

# 1 Einleitung

Die rasante Entwicklung in der Molekularbiologie während der letzten Jahre macht die Anwendung gentherapeutischer Behandlungsmöglichkeiten immer wahrscheinlicher. In der molekularbiologischen und medizinischen Forschung spielen der effiziente Transfer der rekombinanten DNA und die adäquate Expression von therapeutisch relevanten Genen eine entscheidende Rolle. Der DNA-Transfer kann dabei sehr unterschiedlich erfolgen. Während in der Grundlagenforschung neben viralen auch nicht-virale Transfermethoden, wie die DNA-Kalziumphosphat-Kopräzipitation, Elektroporation und Mikroporation zur Transduktion von Zelllinien verwendet werden, finden in der medizinischen Forschung zur Etablierung von gentherapeutischen Behandlungsstrategien hauptsächlich virale Transfermethoden Anwendung. Zur Validierung gentherapeutischer Verfahren werden zurzeit vor allem retrovirale und adenovirale Vektorsysteme aufgrund ihrer effizienten ex-vivo und in-vivo Transduktionseigenschaften von unterschiedlichen Zelltypen genutzt.

Unter Gentherapie versteht man generell das Einbringen von einem oder mehreren funktionsfähigen Genen in somatische Zellen zu therapeutischen Zwecken, d. h., zur Heilung oder Linderung erbter genetischer Defekte oder erworbener Krankheiten. Grundsätzlich unterscheidet man bei der Gentherapie zwischen einem in-vivo und einem ex-vivo Ansatz. Bei der in-vivo Methode wird der Vektor direkt in ein Gewebe injiziert, sodass die transfizierten Zellen in die Lage versetzt werden, die gewünschten Enzyme oder Faktoren zu synthetisieren. Dagegen werden bei der ex-vivo Methode Zellen in Kultur transfiziert, bevor diese dann in ein Empfängergewebe transplantiert werden, wo sie ebenfalls die gewünschten Faktoren produzieren (HORELLOU und MALLET, 1997). Die Expression der Gene steht unter der Kontrolle von Promotoren. Virale oder nicht-virale Promotoren, die konstitutiv, gewebespezifisch oder regulierbar aktiv sind, können für die Expression eines Proteins oder einer funktionellen RNA verwendet werden. Unter einem konstitutiv aktiven Promoter versteht man einen Promoter, der in nahezu allen Geweben unabhängig vom physiologischen Zustand der Zelle die Transkription des nach geschalteten Gens vermittelt. Der Simian Virus 40 (SV 40) bzw. der humane oder murine Cytomegalie Virus-Promoter (CMV) kann z.B. zur konstitutiven Expression eines Gens verwendet werden. Unter einem gewebespezifischen Promoter versteht man einen Promoter, der die Transkription

des nach geschalteten Gens nur in einem bestimmten Gewebe vermittelt. Die Verwendung eines solchen Promoters erlaubt die gewebespezifische Expression eines Proteins oder einer funktionellen RNA in verschiedenen Zelltypen. Unter einem regulierbaren Promoter versteht man einen solchen, der beispielsweise in Abhängigkeit von der Stoffwechselsituation der Zelle, der Konzentration eines Moleküls oder der Temperatur die Transkription eines Gens vermittelt (ADAMS und RINNE, 1982; TANGUAY, 1983). Die Genexpression kann quantitativ und qualitativ durch die Verwendung eines regulierbaren Expressionssystems kontrolliert werden. Ein Beispiel für die Verwendung eines solchen regulierbaren Genexpressionssystems ist das Tetrazyklin-abhängige Genexpressionssystem (GOSSEN und BUJARD, 1992) und das Mifepriston-abhängige Genexpressionssystem (WANG et al., 1994). Die Regulation eines eingebrachten therapeutischen Gens bietet die Möglichkeit, die Expressionsleistung zu variieren und so den verschiedenen Umständen anzupassen. Eine langfristige und stabile Expression eines solchen Gens ist zur Therapie einer Vielzahl von angeborenen und erworbenen Erkrankungen erforderlich. Für viele Anwendungen ist gerade die langfristige Produktion von therapeutischen Proteinen das entscheidende Kriterium für das Erzielen eines therapeutischen Effektes.

