Stammlösung)

## X-Vivo Medium

### X-Vivo Medium

40µl/ml HEPES Puffer (0,5M Stammlösung )

10µl/ml Penicillin (10.000Units/ml Stammlösung)

10µl/ml Streptomycin (10mg/ml Stammlösung)

## 2.16 Verbrauchsmaterialien und Geräte

### 2.16.1 Chemikalien

Tabelle 13: Chemikalien

Material	Hersteller	Abkürzung
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich	
Accutase	PAA Laboratories GmbH Pasching Austria	ACC
Agar	Fluka Chemika, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
„Bovine serum albumin“	SAFC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Penzberg	BSA
Blasticidin	Gibco Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe	BSD
Dimethylsulphoxide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	DMSO
Ethanol	Walter CMP GmbH & Co. KG, Kiel	
Hi Speed Plasmid Midi/Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden	
Ketanest S (25mg/ml)	Pfizer	
Kochsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	

Matrigel	Becton Dickinson, Heidelberg	
Methanol	J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA	
Paraformaldehyd	Fluka Chemika, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	PA
„Phosphate buffered saline”, steril	Gibco Invitrogen life technologies, Carlsbad, CA, USA	PBS
Polybren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Poly-L-Ornithine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	PLO
Rompun (2%)	Bayer	
Salzsäure	Merck KG, Darmstadt	
Tissue-Tek	Sakura Finetch, Netherlands	OCT
Triton x 100	Fluka Chemika, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	

## 2.16.2 Medien, Supplemente, Wachstumsfaktoren

Tabelle 14: Medien, Supplemente, Wachstumsfaktoren

Material	Hersteller	Abkürzung
DMEM/F12 1:1 – L-Glutamine	Gibco Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe	
DMEM-Glutamax	Invitrogen GmbH Technologiepark Karlsruhe, Karlsruhe	
Fetales Kälberserum		FCS
Glutamin	Gibco Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe	
Heparinagarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	
Natriumbikarbonat	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe	
Natriumpyruvat	Invitrogen GmbH Technologiepark Karlsruhe, Karlsruhe	
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching	Pen/Strep
X-Vivo	Cambrex BioScience, Verviers (BEL)	

### 2.16.3 Primäre Antikörper

Tabelle 15: primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Abkürzung
anti-gliale fibrilläre saure Protein (polyklonal, Kaninchen)	DAKO A/S, Glostrup, Dänemark	GFAP
anti-Tubulin III (polyklonal, Kaninchen)	Covance Research Produkt, Berkeley, CA, USA	TubIII
CNTF (polyklonal, rb)	Santa Cruz, CA, USA	CNTF

### 2.16.4 Sekundäre Antikörper

Tabelle 16: sekundäre Antikörper

Material	Hersteller	Abkürzung
anti-Kaninchen- Indocarbocyanin (Cy3) (polyklonal, Ziege)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Dianova, Hamburg	anti-Kaninchen-Cy3
anti-Kaninchen-Carbocyanin (Cy2) (polyklonal, Ziege)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Dianova, Hamburg	anti-Kaninchen-Cy2
anti-Maus-Indocarbocyanin (Cy3) (polyklonal, Ziege)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Dianova, Hamburg	anti-Maus-Cy3
anti-Maus-Carbocyanin (Cy2) (polyklonal, Ziege)	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Dianova, Hamburg	anti-Maus-Cy2
anti-rabbit HRP conjugated	Jackson Immuno Research Laboratories Inc., Dianova, Hamburg	Anti-Kaninchen-HRP

## 2.16.5 Geräte

Tabelle 17: Geräte

Material	Hersteller
Binokular	Möller-Wedel international, Wedel
Brutschrank (Zellkultur)	Hera Cell 240, Kendro Laboratory, Thermo electron corporation, Waltham, MA, USA
Brutschrank (Zellkultur)	CO2-Auto-Zero, Heraeus Products, Kendro Laboratory, Thermo electron corporation, Waltham, MA, USA
Sterile Werkbank	Steril Card Hood, the Baker Company Inc., Sanford, Maine
Mikroskope	Axiovert 25, Zeiss, Jena Olympus IX51, Olympus Deutschland, Hamburg Olympus FV 1000 Confocal Mikroskop, Olympus Deutschland, Hamburg
pH-Meter	inoLab, WTW, Weilheim
Waage	Explorer, OHAUS, Giessen Adventurer, OHAUS, Giessen
Wasserbad	Medingen, Firmengruppe Preiss-Daimler, Dresden
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R, Heraeus Products, Thermo electron corporation, Waltham, MA, USA

## 2.16.6 Gebrauchswaren

Tabelle 18: Gebrauchswaren

Material	Hersteller	Abkürzung
Aquapolymount	Polysciences, Inc. Warrington, PA, USA	
Deckgläschen	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda- Königshofen	CS
Eppendorf-Röhrchen 0,5 – 2 ml	Eppendorf References, Hamburg	
Falcon-Röhrchen 15 ml / 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht / greiner bio-one, Frickenhausen	
Kanülen Gr.1 0,9 x 40 mm	Sterican, B.Braun Melsungen AG, Melsungen	
Kryoröhrchen	Nunc Brand Products, Wiesbaden	
Objektträger	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda- Königshofen	
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA	
Pipetten	Eppendorf References, Hamburg LabMate, Abimed Falcon GmbH, Düsseldorf Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt	
Spritzen 5 ml	Original Perfusor Spritze,	

50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	
Multi-Well-Platten	Sarstedt, Nürnberg	
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nürnberg	

### 2.16.7 Versuchstiere

Tabelle 19: Versuchstiere

EGFP-transgene Mäuse	Tierhaltung des Institutes
<i>Pde6b<sup>rd1</sup></i> Mäuse	Tierhaltung des Institutes

### 2.16.8 Software

Tabelle 20: Software

CellP	
Microsoft Word	
Adobe Photoshop CS4	
Adobe Acrobat Pro	

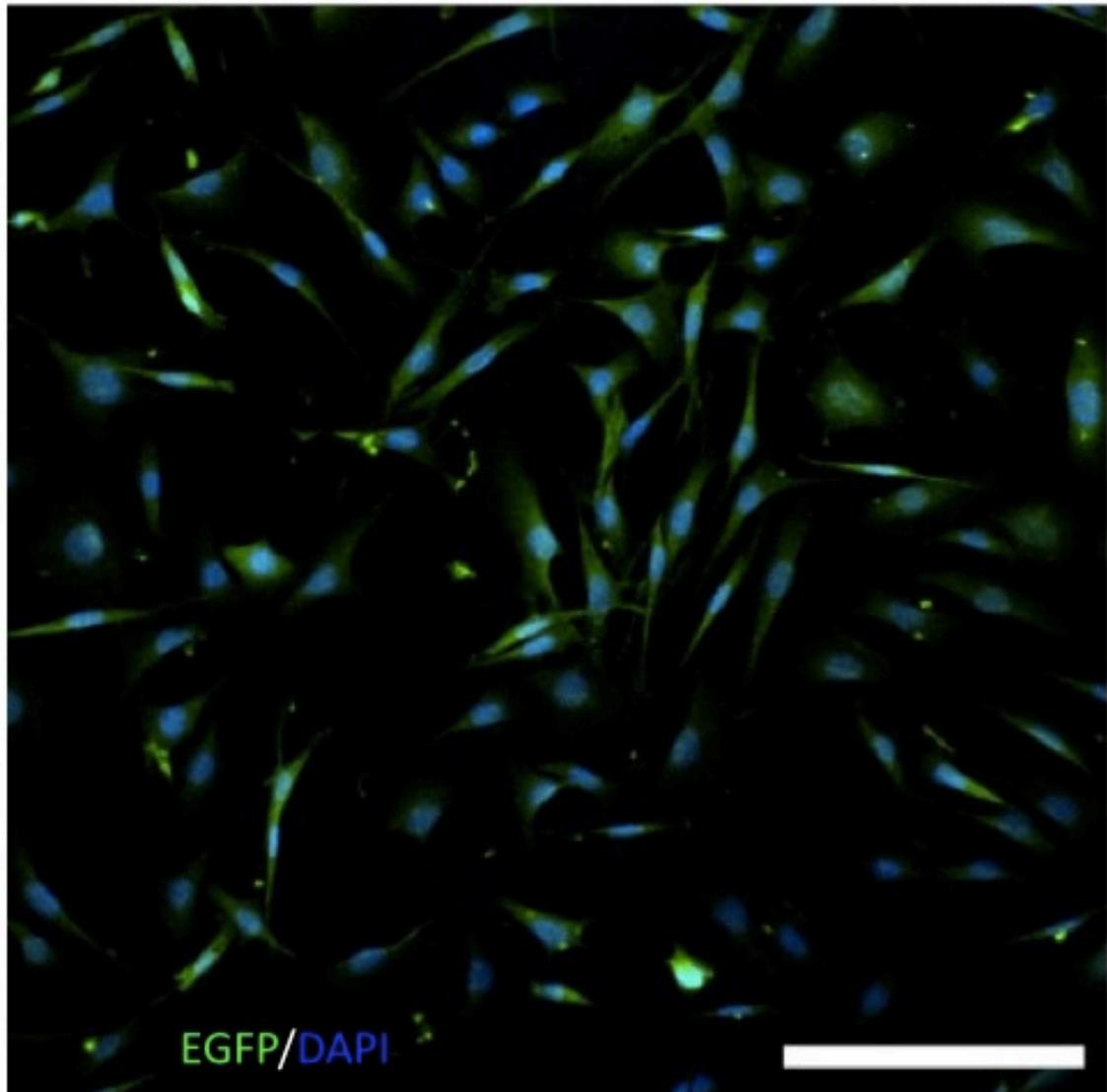
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Murine mesenchymale Stammzellen

Die mesenchymalen Stammzellen wurden aus dem Knochenmark der Extremitäten einer 4 Monate alten transgenen Maus mit einer ubiquitären Expression von EGFP isoliert und in Gegenwart von fetalem Kälberserum expandiert. Innerhalb von 7 Tagen waren in den Kulturflaschen adhärent wachsende Zellen zu beobachten, die sich zu kleinen Kolonien formierten. Sämtliche Zellen in diesen Kulturen wiesen eine ausgeprägte EGFP-Fluoreszenz auf (Abb.6).

Die mesenchymalen Stammzellen wurden nach einer Kulturdauer von 5 bis 7 Tagen enzymatisch vom Zellkulturplastik abgelöst und erneut in Expansionsmedium ausgesät. Bei diesem Vorgang starben einige der Zellen, der größere Anteil überlebte und konnte problemlos weiter expandiert werden. Dieser Vorgang konnte bis zu einer hohen Passagenzahl wiederholt werden und zeigte, dass zumindest ein Teil der Zellen in diesen Kulturen eine wichtige Eigenschaft von Stammzellen aufwies: die Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Dominici et al., 2006; Gage, 1998; McKay, 1997).

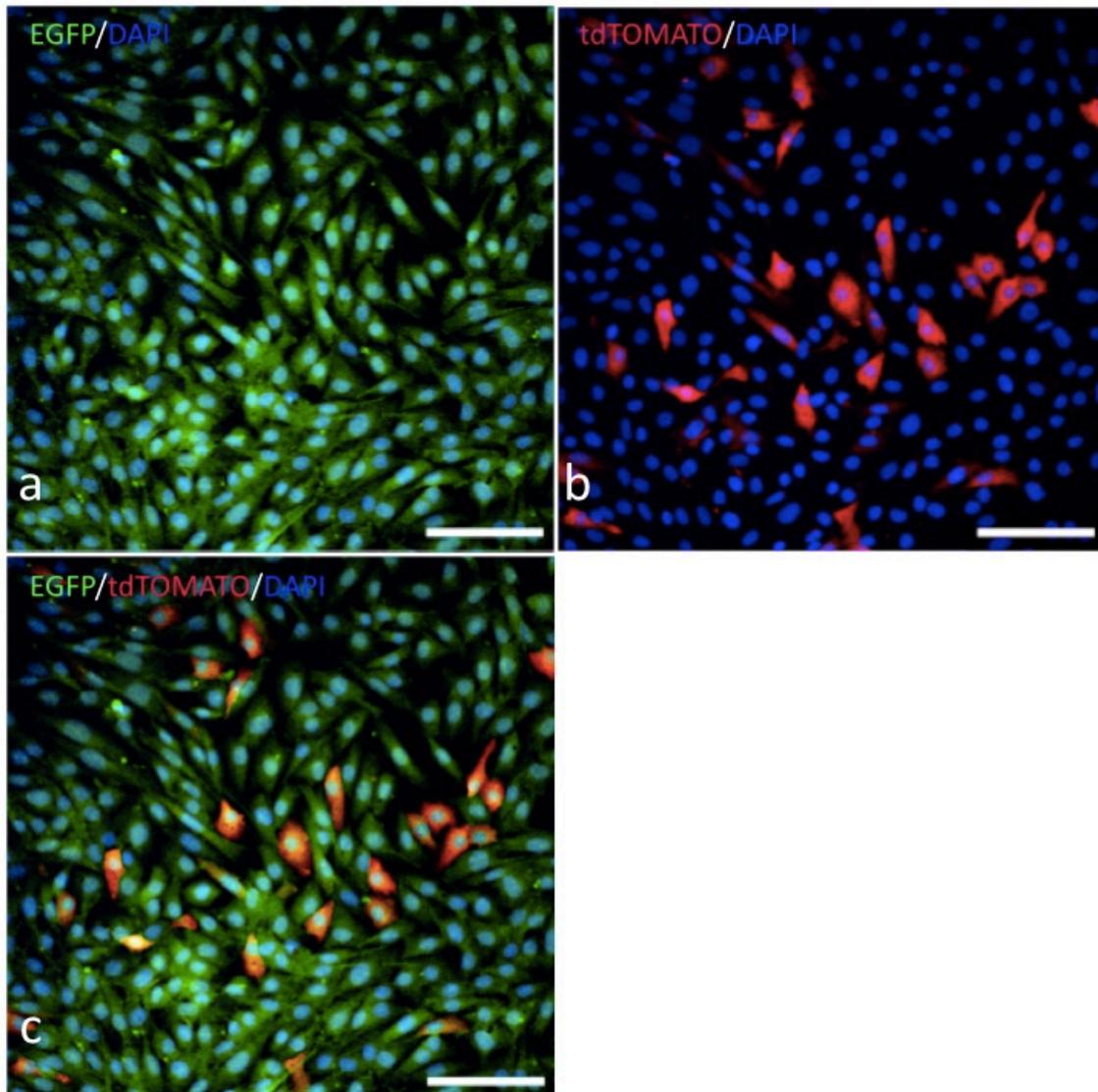
Die expandierten mesenchymalen Stammzell-Kulturen konnten in einem mit 10% DMSO versetzten Zellkulturmedium über einen Zeitraum von mindestens 12 Monaten bei -80°C gelagert werden, ohne dass sich bei der Rekultivierung der Zellen ein Verlust der Fähigkeit zur Selbsterneuerung zeigte. Die rekultivierten Zellen wuchsen in Gegenwart von fetalem Kälberserum innerhalb von ca. 5 Tagen erneut zu mesenchymalen Stammzell-Kolonien heran und konnten über einen Zeitraum von mindestens 10 Passagen weiterexpandiert werden.



