

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zielsetzung.....	6
1.2	Möglichkeiten der Gentherapie in der Tiermedizin	8
1.3	Gentransfervektoren.....	10
1.3.1	Adenoviren	14
1.3.1.1	Aufbau von Adenoviren	14
1.3.1.2	Organisation des adenoviralen Genoms	15
1.3.1.3	Lebenszyklus von Adenoviren.....	16
1.3.2	Adenoviraler Gentransfer und Sicherheitsaspekte	18
1.3.3	Retroviraler Gentransfer und Lentivirusvektoren.....	21
1.3.4	Chimäre Vektoren.....	21
1.3.5	Nicht-virale Vektoren	22
1.4	Reportergene	23
1.4.1	β-Galaktosidase	23
1.4.2	Grün fluoreszierendes Protein (Green fluorescent protein).....	24
1.4.3	Sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP)	25
1.5	Mögliche Zielzellen eines gentherapeutischen Ansatzes bei neurodegenerativen Erkrankungen	25
1.6	Auswahl spezifischer Hirnareale für einen möglichen gentherapeutischen Ansatz.....	28
1.7	Therapeutisch relevante Substanzen für einen gentherapeutischen Einsatz	30

2	MATERIAL UND METHODEN	32
2.1	Adenoviraler Vektor.....	32
2.2	Untersuchung zur Transduktionseffizienz der adenoviralen Vektoren in-vitro	34
2.3	Kultur der verwendeten Zelllinien	34
2.3.1	Astrozytenprogenitorzellen aus der embryonalen Ratte.....	34
2.3.2	Humane Astrozyten aus Resektatmaterial	35
2.3.3	Neural differenzierte embryonale Stammzellen.....	36
2.3.4	Neurale Differenzierung der ES-Zellen.....	38
2.3.5	Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark.....	40
2.4	Transfektion der verschiedenen Zellen	41
2.4.1	Transfektion von Rattenastrozyten nach Behandlung mit einem Proliferationsinhibitor	42
2.5	Stereotaktische Injektion der adenoviralen Vektoren	43
2.6	Anbringen einer permanenten Sonde in den lateralen Ventrikel bei der Ratte.....	44
2.7	Histologische Präparation des Rattengehirns	46
2.8	Histochemische Nachweisverfahren	48
2.8.1	Immunzytochemie/Immunhistochemie	51
2.8.2	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (KLSM)	54
2.8.3	Luminometrischer Nachweis	55
3	ERGEBNISSE.....	57
3.1	In-vitro Versuche	57
3.1.1	Ermittlung der Transduktionseffizienz in astrozytären Vorläuferzellen der Ratte und des Menschen	58

3.1.2	Ermittlung der Transduktionseffizienz in neural differenzierten ES-Zellen.....	62
3.1.3	Ermittlung der Transduktionseffizienz in mesenchymalen Stammzellen aus dem humanen Knochenmark.....	66
3.1.4	Nachweis der Expression des Reporterenzym SEAP und Detektion im Kulturüberstand der potentiellen astrozytären Progenitorzellen.....	67
3.2	In-vivo Versuche	70
3.2.1	Transplantation von vektorinfizierten Trägerzellen in das ZNS	70
3.3	Direkte intrazerebrale Vektorinjektion zur Validierung eines in-vivo gentherapeutischen Versuchsansatzes	74
3.3.1	Vektorinjektion in das Ventrikelsystem.....	82
3.4	Direkte Vektorapplikation in den lateralen Ventrikel über einen permanenten Zugang	88
4	DISKUSSION.....	92
4.1	Kritik der Methoden	92
4.2	Diskussion der Befunde	96
4.3	Schlussfolgerungen.....	105
5	ZUSAMMENFASSUNG	106
6	SUMMARY.....	108
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	110
8	ANHANG	124

LEBENS LAUF 127

Vorabveröffentlichungen..... 128

Danksagung 129

Selbständigkeitsversicherung..... 130