Die Notwendigkeit der Gentherapie ergibt sich aus dem Fehlen anderer effizienter Behandlungsmöglichkeiten bzw. deren starker Nebenwirkungen (z.B. bei der Chemotherapie bei Tumoren) oder sehr kostenintensiven Therapieverfahren. In Tab. 1 sind einige Beispiele für Krankheiten aufgelistet, die für eine gentherapeutische Behandlung in Frage kommen (VERMA und SOMIA, 1997).

| <b>Krankheit</b>                              | <b>Defekt</b>  | <b>Häufigkeit</b>                                      | <b>Zielzellen</b>  |
|---|--|--|--|
| Cystische Fibrose                             | Gestörter Transport von Salzen im Lungenepithel<br>Verlust des CFTR-Gens | 1:2.500<br>Kinder                                      | Atemwege, einschließlich der Lunge   |
| Familiäre Hypercholesterinämie                | Defizienz an „low density“ Lipoprotein (LDL)-Rezeptor                    | 1:1.000.000  | Leberzellen  |
| Hämophilie A<br>Hämophilie B                  | Faktor VIII Defizienz<br>Faktor IX Defizienz<br>Gerinnungsstörung        | 1:10.000<br>Männer<br>1:30.000<br>Männer               | Leber/Muskelzellen,<br>Fibroblasten, Knochenmarkszellen<br>Einführung des Faktor IX Gens |
| Schwere kombinierte Immundefizienz (SCID/ADA) | Adenosin-desaminase (ADA) in 25% der SCID-Patienten                      | Selten   | Knochenmarkszellen oder T-Lymphozyten  |
| Tumorerkrankungen                             | Vielzahl von Ursachen, genetische Prädisposition und Umwelt              | 1.000.000 pro Jahr in den USA                          | Vielzahl an Krebszelltypen: Gehirn, Brust, Niere, Pankreas u.a.                          |
| Neurologische Erkrankungen                    | M. Parkinson, Alzheimer, Trauma der Wirbelsäule                          | 1.000.000 Parkinson (USA)<br>4.000.000 Alzheimer (USA) | Direkte Injektion in das Gehirn: Nerven-, Glia-, und Schwannzellen                       |
| Kardiovaskuläre Erkrankungen                  | Retinosis und Arteriosklerose  | 13.000.000 (USA)                                       | Arterien, vaskuläre Endothelzellen   |
| Infektionskrankheiten                         | AIDS, Hepatitis B  | Steigende Anzahl                                       | T-Zellen, Leber, Makrophagen   |

Tab. 1: Anwendungsmöglichkeiten der somatischen Gentherapie.

Gentherapeutische Möglichkeiten werden schon seit mehr als drei Jahrzehnten erörtert (TATUM, 1966).

Nachdem erste gentherapeutische Erfolge 1982 bei Fruchtfliegen erzielt wurden (RUBIN und SPRADLING, 1982), konnte 1984 die erste gentherapeutische Heilung eines genetischen Defekts in Mäusen, bei denen ein defizientes Wachstumshormon ersetzt wurde, veröffentlicht werden (HAMMER et al., 1984).

Die erste Gentherapie-Studie am Menschen wurde 1990 zur Behandlung der Adenosindesaminasemangelkrankheit (ADA) durchgeführt (ANDERSON et al., 1990). Einer vierjährigen Patientin wurden dabei intakte ADA-Gene mit Hilfe von „entschärften“ Adenoviren ex-vivo, also außerhalb des Körpers, in die weißen Blutkörperchen (T-Zellen) eingeschleust und reimplantiert.

Inzwischen wurden bisher schätzungsweise 3.500 Patienten in gentherapeutische Projekte eingebunden (ROMANO et al., 2000). Dabei befassten sich weltweit etwa 70% aller gentherapeutischen Ansätze mit der Behandlung von Tumorerkrankungen, 14% mit monogenetischen Erkrankungen (hauptsächlich mit der Cystischen Fibrose), 10% mit Infektionskrankheiten (hauptsächlich mit AIDS/humanes Immundefizienz-Virus, HIV I) und 6% mit verschiedenen anderen Erkrankungen (MORGAN und BLAESE, 1999). Obwohl die Tendenz weiterhin steigend ist, sind die Erfolge gentherapeutischer Programme noch gering. Eine erfolgreiche Gentherapie setzt nicht nur die Identifizierung eines geeigneten therapeutischen Gens voraus, sondern auch den effizienten Transfer des zu korrigierenden Gens in die gewünschten somatischen Zielzellen sowie die entsprechende regulierte Produktion des Transgens zur Heilung oder Linderung der Krankheitssymptome.