**Abb.6: Mesenchymale Stammzellen aus den Röhrenknochen einer EGFP-transgenen Maus. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Alle Zellen zeigten eine homogene Expression von EGFP. Balken 160µm.**

### **3.2 Transduktion von mesenchymalen Stammzellen**

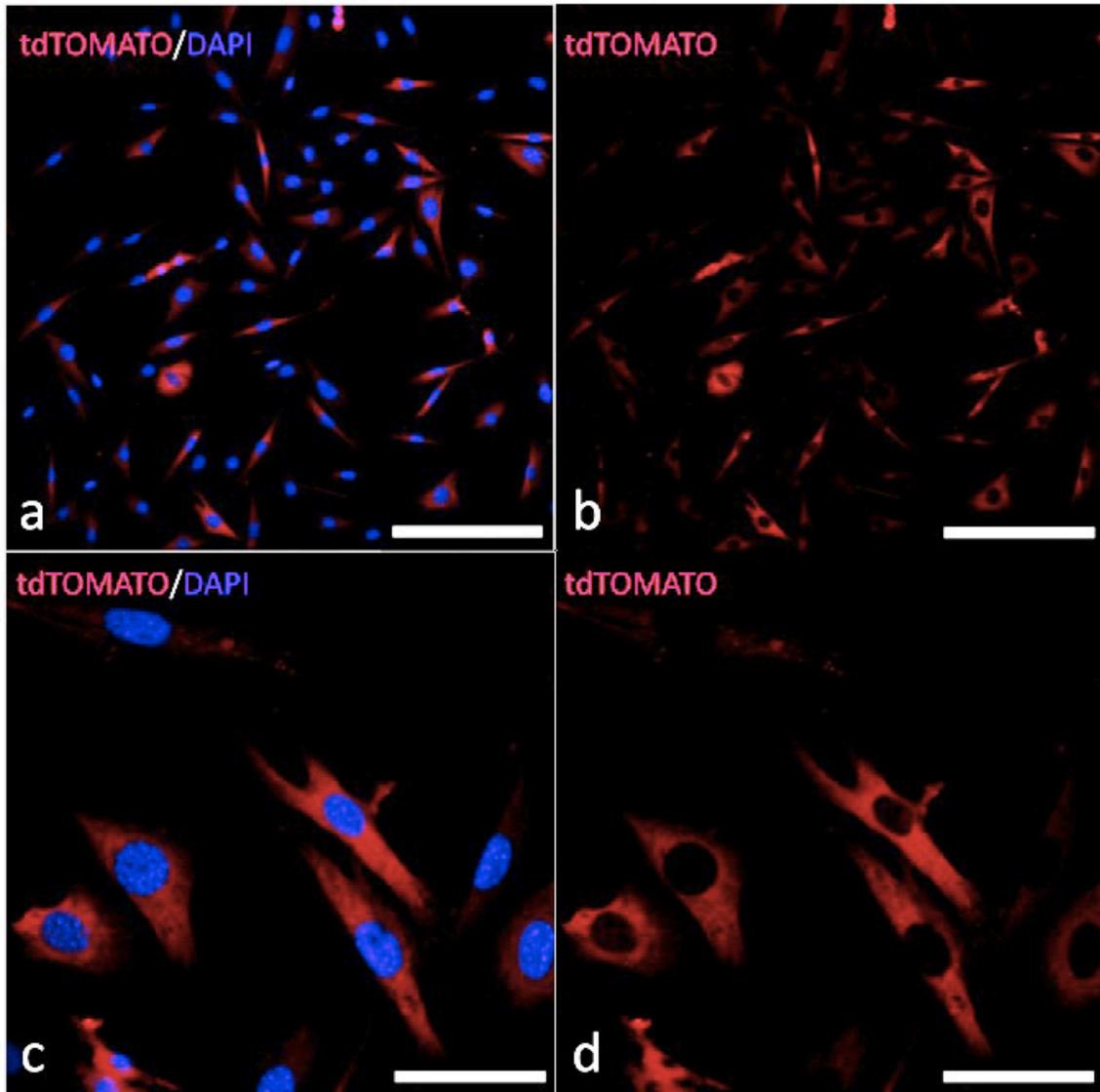
Die GFP-transgenen mesenchymalen Stammzellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und in Expansionsmedium bis zur Subkonfluenz weiter kultiviert. Das Medium wurde dann durch 0,5 ml unverdünnten Virenüberstand (pCAG-CNTF-IRES-Tomato-BSD oder pCAG-IRES-Tomato-BSD) mit 8µg/ml Polybren ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde mit 2800rpm bei 32°C in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert (Weber et al., 2008; Weber et al., 2010). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 45-60 Min. im Brutschrank wurde der Virenüberstand durch frisches Expansionsmedium ersetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Nach ungefähr 5 Tagen waren im Fluoreszenzmikroskop die ersten tdTomato-positiven Zellen in den transduzierten Kulturen zu erkennen (Abb.7).



**Abb.7: Mesenchymale Stammzellen, die mit pCAG-CNTF-IRES-Tomato-BSD transduziert und anschließend expandiert wurden. (a) zeigt die Expression von EGFP in allen mesenchymalen Stammzellen, während (b) die Expression von tdTomato in einer Subpopulation der Stammzellen einige Tage nach der Transduktion zeigt. (c) ist ein „overlay“ von (a) und (b). Zu beachten ist die unterschiedliche Expressionsstärke von tdTomato in den erfolgreich transduzierten Stammzellen dieser „bulk“ Kultur. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (a-c). Balken: 126µm.**

Durch Zugabe von 4µg/ml Blasticidin in das Expansionsmedium wurden die erfolgreich transduzierten Zellen in den „bulk“ Kulturen selektioniert und die positiven Zellen anschließend weiter expandiert. Hierdurch entstanden Kulturen, die ausschließlich aus tdTomato-positiven Zellen bestanden. Die Expressionsstärke des Reportergens in den selektionierten Zellen war

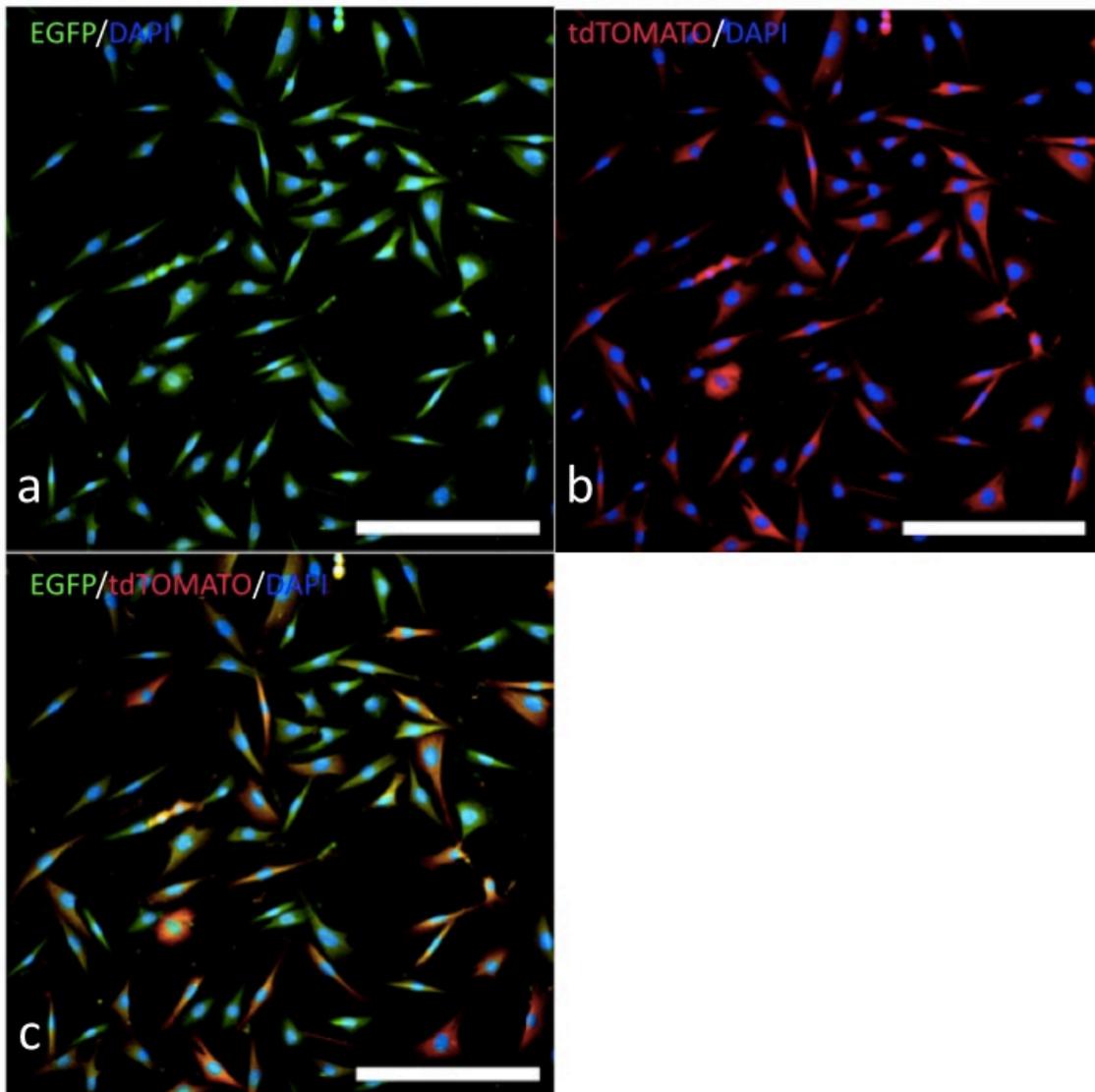
heterogen. Es fanden sich sowohl sehr schwach als auch sehr stark rot fluoreszierende tdTomato-positive Zellen in den Kulturen (Abb. 8).



**Abb.8: Transduzierte mesenchymale Stammzellen nach Selektion mit Blasticidin und anschließender Expansion. Alle Zellen in diesen Kulturen exprimierten das Reportergen tdTomato (a-d). Dabei variierte die Expressionsstärke von tdTomato zwischen den Zellen zum Teil erheblich (a-d). (c) und (d) sind Vergrößerungen aus der Zellkultur von (a) und (b). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (a, c). Balken 100µm.**

### **3.3 Klonierung**

Klonale mesenchymale Stammzelllinien wurden über die Expression des Reportergens tdTomato mittels „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) abgeleitet. Da die Expressionsstärke von CNTF von den polycistronischen lentiviralen Vektoren proportional zur Expressionsstärke des Reportergens tdTomato ist, konnten so klonale Stammzelllinien mit einer starken Expression des Zytokins abgeleitet werden. Dazu wurden aus den „bulk“ Kulturen einzelne Zellen mit der stärksten Expression des Reportergens in 96-well Platten sortiert, und anschließend klonal expandiert. Alle mit dieser Strategie etablierten mesenchymalen Stammzellklone zeigten entsprechend eine starke und homogene Expression des Reportergens (Abb. 9).

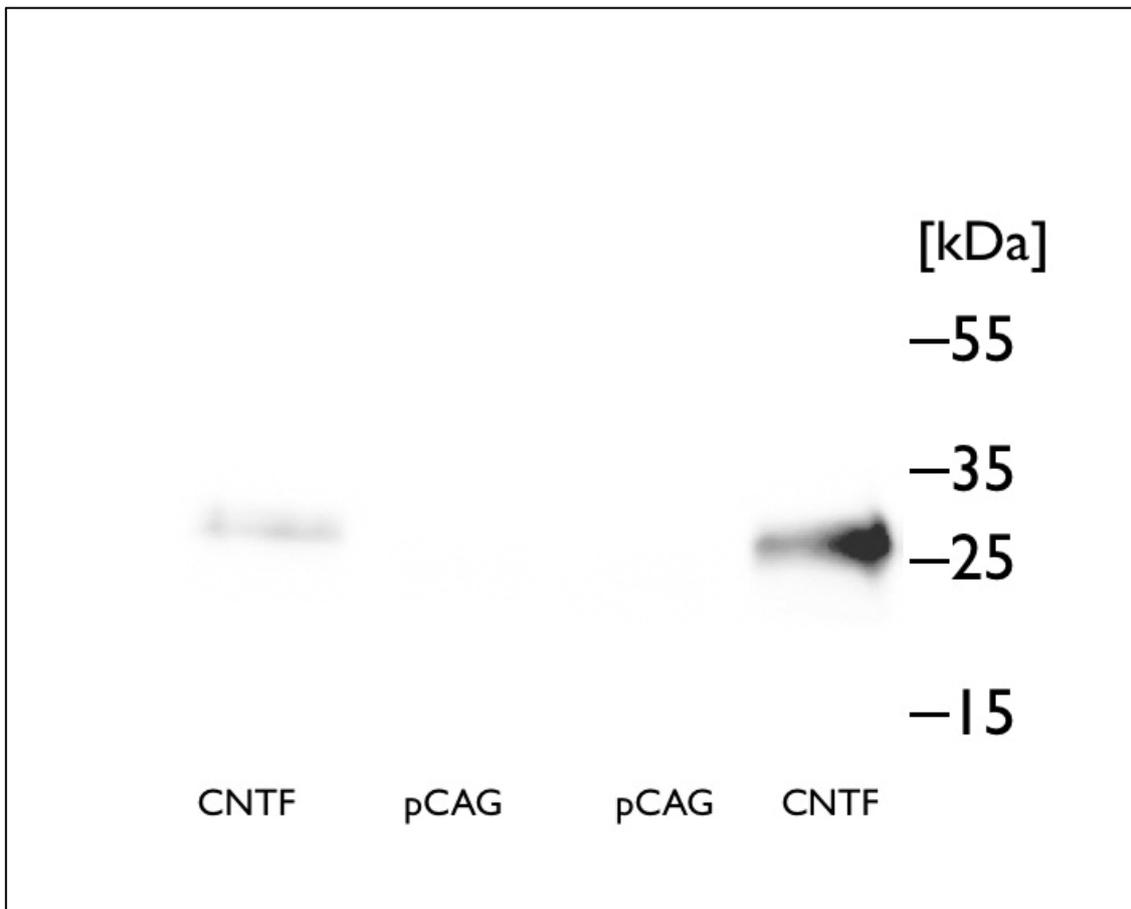


**Abb.9:** Eine mittels FACS etablierte klonale mesenchymale Stammzelllinie nach Transduktion mit mit pCAG-CNTF-IRES-tdTomato-BSD. Mesenchymale Stammzellen aus einer EGFP-transgenen Maus wurden mit pCAG-CNTF-IRES-tdTomato-BSD transduziert, einzelne Zellen mit einer starken Expression des Reportergens aus den „bulk“ Kulturen mittels FACS isoliert und klonal expandiert. (a) zeigt die Expression von EGFP in allen Zellen der Kultur. (b) zeigt, dass alle Zellen in der klonalen Zelllinie eine starke Expression des Reportergens tdTomato aufweisen. Dabei ist die Expressionsstärke von tdTomato in allen Zellen ähnlich. (c) ist das „overlay“ von (a) und (b). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Balken 140µm.

### **3.4 Nachweis der CNTF Expression und Sezernierung**

#### **3.4.1 Western Blot Analyse von Kulturüberständen**

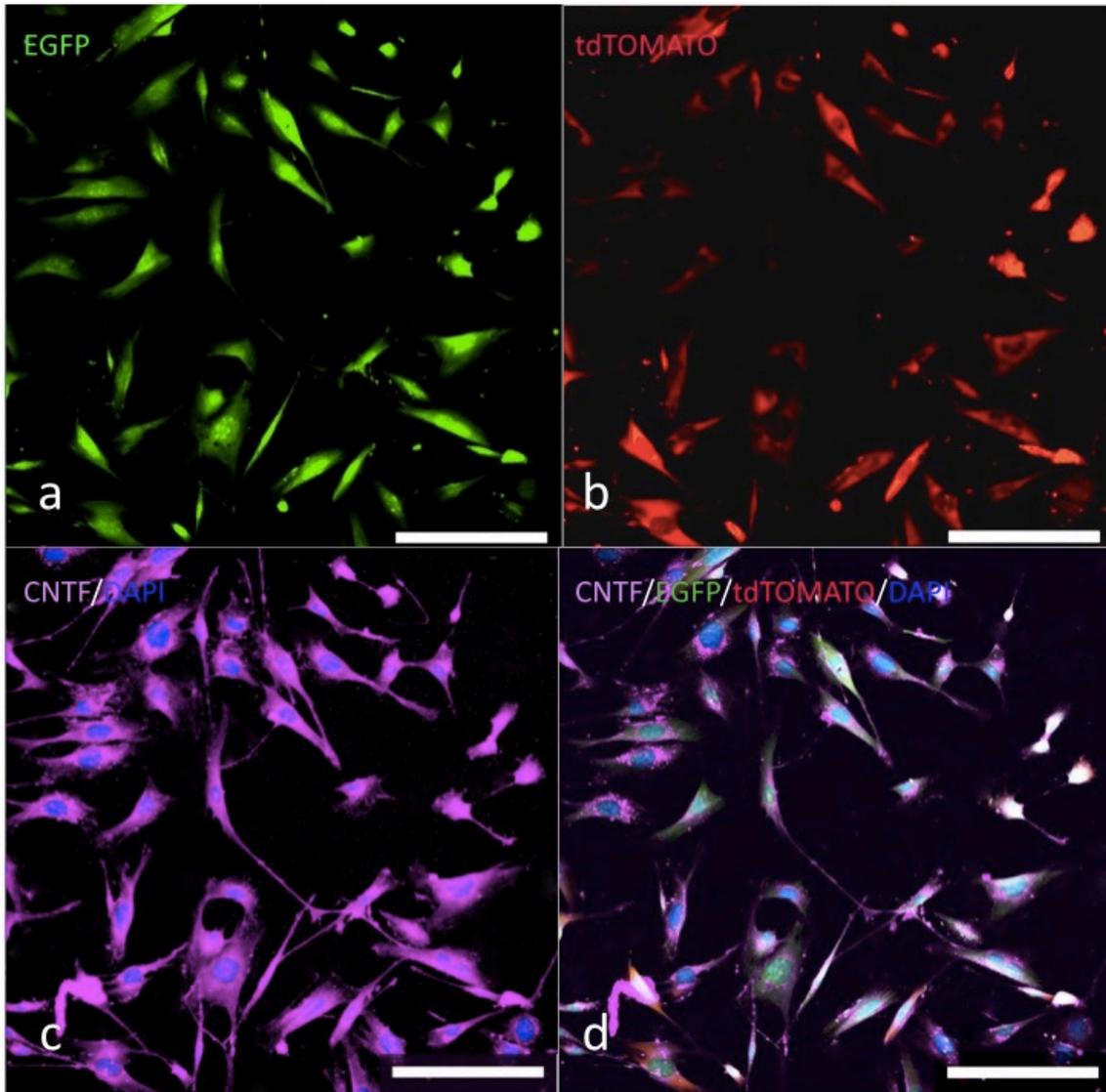
Um die Sezernierung von CNTF von den transduzierten mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen von Kulturüberständen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für sieben Tage in frischem Expansionsmedium kultiviert. Die transduzierten und klonal expandierten mesenchymalen Stammzellen waren dabei zum Zeitpunkt der Analyse der Überstände fast konfluent. Neben den Überständen von mit pCAG-CNTF-IRES-tdTomato-BSD transduzierten CNTF-MSZ Kulturen wurden als Kontrolle parallel Überstände von mit pCAG-IRES-Tomato-BSD transduzierten Kontroll-MSZ Kulturen analysiert. Während in dem Expansionsmedium der CNTF-MSZs CNTF nachgewiesen werden konnte, war in den Kulturüberständen der Kontroll-MSZ Klone das Zytokin nicht detektierbar (Abb. 10).