Ein erster großer Erfolg der Gentherapie zeigte sich kürzlich unter Verwendung eines retroviralen Vektors in der Behandlung der schweren kombinierten Immundefizienz SCID-X1. Diese vererbte Krankheit ist im frühen Stadium letal. Es handelt sich hierbei um eine frühe Blockade in der Entwicklung der T-Lymphozyten und der natürlichen Killerzellen (CAVAZZANA-CALVO et al., 2000; LEONARD, 2000; HACEIN-BEY-ABINA et al., 2002).

Nach zunächst guten Therapieerfolgen wurden im Sommer 2002 alle weiteren klinischen Studien dieser Therapie gestoppt, da zwei der therapierten Kinder klinische Zeichen einer akuten lymphoblastischen Leukämie zeigten (HACEIN-BEY-ABINA et al., 2003). Bei diesem Fall handelte es sich um eine Insertionsmutagenese, eines der möglichen Risiken, die bei einem retroviralen Gentransfer auftreten können.

Da für die Behandlung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) die Blut-Hirn-Schranke eine nahezu unüberwindliche Barriere darstellt, sind für die

Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen, wie M. Parkinson, Chorea Huntington, Demenz durch Intoxikation und Alkoholmissbrauch, Epilepsie, Depressionen etc., neue therapeutische Ansätze, wie die gentherapeutische Option, von besonderem Interesse. Mit Hilfe dieser neuartigen Therapiemöglichkeit können bestimmte Proteine, Neurotransmitter oder neurotrophe Faktoren in geschädigten Hirnarealen zur Expression gebracht werden, sodass vor Ort eine Zustandsverbesserung herbeigeführt bzw. eine weitere Degeneration der Zellen aufgehalten werden kann. Darüber hinaus ist es auch möglich bei genetisch bedingten Defekten fehlende oder defekte Gene zu ersetzen.

Für ex-vivo gentherapeutische Ansätze zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wurden mittlerweile eine Reihe von Zelltypen im Tierexperiment oder bei Patienten mit Morbus Parkinson im Rahmen von klinischen Studien eingesetzt: dazu zählen fetale Zellen, die aus Gehirnen menschlicher Feten gewonnen werden. Dopaminerge Neurone oder fetale Zellen aus dem ventralen Mittelhirn wurden bereits in klinischen Studien bei über 300 Patienten mit Morbus Parkinson transplantiert (ALEXI et al., 2000).

Eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, darunter auch nicht-neuronale Zellen, z.B. Zellen aus der Nebennierenrinde, Sertolizellen aus den Keimdrüsen oder Glomuszellen aus den Carotiden, Fibroblasten oder Astrozyten wurden bei Patienten mit Morbus Parkinson oder in Tiermodellen verwendet mit dem Ziel, Dopamin spontan oder nach Gentransfer (ALEXI et al., 2000) zu substituieren. Die Überlebensrate transplanteder fetaler dopaminerger Neurone lag bei 5-8%, was bereits eine geringe Verbesserung der klinischen Symptome verursachte (ALEXI et al., 2000). In den USA (Cornell University, USA) wurde 2003 erstmals die Genehmigung der US-amerikanischen Food and Drug Administration erteilt, Gentherapien an Parkinson Patienten zu testen, nachdem die Behandlung in einer Studie mit Nagetieren erfolgreich verlief (LUO et al., 2002). Dabei wurde ein Adeno-assoziiertes Virus in das Hirngewebe inseriert, das mit dem Gen für ein Enzym beladen war, welches an der Produktion des hemmenden Botenstoffs Gamma-amino-Buttersäure (GABA) beteiligt ist. Auf diese Weise sollen Symptome, wie unkontrollierte Bewegungen und Zittern der sog. Schüttellähme, bekämpft werden. In den letzten Jahren wurden neuronale Stammzellen von Vertebraten isoliert, in-vitro expandiert und in das ZNS reimplantiert mit dem Ziel, degenerierte reife Neurone zu ersetzen. Diese neuronalen Vorläuferzellen wurden auch für den Gentransfer verwendet (RAYMON et al., 1999). So konnte gezeigt werden, dass

Schwannsche Zellen, die NGF und GDNF überexprimierten, eine Neuroprotektion in Parkinsonmodellen herbeiführten (WILBY et al., 1999).

## **1.1 Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auf experimentellem Niveau verschiedene gentherapeutische Ansätze zu testen, die möglicherweise eines Tages Grundprinzip von neuen Behandlungsstrategien für eine erfolgreiche Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS sein könnten. Die Basis der Arbeit ist die Verwendung eines adenoviralen Vektors der dritten Generation, der auch als high capacity adenoviraler Vektor bezeichnet wird, da in die Vektorsequenz bis zu 36 kb Fremd-DNA aufgenommen werden können. Diese hohe Aufnahmekapazität ist insbesondere für die Behandlung von Erkrankungen ohne genetischen Hintergrund bzw. bei Erkrankungen, die auf ein multifaktorielles Geschehen zurückzuführen sind, besonders geeignet. Sie gewährleistet die Integration von mehreren therapeutischen Gensequenzen in das Vektorgenom, sodass ein multifaktorieller Prozess durch die Verwendung eines Vektors gestoppt werden kann. Um eine fundierte Aussage über die therapeutische Einsatzmöglichkeit des adenoviralen Vektors der jüngsten Generation machen zu können, werden experimentell beide Möglichkeiten des viralen Gentransfers getestet, nämlich der in-vitro Gentransfer unter Verwendung von verschiedenen Zelltypen, die ex-vivo transduziert werden, und der sogenannte in-vivo Gentransfer durch direkte Transduktion der Zellen in situ.

Um die therapeutische Potenz des adenoviralen Vektors für Erkrankungen des ZNS näher zu untersuchen, werden im Rahmen eines in-vitro Ansatzes verschiedene Zellen hinsichtlich ihrer Transduktionsfähigkeit untersucht. Zu diesen Zellpopulationen gehören Zellen wie Astrozyten, astrozytäre Vorläuferzellen, neural differenzierte embryonale Stammzellen und mesenchymale Stammzellen, die im Zusammenhang mit zelltherapeutischen Behandlungsstrategien immer wieder diskutiert werden. Letztendlich könnte durch eine erfolgreiche Transduktion der möglichen Zellkandidaten mittels des adenoviralen Vektors ein zelltherapeutischer Ansatz wesentlich effizienter gestaltet werden, da die Zellen beispielsweise zur Synthese von neurotrophen Faktoren befähigt werden, die nicht nur vor einer Degeneration der ortständigen Zellen schützt, sondern auch die der eingebrachten Zellen verhindert.

Für die Beurteilung der Transduktionsfähigkeit der Zellen ist in erster Linie die Transduktionseffizienz unter Verwendung von verschiedenen Vektorkonzentrationen von Interesse, die durch die Expression des Reportergens GFP bzw. über die LacZ-Expression ermittelt werden kann. Darüber hinaus kann über die Synthese des Markerproteins SEAP tatsächlich die Syntheserate der Zellen und außerdem die Dauer der Synthese des Markerproteins im Kulturüberstand der für diesen Versuchsabschnitt herangezogenen astrozytären Vorläuferzellen ermittelt werden.

Für die Untersuchung eines möglichen Einsatzes des Drittgenerations-adenoviralen Vektors im Rahmen eines ex-vivo gentherapeutischen Einsatzes ist natürlich nach Analyse der Transduktionseffizienz der verschiedenen Zelllinien das Verhalten der Zellen in einem Empfängergewebe nach Transplantation von besonderem Interesse. Für diese Untersuchung werden hier ausschließlich die astrozytären Vorläuferzellen verwendet. Im Vordergrund der Studie dieses Versuchsabschnittes steht zunächst die Integrationsfähigkeit der transduzierten Zellen im Empfängergewebe, wobei auch eine eventuelle Schädigung der Zellen des Implantationsareals ermittelt werden soll. Weiter ist es Gegenstand der folgenden Beurteilung, ob sich die astrozytären Vorläuferzellen nach Transplantation entlang der glialen Linie weiterdifferenzieren, und zwar so, wie das aus der in-vivo Situation von vergleichbaren Zellen bekannt ist. Für die Abschätzung eines therapeutischen Effektes bzw. des Befundes, in welchem Areal um den Ort der Transplantation dieser zu erwarten ist, wird zusätzlich noch beurteilt, ob die transduzierten astrozytären Vorläuferzellen nach Transplantation im Bereich des Stichkanals verbleiben oder ob eine migratorische Aktivität in die Peripherie auftritt. Dazu werden die Distanzen der Zellen zum Zentrum der Injektionsstelle morphometrisch bestimmt.