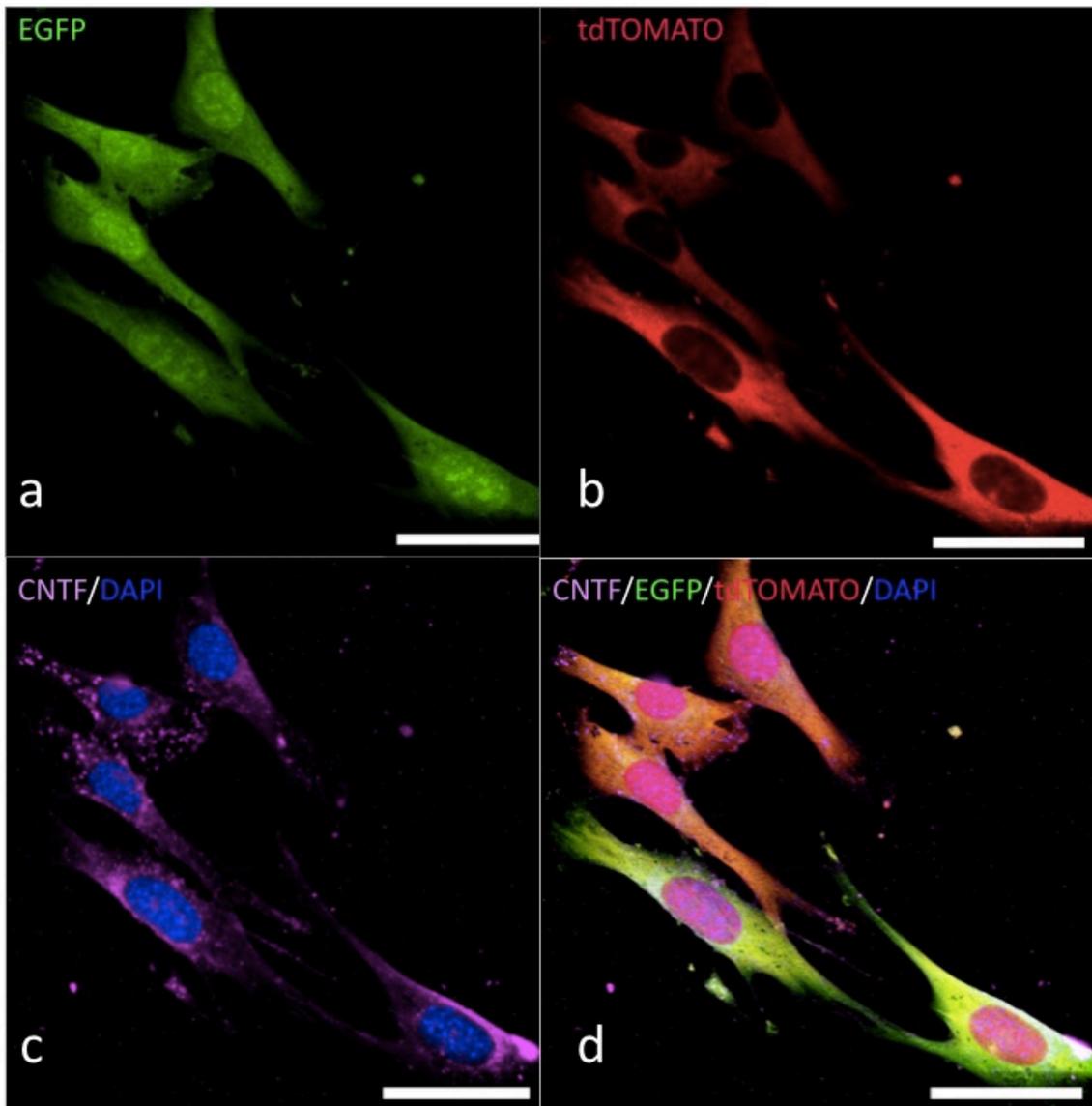
**Abb.10:** In Western Blot Analysen konnte CNTF in den Kulturüberständen von zwei verschiedenen klonalen CNTF-MSZ Kulturen nachgewiesen werden (CNTF). In Kulturüberständen von Kontroll-MSZ Kulturen (pCAG) konnten dagegen keine detektierbaren Mengen von CNTF nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Immunzytochemische Analysen der CNTF Expression

Die Expression von CNTF in den CNTF-transduzierten mesenchymalen Stammzelllinien und entsprechenden Kontrollzellen wurde außerdem immunzytochemisch untersucht. Dabei wurden sämtliche immunzytochemischen Analysen der CNTF-transduzierten MSZ Klone und Kontrollzelllinien parallel unter identischen Bedingungen durchgeführt. Während in den CNTF-transduzierten Zellen neben der Ko-Expression von GFP und tdTomato außerdem eine perinuklär lokalisierte CNTF-Immunreaktivität nachweisbar war (Abb. 11, Abb. 12), war in den Kontrollzellen eine GFP und tdTomato, aber keine CNTF Expression zu detektieren (Abb.13).



**Abb.11: Immunocytochemische Analyse der CNTF Expression in einem CNTF-MSZ Klon. Mesenchymale Stammzellen einer GFP-transgenen Maus wurden mit pCAG-CNTF-IRES-tdTomato-BSD transduziert, Zellen mit einer starken Expression des Reportergens mittels FACS isoliert, klonal expandiert und mit anti-CNTF Antikörpern angefärbt. (a) zeigt die EGFP Expression in allen Zellen dieses Klons, (b) zeigt die tdTomato Expression, die in allen Zellen dieser klonalen Zelllinie die ähnlich stark ist und (c) zeigt die CNTF Expression, die in allen Zellen des Klons in der perinukleären Region nachweisbar ist. (d) ist das „overlay“ von (a-c). Balken 160µm.**



**Abb.12:** Eine höhere Vergrößerung der Zellen aus der Kultur in Abb. 12 zeigt, dass EGFP (a) und tdTomato (b) in allen Zellen der Zelllinie exprimiert wird. CNTF ist ebenfalls in allen Zellen nachweisbar und ist überwiegend in einer perinukleären Region zu finden (c). (d) ist das „overlay“ von (a-c). d Balken 80µm.

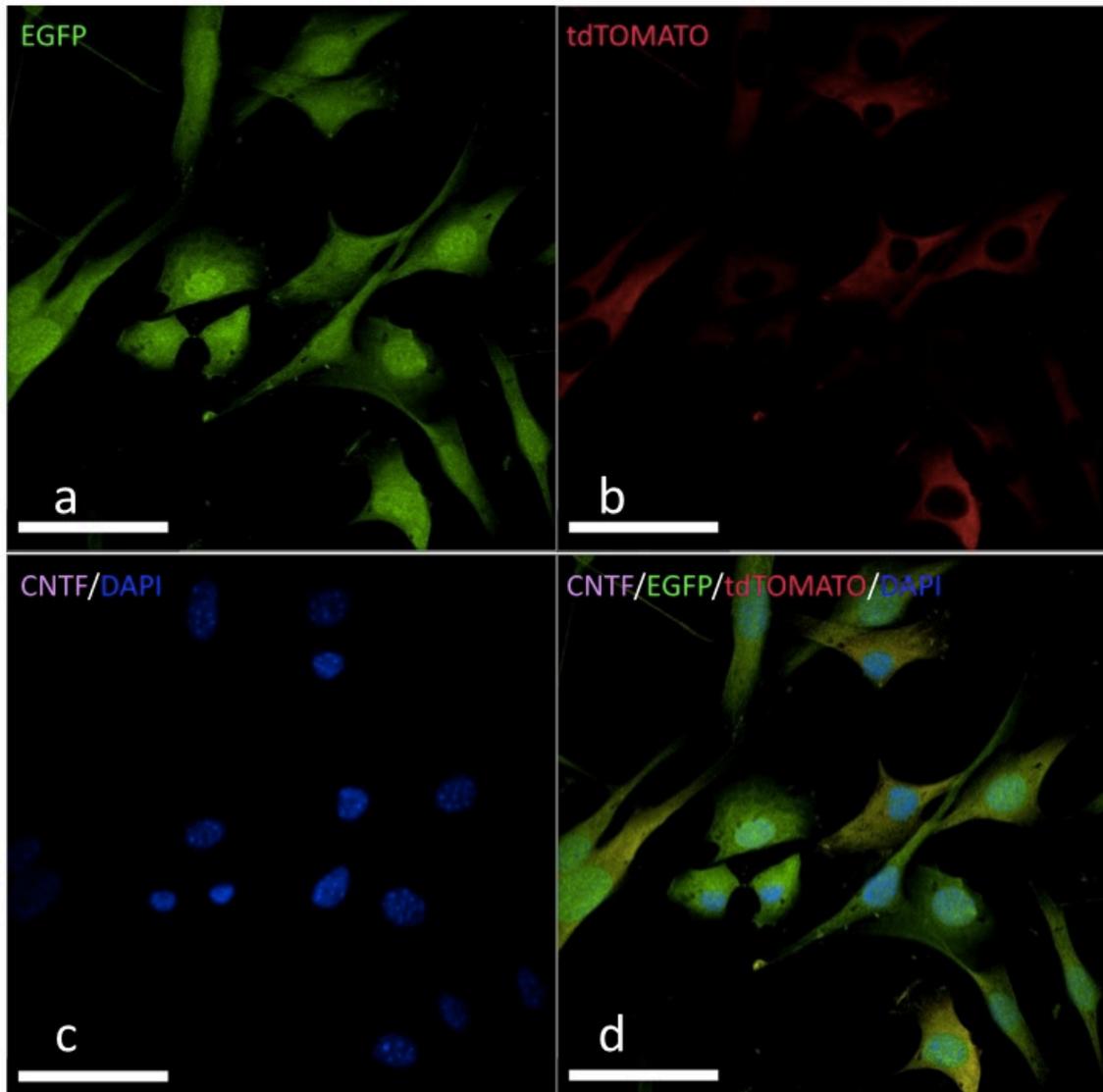


Abb.13: zeigt eine Kontroll-MSZ-Linie, die mit anti-CNTF Antikörpern angefärbt wurde. Mesenchymale Stammzellen einer GFP-transgenen Maus wurden mit pCAG-IRES-tdTomato-BSD transduziert, Zellen mit einer starken Expression des Reportergens mittels FACS isoliert, klonal expandiert und mit anti-CNTF Antikörpern angefärbt. Alle Zellen in dieser klonalen Zelllinie zeigen eine Expression von EGFP (a) und tdTomato (b). Eine Expression von CNTF ist in diesen Zellen nicht nachweisbar (c). (d) ist das „overlay“ von (a-c). Balken 35µm.

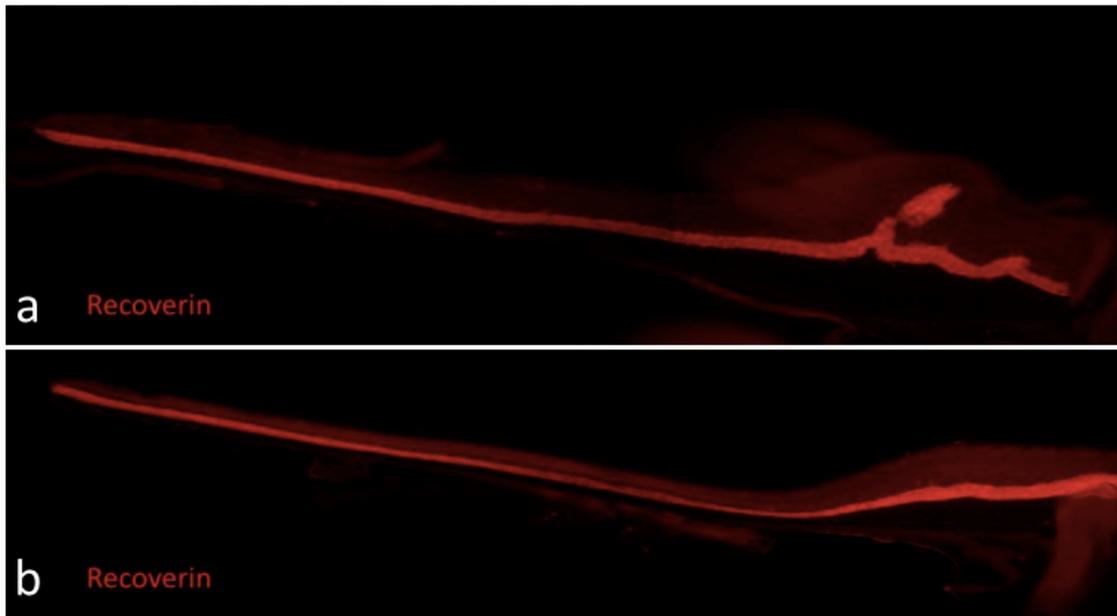
### **3.5 Analyse des neuroprotektiven Effekts CNTF exprimierender mesenchymaler Stammzellen auf Photorezeptoren in der *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutante**

Die genetisch modifizierten CNTF-MSZ und Kontroll-MSZ Linien wurden intravitreal in 8 Tage alte *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mäuse transplantiert. In ein Auge wurden jeweils 30.000 Kontroll-MSZs injiziert, in das jeweils kontralaterale Auge derselben Tiere 30.000 CNTF-MSZs. 7 Tage nach der Transplantation wurden die Tiere getötet und der neuroprotektive Effekt der transplantierten Zellen auf die Photorezeptoren analysiert.

Um die Auswirkung der CNTF transduzierten und geklonten mesenchymalen Stammzellen auf die Retina der Empfänger-Tiere auszuwerten, wurden die experimentell behandelten Augen seriell geschnitten. Die Spenderzellen konnten in diesen Gewebeschnitten aufgrund der Expression der Reportergene EGFP und tdTomato identifiziert werden und hatten Zellschichten auf der posterioren Seite der Linsen und der vitrealen Seite der Empfänger-Netzhäute ausgebildet (Abb.14). Die Netzhäute wurden zudem mit anti-Recoverin Antikörpern angefärbt, um die Photorezeptoren sichtbar zu machen. Bereits in den Übersichtsaufnahmen war ein deutlicher Unterschied in der Dicke der Photorezeptorschicht zwischen den mit Kontroll-MSZs und CNTF-MSZs behandelten Augen zu erkennen (Abb. 15). Die mit CNTF behandelten Netzhäute wiesen über die ganze Länge eine dickere Photorezeptorschicht auf als die Netzhäute der kontralateralen Kontrollaugen (Abb. 15, Abb. 16). Höhere Vergrößerungen der experimentellen Netzhäute an definierten Positionen bestätigten, dass die Photorezeptorschicht in den Augen mit den transplantierten CNTF-MSZs deutlich dicker war als in den kontralateralen Augen mit den transplantierten Kontroll-MSZs (Abb. 17, Abb. 18). Als Komplikation konnte an einigen Augen lokale Verformungen und/oder Ablösung der Netzhaut beobachtet werden (Abb.15, Abb.16).



**Abb.14: Eine Übersichtsaufnahme einer Linse von einem repräsentativen Auge mit transplantierten CNTF-MSZs. Die intravitreal transplantierten mesenchymalen Stammzellen sind deutlich durch ihre GFP-Expression zu erkennen und befinden sich als mehrreihige Zellschicht auf der posterioren Seite der Linsenoberfläche.**



**Abb.15: Immunhistochemische Analyse von zentralen Netzhautschnitten eines repräsentativen Versuchstieres, das am postnatalen Tag 15 analysiert wurde. Die Photorezeptoren in den Netzhautschnitten wurden durch Anfärbungen mit anti-Recoverin Antikörpern sichtbar gemacht. (a) zeigt die zentrale Retina von einem Auge, in das CNTF-exprimierende mesenchymale Stammzellen transplantiert wurden. (b) zeigt die Netzhaut des kontralateralen Auge desselben Tieres, in das Kontrollzellen transplantiert wurden. Die Photorezeptorschicht der CNTF-behandelten Netzhaut ist in allen Bereichen der Retina deutlich dicker als die Photorezeptorschicht der kontralateralen Kontroll-Netzhaut (vgl. a und b).**

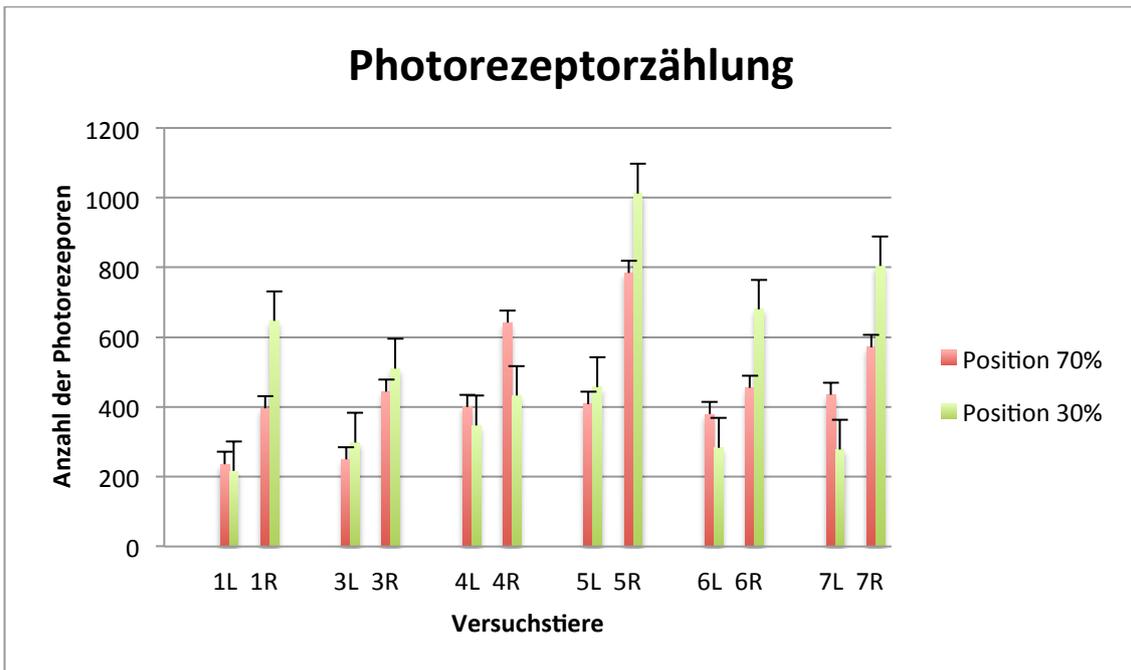
### **3.6 Quantitative Analyse der Neuroprotektion von Photorezeptoren**

Für eine quantitative Analyse des neuroprotektiven Effekts der CNTF-exprimierenden mesenchymalen Stammzellen auf die Photorezeptoren in der *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutante wurden histologische Schnitte von zentralen Netzhäuten mit einem Olympus FV 1000 Confocal Mikroskop photographisch dokumentiert. Einzelaufnahmen der retinalen Schnitte wurden mittels Photoshop CS4 Software zusammengesetzt. Mit Adobe Acrobat Pro wurden dann die Längen der Netzhäute gemessen. Die Photorezeptoren wurden in definierten Flächen an zwei Stellen der Netzhäute ausgezählt. Die Netzhautbereiche zur quantitativen Analyse lagen an definierten Positionen, die 70% und 30% der Strecke von dem optischen Nerv bis zum nasalen Rand der Retina entsprachen (Abb.16). An den definierten Netzhautpositionen wurden die Einzelaufnahmen

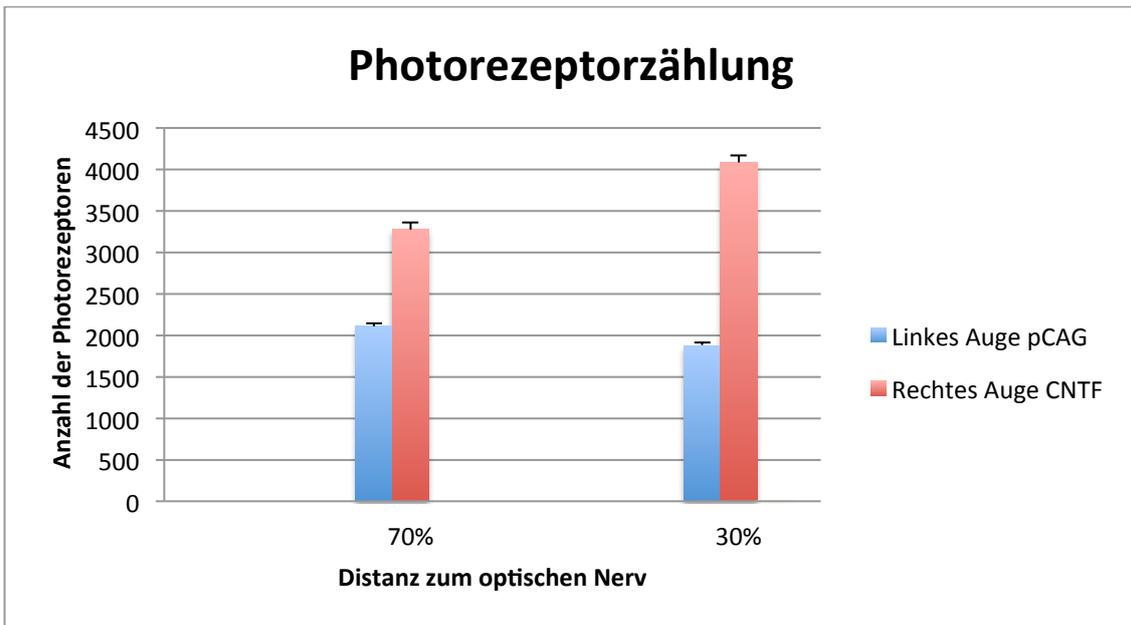
(Abb.17, Abb.18) in Photoshop CS4 Software geöffnet und die Zellkerne der Photorezeptoren mit dem Zählwerkzeug gezählt. Für jedes Versuchstier wurden die Photorezeptorzahlen in dem CNTF-behandelten Auge (CNTF in Tabelle 21) und dem kontralateralen Kontrollauge (Kontrolle in Tabelle 21) bestimmt. In den CNTF-behandelten Augen waren deutlich mehr Photorezeptoren vorhanden als in den Kontrollaugen (Tabelle 21). Dieser Unterschied konnte an beiden ausgewerteten Netzhautpositionen nachgewiesen werden. In einigen Versuchstieren war die Anzahl an Photorezeptoren in den Augen mit transplantierten CNTF-MSZs bis zu dreimal höher als in den Augen mit transplantierten Kontroll-MSZs (s. Versuchstier 1, Photorezeptoren bei 30%). Im Diagramm 1 wurde grafisch für jedes Tier und jede Position (70% und 30% Position) die Anzahl der Photorezeptoren als Balken dargestellt. Ein Vergleich der Durchschnittswerte aller CNTF-behandelten Augen und aller Kontrollaugen zeigt den deutlichen neuroprotektiven Effekt der CNTF-MSZs auf die Photorezeptoren in der *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutante (s. Diagramm 2). Auf der 30% Position war in den Augen mit den transplantierten CNTF-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollaugen etwa die doppelte Anzahl von Photorezeptoren nachweisbar. Auf der 70% Position war ebenfalls ein deutlicher, wenn auch etwas geringerer, neuroprotektiver Effekt der CNTF-MSZs nachweisbar.

**Tabelle 21: Die Anzahl von Photorezeptoren auf der 30% und 70% Position in zentralen Netzhautschnitten von CNTF-behandelten Augen und kontralateralen Kontrollaugen.**

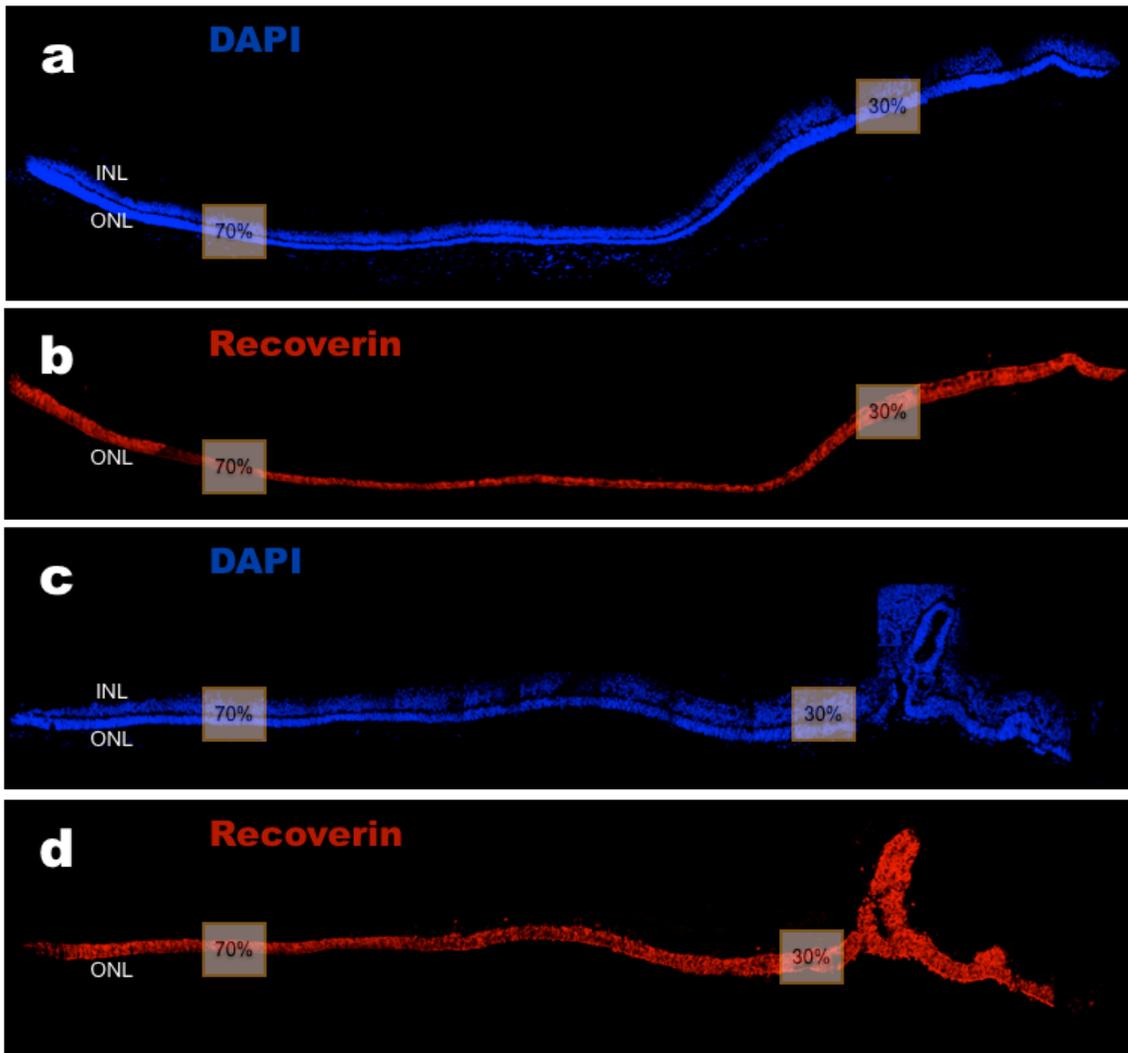
<b>Versuchstier</b>	<b>Photorezeptoren bei 70%</b>	<b>Photorezeptoren bei 30%</b>
1Links (Kontrolle)	236	216
1Rechts (CNTF)	396	647
3Links(Kontrolle)	250	298
3Rechts (CNTF)	444	510
4Links(Kontrolle)	400	347
4Rechts (CNTF)	642	433
5Links (Kontrolle)	408	457
5Rechts (CNTF)	784	1012
6Links (Kontrolle)	379	283
6Rechts (CNTF)	455	680
7L (Kontrolle)	435	278
7R (CNTF)	571	804



**Diagramm 1: Anzahl von Photorezeptoren in *Pde6b<sup>rd1</sup>* 7 Tage nach intravitrealer Transplantation mit CNTF exprimierenden mesenchymalen Stammzellen oder Kontrollzellen. Jeder Balken repräsentiert die Anzahl der Photorezeptoren ( $\pm$ SEM) an der 70% (rote Balken) und 30% (grüne Balken) retinalen Position. Jedes Versuchstier ist mit einer Nummer versehen. L steht für „linkes Auge“ und zeigt die Werte für die Kontroll-Netzhäute. R steht für „rechtes Auge“ und zeigt die Werte für das kontralaterale CNTF-behandelte Auge. Bei allen Versuchstieren und allen ausgewerteten retinalen Positionen sind in den CNTF behandelten Netzhäuten mehr Photorezeptoren vorhanden als in den entsprechenden kontralateralen Kontrollaugen.**



**Diagramm 2: Zusammenfassende Darstellung der Photorezeptorzahlen in  $Pde6b^{rd1}$  7 Tage nach intravitrealer Injektion von CNTF-exprimierenden mesenchymalen Stammzellen und Kontrollzellen. Photorezeptoren wurden in definierten Flächen der Netzhaut an definierten Positionen (30% und 70% der Entfernung zwischen optischen Nerven und Peripherie der nasalen Netzhaut) gezählt. Die blauen Balken zeigen die Mittelwerte für die Augen mit transplantierten Kontrollzellen, die roten Balken die Mittelwerte für die kontralateralen Augen derselben Tiere mit transplantierten CNTF exprimierenden Zellen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von 6 Versuchstieren ( $\pm$ SEM).**



**Abb.16: Intravitreal transplantierte CNTF-exprimierende mesenchymale Stammzellen haben einen neuroprotektiven Effekt auf Photorezeptoren in der *Pde6b<sup>rd1</sup>* Maus. Kontroll-MSZ Klone (a, b) und CNTF-MSZ Klone (c, d) wurden intravitreal in 8 Tage alte *Pde6be<sup>rd1</sup>* Mäuse transplantiert. Die Augen wurden 7 Tage später immunhistochemisch analysiert. In den mit DAPI (a, c) oder anti-Recoverin Antikörpern angefärbten Schnitten ist deutlich zu erkennen, dass die Photorezeptorschicht in den CNTF-behandelten Augen (c, d) über ihre gesamte Länge deutlich dicker ist als die Photorezeptorschicht in den Kontrollaugen (a, b). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer.**

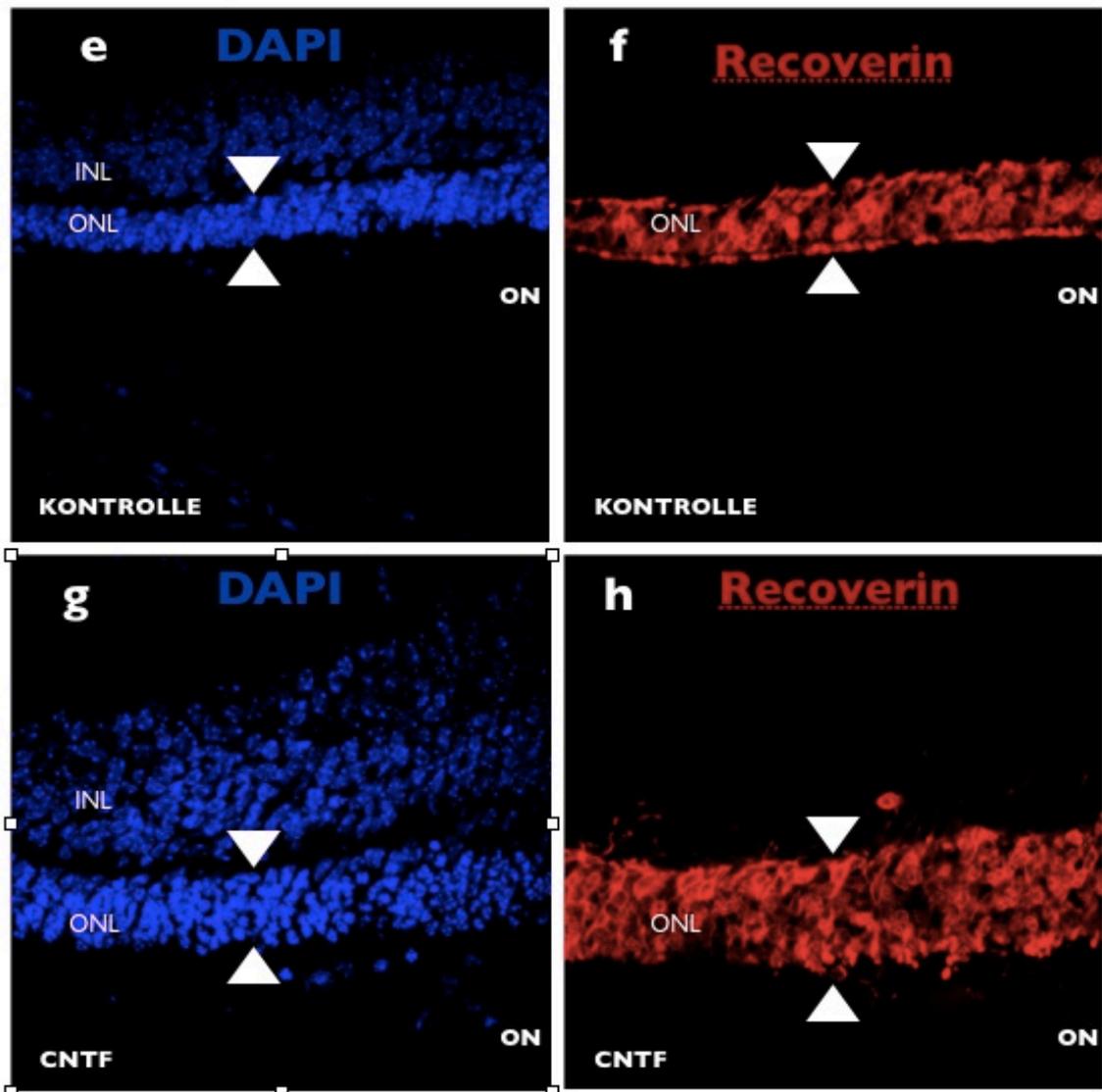


Abb.17: Netzhäute aus Augen mit intravitreal transplantierten Kontroll-MSZs (e, f) und CNTF-MSZs (g, h) im Bereich der 30% Position. Die Zellen wurden in 8 Tage alte *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutanten transplantiert, und die Augen 7 Tage später analysiert. In den DAPI- (e, g) und Recoverin- (f, h) angefärbten Netzhäuten ist deutlich zu erkennen, dass die Photorezeptorschicht (durch weiße Pfeilspitzen in e-h markiert) in den CNTF-behandelten Augen (g, h) signifikant dicker ist als in den kontralateralen Kontrolläugen (e, f). (e = Vergrößerung aus Abb. 16 a; f = Vergrößerung aus Abb. 16 b; g = Vergrößerung aus Abb. 16 c; h = Vergrößerung aus Abb. 16 d). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer.