Neben dem ex-vivo gentherapeutischen Einsatz des high capacity adenoviralen Vektors in Bezug auf Erkrankungen des ZNS soll im Rahmen dieser Arbeit gleichzeitig die Möglichkeit des in-vivo Einsatzes des Vektors untersucht werden. Dazu wird der Vektor direkt in verschiedene Hirnareale (Corpus callosum, Striatum, Ventrikel) injiziert und mit Hilfe von immunocytochemischen Analysen ermittelt, welche Zellpopulation präferentiell von dem Vektor transduziert wird. Grundlage für diese Teiluntersuchung ist dabei der Prozentsatz der verschiedenen ortständigen Zelltypen im ZNS der Transplantatempfänger (Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten, Ependymzellen sowie Mikrogliazellen), die eine positive Reporterproteinexpression zeigen.

Für den in-vivo gentherapeutischen Einsatz des adenoviralen Vektors der dritten Generation ist es weiterhin von entscheidender therapeutischer Bedeutung, wie sich der Vektor um das Injektionsareal verteilt. Über die Bestimmung des Radius der erfolgreich transduzierten ortständigen Zellen nach direkter Vektorinjektion können Rückschlüsse über das Areal eines möglichen therapeutischen Effektes dieser gentherapeutischen Option gezogen werden.

Bestandteil dieses Untersuchungsabschnittes ist es, zusätzlich eine generalisierte Transduktion weiterer Organe und Gewebe auszuschließen. Dazu werden auch periphere Organe wie die Leber oder die Niere hinsichtlich einer Expression der Reporterproteine, wie sie nach Vektortransduktion auftreten, in die Untersuchung miteinbezogen.

Eine weitere Zielstruktur einer direkten Vektorinjektion im Rahmen eines in-vivo gentherapeutischen Ansatzes stellt das Ventrikependym des Liquorraumes dar.

Diese Zielstruktur ist deshalb von einem enormen Interesse für genetische Therapieansätze, da der Liquorraum von einer ganzen Reihe von Hirnarealen flankiert wird, die im Zuge von ZNS Erkrankungen degenerieren können.

Im Anschluss an die direkte Vektorinjektion in den lateralen Ventrikel der Versuchstiere soll beurteilt werden, ob eine generalisierte oder eine lokale Transduktion der ventrikelauskleidenden Zellen zu detektieren ist. Weiterhin kann unter der Verwendung des adenoviralen Vektors, der die Sequenz für das Markerenzym SEAP trägt, auch die tatsächliche Konzentration des Markerenzym durch entsprechende Nachweisverfahren im Liquor bestimmt werden. Zusätzlich soll die Dauer der Produktion des Markerenzym im Liquor durch repetitive Liquoranalysen bestimmt werden. Für einen möglichen therapeutischen Einsatz kann so der Zeitpunkt festgestellt werden, an dem möglicherweise eine erneute therapeutische Vektorinjektion stattfinden muss, sodass ein Abfall der therapeutisch relevanten Konzentration des Vektors bzw. der therapeutischen Substanz vermieden wird.

## **1.2 Möglichkeiten der Gentherapie in der Tiermedizin**

Die Gentherapie, die ohne Zweifel als eines der neuesten Gebiete der molekularen Medizin bezeichnet werden kann, stellt sich mittlerweile auch als ein wichtiges Instrument für die Behandlung von Krankheiten der Haustiere dar. Im Rahmen der Etablierung und Verbesserung dieser rekombinanten DNA-Technologie spielen die

Haustiere nicht nur eine Rolle als ideale Modelle, um potentielle therapeutische Ansätze für die Humanmedizin zu testen, sondern die gentherapeutische Option macht es auch möglich, neue tiermedizinische Medikamente und Impfstoffe zu entwickeln (ARGYLE, 1999). Genetische Faktoren sind auch bei Haustieren in viele Krankheitsprozesse involviert. Einige Einzelgendefekte von Haustieren dienen als Modelle für Gentherapiestrategien der monogenetischen Erkrankungen des Menschen (ARGYLE, 1999). Vor allem im Bereich der Behandlung von Hämophilie A und B wurden in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Hämophilie A und B sind sowohl beim Menschen als auch beim Hund x-chromosomal rezessive Gerinnungsstörungen und resultieren in einem Gerinnungsfaktormangel: Faktor VIII bzw. Faktor IX.