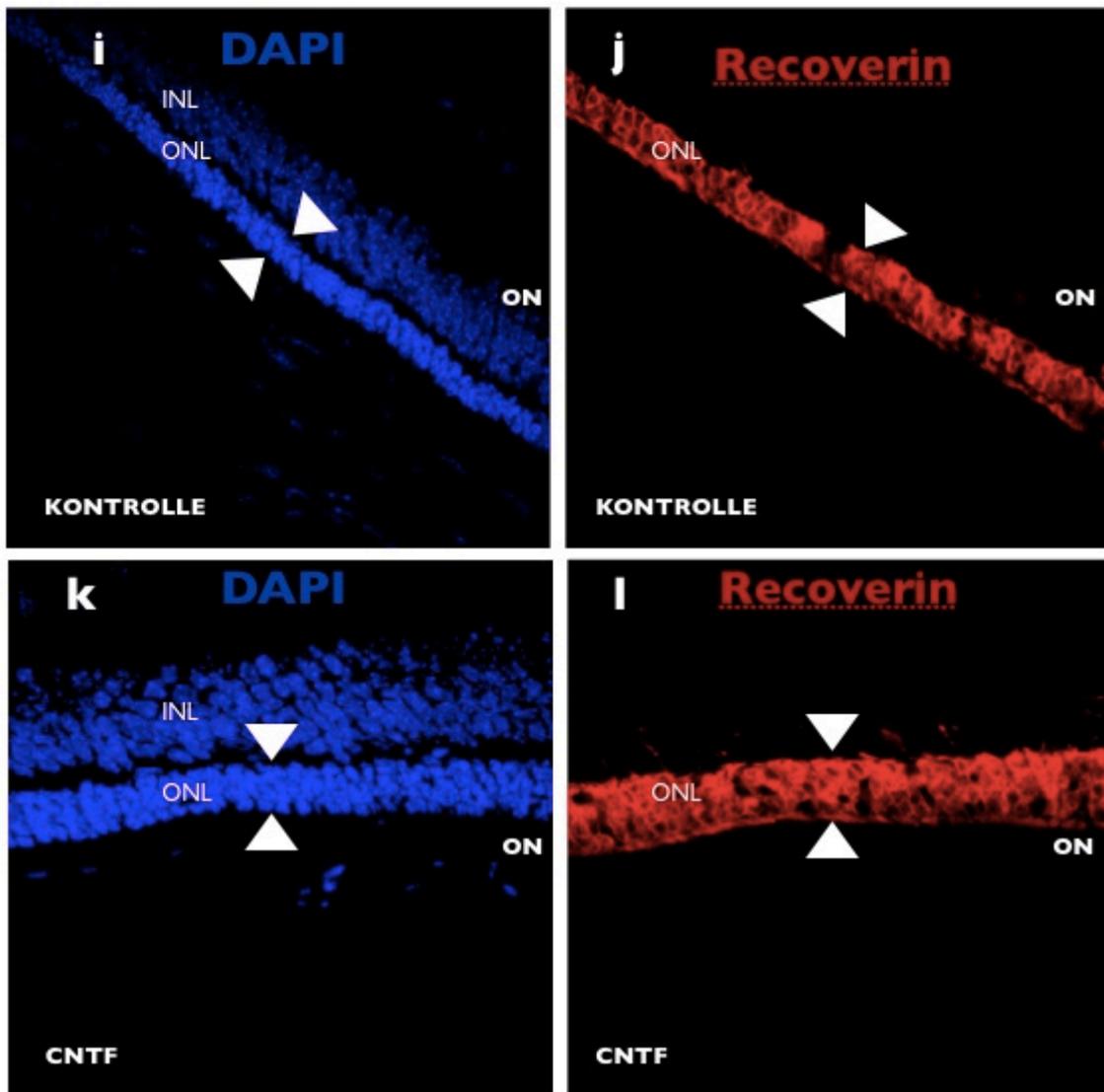


Abb.18: Netzhäute aus Augen mit intravitreal transplantierten Kontroll-MSZs (i, j) und CNTF-MSZs (k, l) im Bereich der 70% Position. Die Zellen wurden in 8 Tage alte *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutanten transplantiert, und die Augen 7 Tage später analysiert. In den DAPI- (i, k) und Recoverin- (j, l) angefärbten Netzhäuten ist deutlich zu erkennen, dass die Photorezeptorschicht (durch weiße Pfeilspitzen in i-l markiert) in den CNTF-behandelten Augen (k, l) signifikant dicker ist als in den kontralateralen Kontrollaugen (i, j). (i = Vergrößerung aus Abb. 16 a; j = Vergrößerung aus Abb. 16 b; k = Vergrößerung aus Abb. 16 c; l = Vergrößerung aus Abb. 16 d). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer.

### 3.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der quantitativen Analysen mit dem t-Test ergab, dass die Photorezeptorzahl in den CNTF-behandelten Augen im Vergleich zu den Kontrollaugen für die 70% Position signifikant höher war ( $p=0,018$ ; Tabelle 22). Auch für die 30% Position war die Photorezeptoranzahl in den Augen mit den transplantierten CNTF-MSZs signifikant höher als in den kontralateralen Augen mit den transplantierten Kontroll-MSZs ( $p=0,002$ ; Tabelle 22). Ein statistischer Vergleich der Gesamtzahl von Photorezeptoren (30% und 70% Position) zwischen CNTF-behandelten Augen und Kontrollaugen ergab einen p-Wert von 0,003 (Tabelle 22).

**Tabelle 22: Statistische Auswertung der Photorezeptorzahlen in CNTF-behandelten Augen und Kontrollaugen**

t-Test LA 70% gegen RA 70%	$p=0,018$
t-Test LA 30% gegen RA 30%	$p=0,002$
t-Test LA alle gegen RA alle	$p=0,003$

## 4 Diskussion

Für neurodegenerative Erkrankungen der Netzhaut mit einem progredienten Verlust der Photorezeptoren, wie beispielsweise Retinitis pigmentosa (RP) oder altersbedingte Makuladegeneration (AMD), sind gegenwärtig keine effektiven Therapiemöglichkeiten verfügbar. Zu den möglichen Therapieansätzen, an denen zur Zeit intensiv geforscht wird und deren Wirksamkeit teilweise bereits in ersten klinischen Studien evaluiert wird, gehören: der Stammzell-basierte Ersatz von Photorezeptoren, die korrektive Gentherapie, die optogenetische Therapie, die Implantation von elektronischen Sehprothesen und neuroprotektive Ansätze (Buskamp et al., 2012; Cideciyan, 2010; Dagnelie, 2012; Schwartz et al., 2012; Smith et al., 2009; Wen et al., 2012; Wenzel et al., 2005; West et al., 2009).

In den letzten 20 Jahren wurde eine immer noch weiter ansteigende Anzahl von neurotrophen Faktoren und Zytokinen identifiziert, die neuroprotektive Effekte auf retinale Nervenzellen wie Photorezeptoren und/oder retinale Ganglienzellen aufweisen. Zu den besonders intensiv untersuchten Faktoren gehören beispielsweise „glial cell line-derived neurotrophic factor“ (GDNF), „fibroblast growth factor-2“ (FGF-2), „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF), „pigment epithelium derived neurotrophic factor“ (PEDF), „leukaemia inhibitory factor“ (LIF) oder „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF). In *in vivo* Experimenten an Tiermodellen für degenerative retinale Erkrankungen konnte für eine Vielzahl dieser Faktoren gezeigt werden, dass sie die Degeneration von Photorezeptoren und/oder retinalen Ganglienzellen Nervenzellen verzögern können und die retinale Funktion zumindest teilweise erhalten können (Almasieh et al., 2012; Buch et al., 2007; Lebrun-Julien und Di Polo, 2008; Miyazaki et al., 2003; Read et al., 2010; Unsicker, 2013; Wen et al., 2012; Wenzel et al., 2005; Wilson und Di Polo, 2012).

Trotz zum Teil beeindruckender Ergebnisse in präklinischen Studien ist eine Anwendung von neuroprotektiven Faktoren am Auge mit mehreren Schwierigkeiten und Komplikationen verbunden. So haben die neuroprotektiven Faktoren gewöhnlich nur kurze Halbwertszeiten und können i.d.R. die Blut-

Retina-Schranke nicht überqueren. Aus diesen Gründen können diese Faktoren nicht systemisch angewandt werden. Zudem können durch intraokuläre Injektionen der rekombinanten Faktoren nur geringe und kurzfristige neuroprotektive Effekte erreicht werden (Cayouette und Gravel, 1997). Für eine ausgeprägte und lang anhaltende Neuroprotektion ist es vielmehr erforderlich, die Faktoren kontinuierlich und über lange Zeiträume über intraokuläre Applikationssysteme in die erkrankten Netzhäute einzuschleusen. In präklinischen Studien wird dieses Ziel gewöhnlich über genetische Modifikationen endogener retinaler Zellen mit viralen oder nicht-viralen Expressionsvektoren erreicht (Almasieh et al., 2012; Buch et al., 2007; Harvey et al., 2006; Wenzel et al., 2005; Wilson und Di Polo, 2012).

Ein alternativer Ansatz, neuroprotektive Faktoren lokal und kontinuierlich in dystrophe Netzhäute einzuschleusen, besteht in der intraokulären Transplantation von Zellen, die genetisch so verändert wurden, dass sie stabil bestimmte Faktoren sezernieren (Gamm et al., 2007; Johnson und Martin, 2013; Jung et al., 2013; Wen et al., 2012).

Solche zellbasierten Applikationssysteme weisen im Hinblick auf mögliche klinische Anwendungen im Vergleich zu anderen Applikationsstrategien verschiedene Vorteile auf. Diese Strategie vermeidet beispielsweise eine genetische Modifikation endogener retinaler Zellen. Zudem kann in vitro vor der Transplantation definiert werden, welche Mengen an neurotrophen Faktoren in die dystrophen Netzhäute eingeschleust werden sollen. Schließlich können die genetisch modifizierten Zellen vor einer Transplantation in semipermeable Polymerkapseln verkapselt werden (Andrieu-Soler et al., 2005). Die Zellen in solchen Kapseln werden über das Kammerwasser ernährt, und umgekehrt können die sezernierten Faktoren über das Kammerwasser in die erkrankten Netzhäute gelangen. Außerdem werden die Zellen über die Verkapselung vom Immunsystem des Empfängers und die Empfängeraugen vor unerwünschten Nebenwirkungen der transplantierten Zellen geschützt. Schließlich können die verkapselten Zellen im Fall von Komplikationen aus den Augen explantiert werden, was einen weiteren wichtigen Sicherheitsaspekt dieser

Applikationsmethode darstellt (Tao, 2006; Thanos und Emerich, 2005; Wen et al., 2012).

Tatsächlich wird das therapeutische Potential einer zellbasierten kontinuierlichen Applikation von neurotrophen Faktoren über verkapselte Zellimplantate bereits in klinischen Studien an Patienten mit Retinitis pigmentosa oder geographischer Atrophie evaluiert (Birch et al., 2013; Kauper et al., 2012; Sieving et al., 2006; Talcott et al., 2011; Zhang et al., 2011a).

Stammzellen eignen sich besonders für den medizinischen Einsatz. Zum einen lassen sie sich scheinbar unbegrenzt expandieren, zum anderen sind sie vergleichsweise einfach genetisch zu modifizieren. Sie eignen sich deshalb für Zellersatzstrategien und können darüber hinaus auch als zelluläre Vektoren dienen, um therapeutisch relevante Genprodukte in erkrankte Gewebe einzuschleusen. Innerhalb der gewebespezifischen Stammzellen weisen mesenchymale Stammzellen zwei besondere Vorteile für mögliche therapeutische Anwendungen auf. Sie werden vom Körper über die ganze Lebenszeit produziert und können verhältnismäßig einfach gewonnen werden (z.B. durch Knochenmarkaspiration oder durch Mobilisierung mit G-CSF („granulozyte-colony stimulating factor“) (Hematti et al., 2004)).

Bezüglich möglicher therapeutischer Anwendungen von mesenchymalen Stammzellen bei degenerativen retinalen Erkrankungen sind Untersuchungen interessant, bei denen intravitreal transplantierte unmodifizierte MSZs im *Ped6b<sup>rd10</sup>* Mausmodell über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten einen starken vaskulotropen und neurotrophen Effekt ausübten (Otani et al., 2004). Auch andere Studien konnten einen neuroprotektiven Effekt von intraokulär transplantierten unmodifizierten mesenchymalen Stammzellen auf Photorezeptoren oder auf retinale Ganglienzellen in verschiedenen Tiermodellen für retinale Degenerationen nachweisen (Bull und Martin, 2011; Inoue et al., 2007; Johnson und Martin, 2013; Tzameret et al., 2014; Wang et al., 2010b; Zhang und Wang, 2010)

Die Mechanismen, über die unmodifizierte mesenchymale Stammzellen ihre neuroprotektive Aktivität auf retinale Nervenzellen ausüben, sind bislang

ungeklärt. In den meisten Publikationen wird die Hypothese vertreten, dass mesenchymale Stammzellen ihre neuroprotektiven Effekte über eine Sezernierung von endogen exprimierten Wachstumsfaktoren oder Zytokinen vermitteln. In Einklang mit dieser Hypothese stehen Daten, die zeigen, dass unmodifizierte mesenchymale Stammzellen verschiedene Faktoren exprimieren, die eine nachgewiesene neuroprotektive Aktivität auf Photorezeptoren und/oder retinale Ganglienzellen haben (Pan et al., 2007; Rivera et al., 2008; Wislet-Gendebien et al., 2004).

Insgesamt sind mesenchymale Stammzellen leicht isolierbar, effizient expandierbar und weisen bereits als unmodifizierte Zellen neuroprotektive Aktivitäten auf.

Aus diesen Gründen wurden für die vorliegende Arbeit mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark adulter Mäuse isoliert und adhärent in Anwesenheit von Kälberserum kultiviert und expandiert. Um einen potentiellen neuroprotektiven Effekt dieser Zellen auf Photorezeptoren weiter zu verstärken, wurden die Zellen außerdem genetisch so modifiziert, dass sie einen neuroprotektiven Faktor mit einer starken neuroprotektiven Aktivität auf Photorezeptoren überexprimierten. Dazu wurden für die vorliegenden Arbeit mesenchymale Stammzellen mit einem polycistronischen lentiviralen Vektor transduziert, der für den neuroprotektiven Faktor „ciliary neurotrophic factor“ (CNTF), das rot fluoreszierende Protein tdTomato und Blasticidin kodiert.

CNTF ist ein Mitglied der Interleukin-6 Zytokin Familie (Bauer et al., 2007), das auf eine Vielzahl von Nervenzelltypen des zentralen und peripheren Nervensystems neuroprotektive Effekte ausübt (Sendtner et al., 1994). Das Zytokin übt auch auf Photorezeptoren und retinale Ganglienzellen eine starke neuroprotektive Aktivität auf und ist der am intensivsten erforschte neuroprotektive Faktor im Kontext degenerativer retinaler Erkrankungen (Almasieh et al., 2012; Harvey et al., 2006; Lebrun-Julien und Di Polo, 2008; Wen et al., 2012; Wenzel et al., 2005; Wilson und Di Polo, 2012)

Während CNTF einen sehr starken neuroprotektiven Effekt auf die retinale Morphologie hat, wird die retinale Funktion durch das Zytokin zumindest ab

bestimmten intraokulären Konzentrationen nicht geschützt. Die retinale Funktion wird im Gegenteil durch intraokuläre Applikationen von CNTF reversibel und dosisabhängig negativ beeinflusst, was sich beispielsweise durch erniedrigte Amplituden in Elektroretinogrammen äußert. Diese negativen Effekte werden mit der Tatsache in Zusammenhang gebracht, dass das Zytokin eine Dysregulation von zahlreichen Genen induziert, unter denen sich auch Gene befinden, die für Proteine der Phototransduktion kodieren (Bush et al., 2004; Liang et al., 2001a; McGill et al., 2007; Rhee et al., 2007; Schlichtenbrede et al., 2003; Wen et al., 2006; Wen et al., 2008; Wen et al., 2012). Trotz dieser bekannten negativen Effekte des Zytokins auf die retinale Funktion wird momentan das therapeutische Potential von CNTF in Patienten mit Retinitis pigmentosa oder geographischer Atrophie evaluiert. In diesen klinischen Studien werden verkapselte retinale Pigmentepithelzellen mit einer ektopischen Expression von CNTF in den vitrealen Raum der Patienten transplantiert (Birch und Kelly, 2013; Kauper et al., 2012; Sieving et al., 2006; Talcott et al., 2011; Zhang et al., 2011a).

Für die *in vivo* Experimente wurden für die vorliegende Arbeit zunächst klonale mesenchymale Stammzelllinien mit einer starken Expression des Zytokins etabliert. Dazu wurde ausgenutzt, dass die Expressionsstärke von CNTF von dem polycistronischen lentiviralen Vektor proportional zur Expressionsstärke des rot fluoreszierenden Reporter-Proteins tdTomato ist. Aus transduzierten mesenchymalen Stammzellkulturen wurden daher einzelne Zellen mit einer besonders hohen Expression von tdTomato mittels „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) isoliert und klonal expandiert. Immunzytochemische Untersuchungen und Western Blot Analysen bestätigten eine starke und stabile Expression des Zytokins in den klonalen Stammzelllinien über einen Zeitraum von mindestens 30 Passagen (höhere Passagen wurden nicht untersucht).

Um das neuroprotektive Potential der etablierten CNTF-exprimierenden mesenchymalen Stammzelllinien *in vivo* zu untersuchen, wurden die Zellen intravitreal in *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mausmutanten transplantiert. Die *Pde6b<sup>rd1</sup>* stellt ein Tiermodell für eine autosomal rezessive Retinitis pigmentosa dar und ist durch

eine früh einsetzende und schnelle Degeneration der Photorezeptoren charakterisiert (Chang et al., 2007; LaVail und Sidman, 1974).

Die CNTF-exprimierenden Stammzellen wurden zu Beginn der retinalen Dystrophie am postnatalen Tag 8 intravitreal in die Mutanten injiziert und die Tiere am postnatalen Tag 15 zu einem Alter analysiert, zu dem in unbehandelten Mutanten bereits die meisten Photorezeptoren degeneriert sind. In das jeweils kontralaterale Auge jedes Versuchstieres wurden mesenchymale Stammzellen transplantiert, die mit einem Kontrollvektor transduziert wurden.

Die transplantierten mesenchymalen Stammzellen konnten in den Augen der *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutanten aufgrund der Expression des tdTomato Reportergens eindeutig identifiziert und charakterisiert werden. Die Spenderzellen überlebten während des gesamten Versuchszeitraums im vitrealen Raum, wo sie als dichter Verband von tdTomato/GFP-positiven Zellen am posterioren Pol der Linsen und auf der vitrealen Seite der Netzhäute zu finden waren. Obwohl eine Vielzahl von tdTomato/GFP-positiven Zellen im intravitrealen Raum nachweisbar war, konnten keine Evidenzen für eine Einwanderung der Spenderzellen in die Empfänger-Netzhäute gefunden werden. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu publizierten Daten, nach denen transplantierte mesenchymale Stammzellen effizient in Empfänger-Netzhäute integrieren (Arnhold et al., 2006). In ähnlicher Weise berichten Johnson und Mitarbeiter, dass nach intravitrealen Transplantationen von mesenchymalen Stammzellen in ein Rattenmodell für das Glaukom eine kleine Anzahl der Zellen in die Empfänger-Netzhäute einwandert (Johnson et al., 2010). Bei der Untersuchung von Arnhold et al. an „Royal College of Surgeons“ (RCS) Ratten wurde zudem eine Differenzierung der transplantierten mesenchymalen Stammzellen in retinale Pigmentepithelzellen beschrieben (Arnhold et al., 2006). Ob es sich hierbei allerdings um eine sogenannte „Transdifferenzierung“ eines mesodermalen Zelltyps in einen ektodermalen Zelltyp handelt oder lediglich um eine Zellfusion (Alvarez-Dolado et al., 2003; Terada et al., 2002; Vassilopoulos und Russell, 2003; Wang et al., 2003; Ying et al., 2002) der transplantierten Stammzellen mit endogenen RPE Zellen ist noch ungeklärt. Obwohl eine fehlende Integration der transplantierten Zellen in die Empfänger-

Netzhäute hinsichtlich möglicher therapeutischer Anwendungen positiv zu bewerten ist, verursachten die transplantierten Zellen eine andere Komplikation. In vielen Versuchstieren waren lokale Netzhaut-Ablösungen und lokale Verformungen der Netzhaut zu beobachten. Diese Ablösungen und Verformungen der Netzhäute waren häufig an Stellen zu beobachten, an denen sich viele Spenderzellen im intravitrealen Raum zwischen Linse und Netzhaut befanden. Diese Beobachtungen lassen daher vermuten, dass diese morphologischen Veränderungen auf Traktionen der Spenderzellen an der vitrealen Seite der Netzhäute verursacht werden.

Eine Analyse der experimentellen Tiere zeigte, dass in den CNTF-behandelten Augen signifikant mehr Photorezeptoren vorhanden waren als in den kontralateralen Kontrollaugen. In Abhängigkeit von der ausgewerteten Netzhautregion war die Zahl der überlebenden Photorezeptoren in den Augen mit den transplantierten CNTF-exprimierenden mesenchymalen Stammzellen 1,5-fach bis 2-fach höher als in den Augen mit den transplantierten Kontrollzellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die neuroprotektive Aktivität unmodifizierter mesenchymaler Stammzellen durch eine ektopische Expression eines neuroprotektiven Faktors signifikant erhöht werden kann. Die Ergebnisse stehen weiterhin in Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls zeigen konnten, dass die Degeneration von Photorezeptoren oder retinalen Ganglienzellen über intraokuläre Transplantationen von verschiedenen Zelltypen (wie z.B. neurale Stammzellen, retinale Pigmentepithelzellen, embryonale Stammzellen, Schwann'sche Zellen oder mesenchymale Stammzellen) mit einer ektopischen Expression unterschiedlicher neuroprotektiver Faktoren (wie z.B. glial cell line-derived growth factor, brain derived neurotrophic factor, neurotrophin-4, glucagon-like peptide-1 or ciliary neurotrophic factor) signifikant verlangsamt werden kann (Gamm et al., 2007; Gregory-Evans et al., 2009; Harper et al., 2011; Jung et al., 2013; Lawrence et al., 2004; Li et al., 2010; Logan et al., 2006; Machalinska et al., 2013; Tao et al., 2002; Zhang et al., 2011b).

Insgesamt zeigt die vorliegende Arbeit und die publizierten präklinischen Studien an verschiedenen Tiermodellen, dass intraokuläre Transplantationen

von genetisch modifizierten Zellen geeignet sind, kontinuierlich funktionell relevante Mengen an neuroprotektiven Faktoren in dystrophe Netzhäute einzuschleusen. Gleichzeitig zeigen laufende Studien an Patienten mit Retinitis pigmentosa oder geographischer Atrophie, dass intravitreale Implantationen von verkapselten und genetisch modifizierten Zellen eine klinisch anwendbare Strategie darstellen, um neuroprotektive Faktoren in humane Netzhäute einzuschleusen. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der publizierten Daten könnten genetisch modifizierte klonale mesenchymale Stammzelllinien ein geeignetes Werkzeug sein, um in präklinischen Studien an geeigneten Tiermodellen das therapeutische Potential einer zellbasierten Applikation von neuroprotektiven Faktoren zu evaluieren.

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob über intravitreale Transplantationen von genetisch modifizierten mesenchymalen Stammzellen mit einer ektopischen Expression von „ciliary neurotrophic factor“ die Degeneration von Photorezeptoren in einem Mausmodell für autosomal rezessive Retinitis pigmentosa verzögert werden kann. Dazu wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von EGFP-transgenen Mäusen isoliert und die Zellen mit einem polycistronischen lentiviralen Vektor transduziert, der für den neuroprotektiven Faktor CNTF, das Reportergen tdTomato und das Resistenzgen Blasticidin kodiert. Erfolgreich transduzierte Zellen wurden durch Gabe des Antibiotikums selektioniert, und aus den resultierenden „bulk“ Kulturen wurden klonalen Stammzelllinien mit einer starken Expression von CNTF abgeleitet. Dazu wurde ausgenutzt, dass die Expressionsstärke von CNTF und dem Reportergen tdTomato von dem polycistronischen Vektor proportional zueinander sind. Über „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) wurden daher einzelne Zellen mit einer starken Expression des Reportergens selektioniert und anschliessend klonal expandiert. Analysen solcher klonalen Zelllinien zeigten, dass in den Kulturen mit einer höheren Expression des Reportergens auch eine erhöhte Expression von CNTF zu beobachten war. Mesenchymale Stammzellen für Kontrollexperimente wurden mit einem lentiviralen Vektor transduziert, der für das Reportergen tdTomato und das Resistenzgen Blasticidin kodiert. Klonale Zelllinien mit einer starken Expression des Reportergens wurden aus diesen Kulturen wie oben beschrieben mittels FACS abgeleitet.

Um das neuroprotektive Potential der CNTF-exprimierenden klonalen mesenchymalen Stammzelllinien in vivo zu analysieren, wurden die Zellen intravitreal in die *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutante transplantiert, einem Tiermodell für autosomal rezessive Retinitis pigmentosa. Als Kontrolle wurden in die jeweils kontralateralen Augen intravitreal die Kontrollzellen transplantiert. Die Zelltransplantationen wurden zu Beginn der Photorezeptordegeneration am postnatalen Tag 8 durchgeführt. Die Netzhäute wurden am postnatalen Tag 15 analysiert, ein Alter, zu dem in unbehandelten *Pde6b<sup>rd1</sup>* Mutanten fast alle

Photorezeptoren degeneriert sind. Zur Abschätzung des neuroprotektiven Effekts wurden in zentralen Netzhautschnitten an definierten Stellen die Photorezeptoren ausgezählt. Die Analyse ergab, dass in den CNTF-behandelten Augen signifikant mehr Photorezeptoren vorhanden waren als in den kontralateralen Kontrollaugen. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass über intravitreale Transplantationen von genetisch modifizierten mesenchymalen Stammzellen funktionell relevante Mengen von neuroprotektiven Faktoren in dystrophe Netzhäute eingeschleust werden können.

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
Bsd	Blasticidin
CAG	cytomegalovirus enhancer/chicken $\beta$ -actin
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalovirus
CNTF	ciliary neurotrophic factor
cPPT	central polypurine tract
ECT	encapsulated cell technology
ES	Embryonale Stammzellen
ESchG	Embryonen Schutzgesetz
FGF-2	fibroblast growth factor-2
GABA	$\gamma$ Amminobuttersäure
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GDNF	glial cell line-derived neurotrophic factor
HEK	human embryonic kidney cells
hES	humane Embryonale Stammzellen
HLA	human leukocyte antigen
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
iPS	induzierte Pluripotente Stammzellen
IRES	internal ribosome entry site
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LeGO	lentiviralen „gene ontology“

LoxP	recognition site of Cre recombinase
mES	murine Embryonale Stammzellen
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
ND:Yag Laser	Neodym dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
NSZ	Neurale Stammzellen
Pde6b	Phosphodiesterase 6B
RCS	royal college of surgeons
rho (-/-)	Rhodopsin knockout
RPE	Retinale Pigmentepithelzellen
rpm	rounds per minute
RRE	rev-responsive element
SIN-LTR	self-inactivating long terminal repeat
wPRE	woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element
Ψ	packaging signal

## Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an meinen Doktorvater, **Herrn Prof. Dr. Udo Bartsch**, für die Vergabe des Themas, für die Bereitstellung aller nötigen Materialien und für die freundliche Unterstützung.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Betreuerin **Dr. Gila Jung**, die mich während dieser Zeit konstruktiv betreut und geduldig gefördert hat. Ihre Unterstützung stellte eine wichtige Stütze in der Durchführung der Arbeit dar und trug damit maßgeblich zum Gelingen bei.

Des Weiteren bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Forschungslabors im besonderen Sabine Helbing, Stefanie Schlichting, Kai Flachsbarth, Katharina Kruszewski, Steffen Peters, Elke Becker, Bettina Petrowitz, Claudia Lange, Sorwe Maziumi, Frank Kunst und Sabine Bartsch.

Meiner Familie, insbesondere **Felix Moser**, gebührt ein besonderer Dank, da sie mir dieses Studium ermöglichten und immer für mich da sind.

Auch all meinen **Freunden** möchte ich an dieser Stelle danken für ihre bewusste und unbewusste Motivation diese Doktorarbeit und mein Studium zu beenden.

## **Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: \_\_\_\_\_

## Literaturverzeichnis

- Acland, Aguirre, Ray, Zhang, Aleman, Cideciyan, Pearce-Kelling, Anand, Zeng, Maguire, Jacobson, Hauswirth, & Bennett. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet*, 28(1), 92-95.
- Ali, Sarra, Stephens, Alwis, Bainbridge, Munro, Fauser, Reichel, Kinnon, Hunt, Bhattacharya, & Thrasher. (2000). Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet*, 25(3), 306-310.
- Alison, Poulson, Jeffery, Dhillon, Quaglia, Jacob, Novelli, Prentice, Williamson, & Wright. (2000). Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 406(6793), 257.
- Almasieh, Wilson, Morquette, Cueva Vargas, & Di Polo. (2012). The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 31(2), 152-181.
- Alvarez-Dolado, Pardal, Garcia-Verdugo, Fike, Lee, Pfeffer, Lois, Morrison, & Alvarez-Buylla. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425(6961), 968-973.
- Amit, Carpenter, Inokuma, Chiu, Harris, Waknitz, Itskovitz-Eldor, & Thomson. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*, 227(2), 271-278.
- Andrieu-Soler, Aubert-Pouessel, Doat, Picaud, Halhal, Simonutti, Venier-Julienne, Benoit, & Behar-Cohen. (2005). Intravitreal injection of PLGA microspheres encapsulating GDNF promotes the survival of photoreceptors in the rd1/rd1 mouse. *Mol Vis*, 11, 1002-1011.
- Aoki, Hara, Nakagawa, Motohashi, Hirano, Takahashi, & Kunisada. (2006). Embryonic stem cells that differentiate into RPE cell precursors in vitro develop into RPE cell monolayers in vivo. *Exp Eye Res*, 82(2), 265-274.
- Arnhold, Absenger, Klein, Addicks, & Schraermeyer. (2007). Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245(3), 414-422.
- Arnhold, Heiduschka, Klein, Absenger, Basnaoglu, Kreppel, Henke-Fahle, Kochanek, Bartz-Schmidt, Addicks, & Schraermeyer. (2006). Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(9), 4121-4129.
- Arnhold, Klein, Semkova, Addicks, & Schraermeyer. (2004). Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(12), 4251-4255.
- Austin, & Lagasse. (2003). Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev*, 120(1), 131-135.

- Baek, Park, Sung, Lee, Han, Koh, Im, Kang, & Park. (2013). Myeloablative chemotherapy and autologous stem cell transplantation in patients with relapsed or progressed central nervous system germ cell tumors: results of Korean Society of Pediatric Neuro-Oncology (KSPNO) S-053 study. *J Neurooncol*, 114(3), 329-338.
- Baker, & Brown. (2009). Stem-cell therapy in retinal disease. *Curr Opin Ophthalmol*, 20(3), 175-181.
- Banin, Obolensky, Idelson, Hemo, Reinhardt, Pikarsky, Ben-Hur, & Reubinoff. (2006). Retinal incorporation and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 246-257.
- Bartsch, Oriyakhel, Kenna, Linke, Richard, Petrowitz, Humphries, Farrar, & Ader. (2008). Retinal cells integrate into the outer nuclear layer and differentiate into mature photoreceptors after subretinal transplantation into adult mice. *Exp Eye Res*, 86(4), 691-700.
- Bauer, Kerr, & Patterson. (2007). The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci*, 8(3), 221-232.
- Beltran, Rohrer, & Aguirre. (2005). Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha) in mammalian photoreceptor cells. *Mol Vis*, 11, 232-244.
- Ben-Hur, & Goldman. (2008). Prospects of cell therapy for disorders of myelin. *Ann N Y Acad Sci*, 1142, 218-249.
- Bennett, Zeng, Bajwa, Klatt, Li, & Maguire. (1998). Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. *Gene Ther*, 5(9), 1156-1164.
- Bi, Cui, Ma, Olshevskaya, Pu, Dizhoor, & Pan. (2006). Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron*, 50(1), 23-33.
- Birch, & Kelly. (2013). Chronic intracerebroventricular infusion of nerve growth factor improves recognition memory in the rat. *Neuropharmacology*, 75, 255-261.
- Birch, Weleber, Duncan, Jaffe, Tao, & Ciliary Neurotrophic Factor Retinitis Pigmentosa Study. (2013). Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol*, 156(2), 283-292 e281.
- Bjornson, Rietze, Reynolds, Magli, & Vescovi. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 283(5401), 534-537.
- Bok, Yasumura, Matthes, Ruiz, Duncan, Chappelow, Zolotukhin, Hauswirth, & LaVail. (2002). Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp Eye Res*, 74(6), 719-735.