Für die Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) wird ebenfalls ein Hundemodell verwendet. Die beim Golden Retriever einem x-chromosomal rezessivem Erbgang folgende, progressive Muskelschwäche ist charakterisiert durch Muskelfaserdegeneration und Nekrose. Nach adenoviralem Gentransfer des humanen Dystrophingens zeigen die Hunde unter Immunsuppression mit Cyclosporin eine Expression des Proteins über zwei Monate (HOWELL et al., 1998; NONAKA, 1998; COLLINS und MORGAN, 2003). Auch andere Stoffwechselerkrankungen der Haustiere dienen aufgrund ähnlicher Gen- und Proteinddefekte als Modell für die Humanmedizin, um die Effektivität verschiedener Gentherapien zu studieren (NONAKA, 1998). Dazu gehören autosomal rezessive, lysosomale Speicherkrankheiten bei Hund und Katze, wie der feline Lipoproteinlipase-Mangel (LIU et al., 2000) oder verschiedene Mucopolysaccharidosen (YOGALINGAM et al., 1999; WOLFE et al., 2000). Die amerikanische Korat-Katze könnte z. B. als Modell für die Sandhoff-Krankheit dienen. Für diese neurologische Erkrankung (Typ II GM2-Gangliosidose) wären neurotrophe virale Vektoren, wie das Herpes Simplex Typ 1 Virus, gut geeignet (MULDOON et al., 1994).

Bei der erblichen Retinadegeneration kann beim Hund durch *gene replacement* sowohl eine strukturelle Verbesserung der Retina als auch eine Wiederherstellung des Visus erreicht werden (ACLAND et al., 2001; NARFSTROM et al., 2003). Neben dem Hund dient auch das Pferd als Modell für Gentherapiestudien bezüglich der Epidermiolysis bullosa, welche beim Belgischen Pferd zu Blasen in Haut und Maul sowie zur Exungulation führt (SPIRITO et al., 2002; BALDESCHI et al., 2003). Darüber hinaus wird beim Pferd immer mehr die Möglichkeit einer Gentherapie in Verbindung mit Stammzell-basierten Therapieverfahren diskutiert.

### 1.3 Gentransfervektoren

Für den Gentransfer werden derzeit sowohl virale (Abb. 1) als auch nicht-virale Vektoren verwendet. Als virale Vektoren werden bevorzugt adenovirale (Ad) Vektoren, adenoassoziierte Vektoren (AAV), retrovirale Vektoren und lentivirale Vektoren eingesetzt. Für den nicht-viralen Gentransfer werden cationische Liposomen, Polylysin-DNA-Komplexe, kationische Lipide und die direkte Injektion nackter DNA verwendet. Präklinische Studien wurden bereits für weitere virale Vektorsysteme durchgeführt (ROMANO et al., 2000).