- Bowes, Li, Danciger, Baxter, Applebury, & Farber. (1990). Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature*, 347(6294), 677-680.
- Branford, & Yost. (2002). Lefty-dependent inhibition of Nodal- and Wnt-responsive organizer gene expression is essential for normal gastrulation. *Curr Biol*, 12(24), 2136-2141.
- Brazelton, Rossi, Keshet, & Blau. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 290(5497), 1775-1779.
- Bryder, Rossi, & Weissman. (2006). Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*, 169(2), 338-346.
- Buch, MacLaren, & Ali. (2007). Neuroprotective gene therapy for the treatment of inherited retinal degeneration. *Curr Gene Ther*, 7(6), 434-445.
- Buchholz, Hikita, Rowland, Friedrich, Hinman, Johnson, & Clegg. (2009). Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27(10), 2427-2434.
- Bugra, & Hicks. (1997). Acidic and basic fibroblast growth factor messenger RNA and protein show increased expression in adult compared to developing normal and dystrophic rat retina. *J Mol Neurosci*, 9(1), 13-25.
- Bull, & Martin. (2011). Concise review: toward stem cell-based therapies for retinal neurodegenerative diseases. *Stem Cells*, 29(8), 1170-1175.
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz. (1990). Gesetz zum Schutz von Embryonen (Embryonenschutzgesetz - ESchG). [Online im Internet.] <http://bundesrecht.juris.de/eschg/BJNR027460990.html> [Stand:14.11.2014, 08:54]
- Bush, Lei, Tao, Raz, Chan, Cox, Santos-Muffley, & Sieving. (2004). Encapsulated cell-based intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor in normal rabbit: dose-dependent effects on ERG and retinal histology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(7), 2420-2430.
- Buskamp, Picaud, Sahel, & Roska. (2012). Optogenetic therapy for retinitis pigmentosa. *Gene Ther*, 19(2), 169-175.
- Campagnoli, Roberts, Kumar, Bennett, Bellantuono, & Fisk. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8), 2396-2402.
- Caplan. (2008). All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*, 3(3), 229-230.
- Carwile, Culbert, Sturdivant, & Kraft. (1998). Rod outer segment maintenance is enhanced in the presence of bFGF, CNTF and GDNF. *Exp Eye Res*, 66(6), 791-805.
- Cayouette, Behn, Sendtner, Lachapelle, & Gravel. (1998). Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod

- photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J Neurosci*, 18(22), 9282-9293.
- Cayouette, & Gravel. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther*, 8(4), 423-430.
- Chang, Hawes, Pardue, German, Hurd, Davisson, Nusinowitz, Rengarajan, Boyd, Sidney, Phillips, Stewart, Chaudhury, Nickerson, Heckenlively, & Boatright. (2007). Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vision Res*, 47(5), 624-633.
- Chaum. (2003). Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *J Cell Biochem*, 88(1), 57-75.
- Chen, Bakshi, Royo, Magge, & Watson. (2007). Neural stem cells as biological minipumps: a faster route to cell therapy for the CNS? *Curr Stem Cell Res Ther*, 2(1), 13-22.
- Chen, Flannery, LaVail, Steinberg, Xu, & Simon. (1996). bcl-2 overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(14), 7042-7047.
- Chong, Alexander, Waters, Barnett, Bird, & Luthert. (1999). Repeated injections of a ciliary neurotrophic factor analogue leading to long-term photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(6), 1298-1305.
- Cideciyan. (2010). Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Prog Retin Eye Res*, 29(5), 398-427.
- Conti, Cattaneo, & Papadimou. (2008). Novel neural stem cell systems. *Expert Opin Biol Ther*, 8(2), 153-160.
- Conti, Pollard, Gorba, Reitano, Toselli, Biella, Sun, Sanzone, Ying, Cattaneo, & Smith. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol*, 3(9), e283.
- Crisan, Yap, Casteilla, Chen, Corselli, Park, Andriolo, Sun, Zheng, Zhang, Norotte, Teng, Traas, Schugar, Deasy, Badyrak, Buhning, Jacobino, Lazzari, Huard, & Peault. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), 301-313.
- Cunha-Vaz. (1976). The blood-retinal barriers. *Doc Ophthalmol*, 41(2), 287-327.
- Czyz, Wiese, Rolletschek, Blyszczuk, Cross, & Wobus. (2003). Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol Chem*, 384(10-11), 1391-1409.
- Dagnelie. (2012). Retinal implants: emergence of a multidisciplinary field. *Curr Opin Neurol*, 25(1), 67-75.
- Daley, Ahrlund Richter, Auerbach, Benvenisty, Charo, Chen, Deng, Goldstein, Hudson, Hyun, Junn, Love, Lee, McLaren, Mummery, Nakatsuji, Racowsky, Rooke,

- Rossant, Scholer, Solbakk, Taylor, Trounson, Weissman, Wilmut, Yu, & Zoloth. (2007). Ethics. The ISSCR guidelines for human embryonic stem cell research. *Science*, 315(5812), 603-604.
- Das, Mallya, Zhao, Ahmad, Bhattacharya, Thoreson, Hegde, & Ahmad. (2006). Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol*, 299(1), 283-302.
- Dimos, Rodolfa, Niakan, Weisenthal, Mitsumoto, Chung, Croft, Saphier, Leibel, Golland, Wichterle, Henderson, & Eggan. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321(5893), 1218-1221.
- Dittrich, Thoenen, & Sendtner. (1994). Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Ann Neurol*, 35(2), 151-163.
- Doe, Fuerstenberg, & Peng. (1998). Neural stem cells: from fly to vertebrates. *J Neurobiol*, 36(2), 111-127.
- Dominici, Le Blanc, Mueller, Slaper-Cortenbach, Marini, Krause, Deans, Keating, Prockop, & Horwitz. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Drummond, Rodger, Penrose, Robertson, Hu, & Harvey. (2014). Effects of intravitreal injection of a Rho-GTPase inhibitor (BA-210), or CNTF combined with an analogue of cAMP, on the dendritic morphology of regenerating retinal ganglion cells. *Restor Neurol Neurosci*, 32(3), 391-402.
- Dwain, Xiangpeng, Zeng, Patricia, & Joh. (2006). Neural stem cells--a promising potential therapy for brain tumors. *Curr Stem Cell Res Ther*, 1(1), 79-84.
- Erdo, Buhrlé, Blunk, Hoehn, Xia, Fleischmann, Focking, Kustermann, Kolossov, Hescheler, Hossmann, & Trapp. (2003). Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(7), 780-785.
- Erices, Allers, Conget, Rojas, & Minguell. (2003). Human cord blood-derived mesenchymal stem cells home and survive in the marrow of immunodeficient mice after systemic infusion. *Cell Transplant*, 12(6), 555-561.
- Evans, & Kaufman. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156.
- Friedenstein, Piatetzky, & Petrakova. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16(3), 381-390.
- Friedlander, Dorrell, Ritter, Marchetti, Moreno, El-Kalay, Bird, Banin, & Aguilar. (2007). Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis*, 10(2), 89-101.
- Gage. (1998). Stem cells of the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol*, 8(5), 671-676.

- Gage. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287(5457), 1433-1438.
- Galli, Gritti, Bonfanti, & Vescovi. (2003). Neural stem cells: an overview. *Circ Res*, 92(6), 598-608.
- Gamm, Wang, Lu, Girman, Holmes, Bischoff, Shearer, Sauve, Capowski, Svendsen, & Lund. (2007). Protection of visual functions by human neural progenitors in a rat model of retinal disease. *PLoS One*, 2(3), e338.
- Gao, & Hollyfield. (1995). Basic fibroblast growth factor in retinal development: differential levels of bFGF expression and content in normal and retinal degeneration (rd) mutant mice. *Dev Biol*, 169(1), 168-184.
- Gotherstrom, Ringden, Westgren, Tammik, & Le Blanc. (2003). Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant*, 32(3), 265-272.
- Grafi, & Avivi. (2004). Stem cells: a lesson from dedifferentiation. *Trends Biotechnol*, 22(8), 388-389.
- Gregory-Evans, Chang, Hodges, & Gregory-Evans. (2009). Ex vivo gene therapy using intravitreal injection of GDNF-secreting mouse embryonic stem cells in a rat model of retinal degeneration. *Mol Vis*, 15, 962-973.
- Gruen, & Grabel. (2006). Concise review: scientific and ethical roadblocks to human embryonic stem cell therapy. *Stem Cells*, 24(10), 2162-2169.
- Gundorova, Chentsova, Kuprashvili, Zueva, Tsapenko, Saburina, Repin, & Revishchin. (2008). [Impact of xenotransplantation of multipotent mesenchymal stem cells of the bone marrow on the recovery of the structural organization and functional activity of the retina in its damage]. *Vestn Oftalmol*, 124(3), 14-18.
- Hallbook, Backstrom, Kullander, Ebendal, & Carri. (1996). Expression of neurotrophins and trk receptors in the avian retina. *J Comp Neurol*, 364(4), 664-676.
- Hanna, Wernig, Markoulaki, Sun, Meissner, Cassady, Beard, Brambrink, Wu, Townes, & Jaenisch. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 318(5858), 1920-1923.
- Harper, Grozdanic, Blits, Kuehn, Zamzow, Buss, Kardon, & Sakaguchi. (2011). Transplantation of BDNF-secreting mesenchymal stem cells provides neuroprotection in chronically hypertensive rat eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(7), 4506-4515.
- Haruta, Sasai, Kawasaki, Amemiya, Ooto, Kitada, Suemori, Nakatsuji, Ide, Honda, & Takahashi. (2004). In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(3), 1020-1025.
- Harvey, Hu, Leaver, Mellough, Park, Verhaagen, Plant, & Cui. (2006). Gene therapy and transplantation in CNS repair: the visual system. *Prog Retin Eye Res*, 25(5), 449-489.

- Hematti, Tuchman, Larochelle, Metzger, Donahue, & Tisdale. (2004). Comparison of retroviral transduction efficiency in CD34+ cells derived from bone marrow versus G-CSF-mobilized or G-CSF plus stem cell factor-mobilized peripheral blood in nonhuman primates. *Stem Cells*, 22(6), 1062-1069.
- Hirami, Osakada, Takahashi, Okita, Yamanaka, Ikeda, Yoshimura, & Takahashi. (2009). Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett*, 458(3), 126-131.
- Hirano, Yamamoto, Yoshimura, Tokunaga, Motohashi, Ishizaki, Yoshida, Okazaki, Yamazaki, Hayashi, & Kunisada. (2003). Generation of structures formed by lens and retinal cells differentiating from embryonic stem cells. *Dev Dyn*, 228(4), 664-671.
- Homma, Okamoto, Mandai, Gotoh, Rajasimha, Chang, Chen, Li, Cogliati, Swaroop, & Takahashi. (2013). Developing rods transplanted into the degenerating retina of Crx-knockout mice exhibit neural activity similar to native photoreceptors. *Stem Cells*, 31(6), 1149-1159.
- Idelson, Alper, Obolensky, Ben-Shushan, Hemo, Yachimovich-Cohen, Khaner, Smith, Wisner, Gropp, Cohen, Even-Ram, Berman-Zaken, Matzrafi, Rechavi, Banin, & Reubinoff. (2009). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell*, 5(4), 396-408.
- Ikeda, Osakada, Watanabe, Mizuseki, Haraguchi, Miyoshi, Kamiya, Honda, Sasai, Yoshimura, Takahashi, & Sasai. (2005). Generation of Rx+/Pax6+ neural retinal precursors from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(32), 11331-11336.
- In 't Anker, Scherjon, Kleijburg-van der Keur, Noort, Claas, Willemze, Fibbe, & Kanhai. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 102(4), 1548-1549.
- Inoue, Iriyama, Ueno, Takahashi, Kondo, Tamaki, Araie, & Yanagi. (2007). Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res*, 85(2), 234-241.
- Jing, Wen, Yu, Holst, Luo, Fang, Tamir, Antonio, Hu, Cupples, Louis, Hu, Altmock, & Fox. (1996). GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell*, 85(7), 1113-1124.
- Johnson, Bull, Hunt, Marina, Tomarev, & Martin. (2010). Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(4), 2051-2059.
- Johnson, & Martin. (2013). Cell transplantation approaches to retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol*, 13(1), 78-82.
- Jomary, Thomas, Grist, Milbrandt, Neal, & Jones. (1999). Expression patterns of neurturin and its receptor components in developing and degenerative mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(3), 568-574.

- Jung, Sun, Petrowitz, Riecken, Kruszewski, Jankowiak, Kunst, Skevas, Richard, Fehse, & Bartsch. (2013). Genetically modified neural stem cells for a local and sustained delivery of neuroprotective factors to the dystrophic mouse retina. *Stem Cells Transl Med*, 2(12), 1001-1010.
- Kauper, McGovern, Sherman, Heatherton, Rapoza, Stabila, Dean, Lee, Borges, Bouchard, & Tao. (2012). Two-year intraocular delivery of ciliary neurotrophic factor by encapsulated cell technology implants in patients with chronic retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(12), 7484-7491.
- Kawasaki, Suemori, Mizuseki, Watanabe, Urano, Ichinose, Haruta, Takahashi, Yoshikawa, Nishikawa, Nakatsuji, & Sasai. (2002). Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(3), 1580-1585.
- Klimanskaya, Chung, Becker, Lu, & Lanza. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*, 444(7118), 481-485.
- Klimanskaya, Hipp, Rezai, West, Atala, & Lanza. (2004). Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells*, 6(3), 217-245.
- Krause, Theise, Collector, Henegariu, Hwang, Gardner, Neutzel, & Sharkis. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105(3), 369-377.
- Kwan, Wang, & Lund. (1999). Photoreceptor layer reconstruction in a rodent model of retinal degeneration. *Exp Neurol*, 159(1), 21-33.
- Lagasse, Connors, Al-Dhalimy, Reitsma, Dohse, Osborne, Wang, Finegold, Weissman, & Grompe. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*, 6(11), 1229-1234.
- Laird, von Andrian, & Wagers. (2008). Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease. *Cell*, 132(4), 612-630.
- Lakowski, Han, Pearson, Gonzalez-Cordero, West, Gualdoni, Barber, Hubank, Ali, & Sowden. (2011). Effective transplantation of photoreceptor precursor cells selected via cell surface antigen expression. *Stem Cells*, 29(9), 1391-1404.
- Lamba, Karl, Ware, & Reh. (2006). Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(34), 12769-12774.
- Lamba, McUsic, Hirata, Wang, Russell, & Reh. (2010). Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 5(1), e8763.
- Lange, Schroeder, Stute, Lioznov, & Zander. (2005). High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 14(1), 70-80.
- LaVail, & Sidman. (1974). C57BL-6J mice with inherited retinal degeneration. *Arch Ophthalmol*, 91(5), 394-400.

- LaVail, Unoki, Yasumura, Matthes, Yancopoulos, & Steinberg. (1992). Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(23), 11249-11253.
- LaVail, Yasumura, Matthes, Drenser, Flannery, Lewin, & Hauswirth. (2000). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21), 11488-11493.
- LaVail, Yasumura, Matthes, Lau-Villacorta, Unoki, Sung, & Steinberg. (1998). Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(3), 592-602.
- Lawrence, Keegan, Muir, Coffey, Rogers, Wilby, Fawcett, & Lund. (2004). Transplantation of Schwann cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(1), 267-274.
- Lazarus, Phillips, Herzig, Hurd, Wolff, & Herzig. (2008). High-dose melphalan and the development of hematopoietic stem-cell transplantation: 25 years later. *J Clin Oncol*, 26(14), 2240-2243.
- Lebrun-Julien, & Di Polo. (2008). Molecular and cell-based approaches for neuroprotection in glaucoma. *Optom Vis Sci*, 85(6), 417-424.
- Lewin, Drenser, Hauswirth, Nishikawa, Yasumura, Flannery, & LaVail. (1998). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med*, 4(8), 967-971.
- Li, Cai, & Li. (2006). Repair of spinal cord injury by neural stem cells modified with BDNF gene in rats. *Neurosci Bull*, 22(1), 34-40.
- Li, Tao, Luo, Huang, Kauper, Stabila, Lavail, Laties, & Wen. (2010). CNTF induces regeneration of cone outer segments in a rat model of retinal degeneration. *PLoS One*, 5(3), e9495.
- Li, Wen, Banzon, Maminishkis, & Miller. (2011). CNTF mediates neurotrophic factor secretion and fluid absorption in human retinal pigment epithelium. *PLoS One*, 6(9), e23148.
- Liang, Aleman, Dejneka, Dudus, Fisher, Maguire, Jacobson, & Bennett. (2001a). Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, 4(5), 461-472.
- Liang, Dejneka, Cohen, Krasnoperova, Lem, Maguire, Dudus, Fisher, & Bennett. (2001b). AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol Ther*, 3(2), 241-248.
- Logan, Ahmed, Baird, Gonzalez, & Berry. (2006). Neurotrophic factor synergy is required for neuronal survival and disinhibited axon regeneration after CNS injury. *Brain*, 129(Pt 2), 490-502.

- Lu, Malcuit, Wang, Girman, Francis, Lemieux, Lanza, & Lund. (2009). Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells*, 27(9), 2126-2135.
- Machalinska, Kawa, Pius-Sadowska, Stepniewski, Nowak, Roginska, Kaczynska, Baumert, Wiszniewska, Jozkowicz, Dulak, & Machalinski. (2013). Long-term neuroprotective effects of NT-4-engineered mesenchymal stem cells injected intravitreally in a mouse model of acute retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(13), 8292-8305.
- MacLaren, Pearson, MacNeil, Douglas, Salt, Akimoto, Swaroop, Sowden, & Ali. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature*, 444(7116), 203-207.
- Mapara, Stevenson, Thompson, & Ehtesham. (2007). Stem cells as vehicles for the treatment of brain cancer. *Neurosurg Clin N Am*, 18(1), 71-80, ix.
- Marinone, & Corso. (1956). [A new prospect in transfusion therapy: bone marrow transplantation]. *Riv Emoter Immunoematol*, 3(6), 411-418.
- Martin. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7634-7638.
- Masu, Wolf, Holtmann, Sendtner, Brem, & Thoenen. (1993). Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature*, 365(6441), 27-32.
- McGee Sanftner, Abel, Hauswirth, & Flannery. (2001). Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*, 4(6), 622-629.
- McGill, Prusky, Douglas, Yasumura, Matthes, Nune, Donohue-Rolfe, Yang, Niculescu, Hauswirth, Girman, Lund, Duncan, & LaVail. (2007). Intraocular CNTF reduces vision in normal rats in a dose-dependent manner. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(12), 5756-5766.
- McKay. (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276(5309), 66-71.
- McLaughlin, Sandberg, Berson, & Dryja. (1993). Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet*, 4(2), 130-134.
- Mellough, Cui, & Harvey. (2007). Treatment of adult neural progenitor cells prior to transplantation affects graft survival and integration in a neonatal and adult rat model of selective retinal ganglion cell depletion. *Restor Neurol Neurosci*, 25(2), 177-190.
- Meyer, Katz, Maruniak, & Kirk. (2006). Embryonic stem cell-derived neural progenitors incorporate into degenerating retina and enhance survival of host photoreceptors. *Stem Cells*, 24(2), 274-283.

- Meyer, Shearer, Capowski, Wright, Wallace, McMillan, Zhang, & Gamm. (2009). Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(39), 16698-16703.
- Mezey, Chandross, Harta, Maki, & McKercher. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 290(5497), 1779-1782.
- Miyazaki, Ikeda, Yonemitsu, Goto, Sakamoto, Tabata, Ueda, Hasegawa, Tobimatsu, Ishibashi, & Sueishi. (2003). Simian lentiviral vector-mediated retinal gene transfer of pigment epithelium-derived factor protects retinal degeneration and electrical defect in Royal College of Surgeons rats. *Gene Ther*, 10(17), 1503-1511.
- Morrison. (2001). Stem cell potential: can anything make anything? *Curr Biol*, 11(1), R7-9.
- Morrison, Shah, & Anderson. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88(3), 287-298.
- Nakahara, Takagi, Hattori, Wakitani, & Yoshida. (2005). Effect of Subcultivation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem on their Capacities for Chondrogenesis, Supporting Hematopoiesis, and Telomea Length. *Cytotechnology*, 47(1-3), 19-27.
- Nistor, Seiler, Yan, Ferguson, & Keirstead. (2010). Three-dimensional early retinal progenitor 3D tissue constructs derived from human embryonic stem cells. *J Neurosci Methods*, 190(1), 63-70.
- Osakada, Ikeda, Mandai, Wataya, Watanabe, Yoshimura, Akaike, Sasai, & Takahashi. (2008). Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 26(2), 215-224.
- Osakada, Ikeda, Sasai, & Takahashi. (2009a). Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc*, 4(6), 811-824.
- Osakada, Jin, Hirami, Ikeda, Danjyo, Watanabe, Sasai, & Takahashi. (2009b). In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J Cell Sci*, 122(Pt 17), 3169-3179.
- Otani, Dorrell, Kinder, Moreno, Nusinowitz, Banin, Heckenlively, & Friedlander. (2004). Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest*, 114(6), 765-774.
- Otani, Kinder, Ewalt, Otero, Schimmel, & Friedlander. (2002). Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med*, 8(9), 1004-1010.
- Pan, Cheng, Chen, Lai, Lee, Yang, Chang, & Ho. (2007). Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci*, 14(11), 1089-1098.

- Panepucci, Siufi, Silva, Proto-Siquiera, Neder, Orellana, Rocha, Covas, & Zago. (2004). Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 22(7), 1263-1278.
- Parameswaran, Balasubramanian, Babai, Qiu, Eudy, Thoreson, & Ahmad. (2010). Induced pluripotent stem cells generate both retinal ganglion cells and photoreceptors: therapeutic implications in degenerative changes in glaucoma and age-related macular degeneration. *Stem Cells*, 28(4), 695-703.
- Park, Zhao, West, Yabuuchi, Huo, Ince, Lerou, Lensch, & Daley. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175), 141-146.
- Pearson, Barber, Rizzi, Hippert, Xue, West, Duran, Smith, Chuang, Azam, Luhmann, Benucci, Sung, Bainbridge, Carandini, Yau, Sowden, & Ali. (2012). Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature*, 485(7396), 99-103.
- Raff. (2003). Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 1-22.
- Rakoczy, Humphrey, Cavaney, Chu, & Constable. (1993). Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in the retina of Royal College of Surgeons rats. A comparative study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 34(5), 1845-1852.
- Read, Cashman, & Kumar-Singh. (2010). POD nanoparticles expressing GDNF provide structural and functional rescue of light-induced retinal degeneration in an adult mouse. *Mol Ther*, 18(11), 1917-1926.
- Reynolds, & Weiss. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. [nicht als PDF]. *Science*, 255(5052), 1707-1710.
- Rhee, Ruiz, Duncan, Hauswirth, Lavail, Bok, & Yang. (2007). Molecular and cellular alterations induced by sustained expression of ciliary neurotrophic factor in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(3), 1389-1400.
- Ripa, Haack-Sorensen, Wang, Jorgensen, Mortensen, Bindslev, Friis, & Kastrup. (2007). Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the Stem Cells in Myocardial Infarction (STEMMI) trial. *Circulation*, 116(11 Suppl), I24-30.
- Ripa, Jorgensen, & Kastrup. (2013). Clinical outcome after stem cell mobilization with granulocyte-colony-stimulating factor after acute ST-elevation myocardial infarction: 5-year results of the STEMMI trial. *Scand J Clin Lab Invest*, 73(2), 125-129.
- Ritter, Banin, Moreno, Aguilar, Dorrell, & Friedlander. (2006). Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J Clin Invest*, 116(12), 3266-3276.

- Rivera, Kandasamy, Couillard-Despres, Caioni, Sanchez, Huber, Weidner, Bogdahn, & Aigner. (2008). Oligodendrogenesis of adult neural progenitors: differential effects of ciliary neurotrophic factor and mesenchymal stem cell derived factors. *J Neurochem*, *107*(3), 832-843.
- Sampath, Nathanson, & Reddi. (1984). In vitro transformation of mesenchymal cells derived from embryonic muscle into cartilage in response to extracellular matrix components of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*(11), 3419-3423.
- Schlichtenbrede, MacNeil, Bainbridge, Tschernutter, Thrasher, Smith, & Ali. (2003). Intraocular gene delivery of ciliary neurotrophic factor results in significant loss of retinal function in normal mice and in the Prph2Rd2/Rd2 model of retinal degeneration. *Gene Ther*, *10*(6), 523-527.
- Schwartz, Hubschman, Heilwell, Franco-Cardenas, Pan, Ostrick, Mickunas, Gay, Klimanskaya, & Lanza. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*, *379*(9817), 713-720.
- Schwartz, Reyes, Koodie, Jiang, Blackstad, Lund, Lenvik, Johnson, Hu, & Verfaillie. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*, *109*(10), 1291-1302.
- Sendtner, Carroll, Holtmann, Hughes, & Thoenen. (1994). Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol*, *25*(11), 1436-1453.
- Sieving, Caruso, Tao, Coleman, Thompson, Fullmer, & Bush. (2006). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(10), 3896-3901.
- Sleeman, Anderson, Lambert, Yancopoulos, & Wiegand. (2000). The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv*, *74*(2-3), 265-272.
- Smith, Bainbridge, & Ali. (2009). Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends Genet*, *25*(4), 156-165.
- Somerman, Nathanson, Sauk, & Manson. (1987). Human dentin matrix induces cartilage formation in vitro by mesenchymal cells derived from embryonic muscle. *J Dent Res*, *66*(10), 1551-1558.
- Stemple, & Anderson. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, *71*(6), 973-985.
- Sugie, Yoshikawa, Uji, Saito, Moriya, Ishizaka, Matsuura, Maruoka, Nawa, & Hara. (2005). Photoreceptor cells from mouse ES cells by co-culture with chick embryonic retina. *Biochem Biophys Res Commun*, *332*(1), 241-247.
- Suter, & Krause. (2008). Neural commitment of embryonic stem cells: molecules, pathways and potential for cell therapy. *J Pathol*, *215*(4), 355-368.

- Takahashi, Palmer, Takahashi, & Gage. (1998). Widespread integration and survival of adult-derived neural progenitor cells in the developing optic retina. *Mol Cell Neurosci*, 12(6), 340-348.
- Takahashi, Tanabe, Ohnuki, Narita, Ichisaka, Tomoda, & Yamanaka. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872.
- Takahashi, & Yamanaka. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
- Takahashi, Yokoji, Misawa, Hayashi, Hu, & Deguchi. (1994). A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet*, 7(1), 79-84.
- Talcott, Ratnam, Sundquist, Lucero, Lujan, Tao, Porco, Roorda, & Duncan. (2011). Longitudinal study of cone photoreceptors during retinal degeneration and in response to ciliary neurotrophic factor treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(5), 2219-2226.
- Tao. (2006). Application of encapsulated cell technology for retinal degenerative diseases. *Expert Opin Biol Ther*, 6(7), 717-726.
- Tao, Wen, Goddard, Sherman, O'Rourke, Stabila, Bell, Dean, Kauper, Budz, Tsiaras, Acland, Pearce-Kelling, Laties, & Aguirre. (2002). Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(10), 3292-3298.
- Temple. (2001a). The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859), 112-117.
- Temple. (2001b). Stem cell plasticity--building the brain of our dreams. *Nat Rev Neurosci*, 2(7), 513-520.
- Terada, Hamazaki, Oka, Hoki, Mastalerz, Nakano, Meyer, Morel, Petersen, & Scott. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416(6880), 542-545.
- Thanos, & Emerich. (2005). Delivery of neurotrophic factors and therapeutic proteins for retinal diseases. *Expert Opin Biol Ther*, 5(11), 1443-1452.
- Thomas, Liu, & Link. (2002). Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*, 9(3), 183-189.
- Thomson, Itskovitz-Eldor, Shapiro, Waknitz, Swiergiel, Marshall, & Jones. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147.
- Thomson, Kalishman, Golos, Durning, Harris, Becker, & Hearn. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(17), 7844-7848.

- Thomson, Kalishman, Golos, Durning, Harris, & Hearn. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 55(2), 254-259.
- Tomita, Adachi, Yamada, Takahashi, Kiuchi, Oyaizu, Ikebukuro, Kaneda, Matsumura, & Ikehara. (2002). Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells*, 20(4), 279-283.
- Tucker, Park, Qi, Klassen, Jiang, Yao, Redenti, Daley, & Young. (2011). Transplantation of adult mouse iPS cell-derived photoreceptor precursors restores retinal structure and function in degenerative mice. *PLoS One*, 6(4), e18992.
- Tzameret, Sher, Belkin, Treves, Meir, Nagler, Levkovitch-Verbin, Barshack, Rosner, & Rotenstreich. (2014). Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells as a thin subretinal layer ameliorates retinal degeneration in a rat model of retinal dystrophy. *Exp Eye Res*, 118, 135-144.
- Unsicker. (2013). Neurotrophic molecules in the treatment of neurodegenerative disease with focus on the retina: status and perspectives. *Cell Tissue Res*, 353(2), 205-218.
- Van Hoffelen, Young, Shatos, & Sakaguchi. (2003). Incorporation of murine brain progenitor cells into the developing mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(1), 426-434.
- Vassilopoulos, & Russell. (2003). Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. *Curr Opin Genet Dev*, 13(5), 480-485.
- Vollrath, Feng, Duncan, Yasumura, D'Cruz, Chappelow, Matthes, Kay, & LaVail. (2001). Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of *Mertk*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(22), 12584-12589.
- Vugler, Lawrence, Walsh, Carr, Gias, Semo, Ahmado, da Cruz, Andrews, & Coffey. (2007). Embryonic stem cells and retinal repair. *Mech Dev*, 124(11-12), 807-829.
- Wang, Brown, Alayon, & Stuck. (2010a). Transplantation of quantum dot-labelled bone marrow-derived stem cells into the vitreous of mice with laser-induced retinal injury: survival, integration and differentiation. *Vision Res*, 50(7), 665-673.
- Wang, Girman, Lu, Bischoff, Holmes, Shearer, Wright, Svendsen, Gamm, & Lund. (2008). Long-term vision rescue by human neural progenitors in a rat model of photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(7), 3201-3206.
- Wang, Lu, Girman, Duan, McFarland, Zhang, Grompe, Adamus, Appukuttan, & Lund. (2010b). Non-invasive stem cell therapy in a rat model for retinal degeneration and vascular pathology. *PLoS One*, 5(2), e9200.
- Wang, Willenbring, Akkari, Torimaru, Foster, Al-Dhalimy, Lagasse, Finegold, Olson, & Grompe. (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 422(6934), 897-901.

- Weber, Bartsch, Stocking, & Fehse. (2008). A multicolor panel of novel lentiviral "gene ontology" (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol Ther*, 16(4), 698-706.
- Weber, Mock, Petrowitz, Bartsch, & Fehse. (2010). Lentiviral gene ontology (LeGO) vectors equipped with novel drug-selectable fluorescent proteins: new building blocks for cell marking and multi-gene analysis. *Gene Ther*, 17(4), 511-520.
- Wen, Song, Kjellstrom, Tanikawa, Liu, Li, Zhao, Bush, Laties, & Sieving. (2006). Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci*, 26(52), 13523-13530.
- Wen, Song, Liu, Li, Zhao, & Laties. (2008). CNTF negatively regulates the phototransduction machinery in rod photoreceptors: implication for light-induced photostasis plasticity. *Adv Exp Med Biol*, 613, 407-413.
- Wen, Tao, Li, & Sieving. (2012). CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res*, 31(2), 136-151.
- Wenzel, Grimm, Samardzija, & Reme. (2005). Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*, 24(2), 275-306.
- Wernig, Zhao, Pruszak, Hedlund, Fu, Soldner, Broccoli, Constantine-Paton, Isacson, & Jaenisch. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(15), 5856-5861.
- West, Pearson, MacLaren, Sowden, & Ali. (2009). Cell transplantation strategies for retinal repair. *Prog Brain Res*, 175, 3-21.
- Wilson, & Di Polo. (2012). Gene therapy for retinal ganglion cell neuroprotection in glaucoma. *Gene Ther*, 19(2), 127-136.
- Wislet-Gendebien, Bruyere, Hans, Leprince, Moonen, & Rogister. (2004). Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. *BMC Neurosci*, 5, 33.
- Yamada, & Ueda. (2006). [Regenerative medicine for bone using mesenchymal stem cells]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*, 43(3), 338-341.
- Ying, Nichols, Evans, & Smith. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416(6880), 545-548.
- Young, Ray, Whiteley, Klassen, & Gage. (2000). Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Mol Cell Neurosci*, 16(3), 197-205.
- Yu, Vodyanik, Smuga-Otto, Antosiewicz-Bourget, Frane, Tian, Nie, Jonsdottir, Ruotti, Stewart, Slukvin, & Thomson. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917-1920.

- Zhang, Hopkins, Heier, Birch, Halperin, Albini, Brown, Jaffe, Tao, & Williams. (2011a). Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(15), 6241-6245.
- Zhang, Ivanova, Bi, & Pan. (2009). Ectopic expression of multiple microbial rhodopsins restores ON and OFF light responses in retinas with photoreceptor degeneration. *J Neurosci*, 29(29), 9186-9196.
- Zhang, Shan, Ma, Jiang, Chen, Wen, Zhou, Qian, & Pei. (2003). [Observation of bone marrow mesenchymal stem cells after subretinally transplanted into laser-injured rat retina]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 83(22), 1993-1998.
- Zhang, Shan, Ma, Jiang, Chen, Wen, Zhou, Qian, & Pei. (2004). Differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells into retina in normal and laser-injured rat eye. *Sci China C Life Sci*, 47(3), 241-250.
- Zhang, & Wang. (2010). Effects of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on light-damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(7), 3742-3748.
- Zhang, Zhang, Xu, Ma, Wallrapp, & Jonas. (2011b). Neuroprotective effect of intravitreal cell-based glucagon-like peptide-1 production in the optic nerve crush model. *Acta Ophthalmol*, 89(4), e320-326.
- Zrenner, Bartz-Schmidt, Benav, Besch, Bruckmann, Gabel, Gekeler, Greppmaier, Harscher, Kibbel, Koch, Kusnyerik, Peters, Stingl, Sachs, Stett, Szurman, Wilhelm, & Wilke. (2011). Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words. *Proc Biol Sci*, 278(1711), 1489-1497.
- Zwaka, & Thomson. (2005a). Differentiation of human embryonic stem cells occurs through symmetric cell division. *Stem Cells*, 23(2), 146-149.
- Zwaka, & Thomson. (2005b). A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development*, 132(2), 227-233.