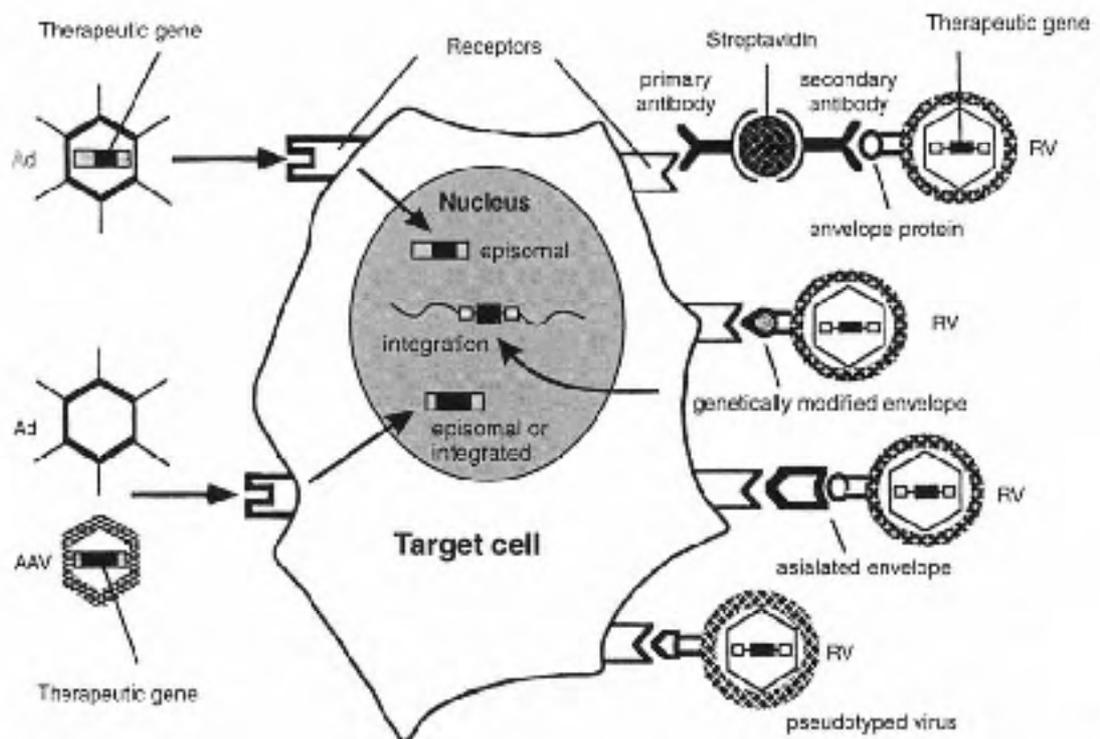


Abb. 1: Schema über die verschiedenen Möglichkeiten des viralen Gentransfers (Adenoviren (Ad), Retroviren (RV), Adenoassoziierte Viren (AAV)) und den entsprechenden Rezeptoren für die Vektorkonjugation an der Zellmembran (nach Verma und Somia, 1997).

## 1. Gentransfer mit Adenoviren/Herpesviren

Transduktion durch replikationsdefekte Adenoviren (und ähnliche)

### Vorteile:

1. Transduktion von proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen ist möglich
2. hohe Effizienz des Gentransfers in verschiedenen Geweben
3. keine Integration ins Wirtsgenom (bleibt episomal)
4. hohe Virustiterproduktion
5. viele Applikationsmöglichkeiten

### Nachteile:

1. Zielgebung zurzeit schwierig
2. Problem der zellulären und humoralen Immunantwort (durch virale Proteine)
3. bei hohen Dosen zytotoxische Effekte in Leberzellen, da diese bevorzugtes Target sind
4. Möglichkeit der Rekombination zu Wildtyp (wt)-Adenovirus, bei der Generierung in den Helferzelllinien (RCA)

## 2. Retroviraler Gentransfer

Transduktion durch replikationsdefiziente Retroviren

### Vorteile:

1. Transfer von bis zu 8 kb großer Fremd-DNA möglich
2. hohe Effizienz des Gentransfers

### Nachteile:

1. Benötigen sich teilende Zellen
2. Integration von Fremd-DNA in das Wirtsgenom
3. permanente Modifikation der Zellen
4. geringer Titer bei der Herstellung
5. Bildung replikationskompetenter Viren
6. Insertionsmutagenese

|   |  |
|---|--|
| <p><b>3. Nichtviraler Gentransfer</b></p> <p>Transfektion von Expressionsvektoren mittels Elektroporation, Lipofektion, Rezeptor-vermittelte Transfektion (oder ähnliches)</p>  |  |
| <p><b>Vorteile:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. lokale Applikation möglich<br/>(Versuche bei Head+Neck Cancer)</li> <li>2. kaum Zytotoxizität (keine physiologischen Veränderungen durch liposomale Agentien)</li> <li>3. keine Induktion der Immunantwort (humanisierte Vektoren/gewebespezifische Promotoren)</li> <li>4. sehr einfache Produktion/beliebige DNA-Größe</li> </ol> | <p><b>Nachteile:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. geringe Transfektionseffizienz</li> <li>2. Targeting schwer möglich</li> <li>3. sehr ineffizient</li> </ol> |

Tab. 2: Aufführung der spezifischen Charakteristika verschiedener, häufig verwendeter Gentransfersysteme.

Eine für den therapeutischen Gentransfer wichtige Voraussetzung ist, dass der effiziente in-vivo Transfer eines therapeutischen Gens in die entsprechenden Zielzellen ohne toxische oder immunogene Nebenwirkungen stattfindet. Darüber hinaus ist in vielen Fällen die Regulation der Transgenexpression wünschenswert, z.B. zur Aktivierung oder Reprimierung der Expression, wenn notwendig oder zum Erhalt der Transgenkonzentration in einem therapeutischen Rahmen.

Der ideale Vektor sollte in hohen Konzentrationen leicht und reproduzierbar herzustellen sein. Optimal wäre die spezifische Integration in charakterisierte chromosomale Loci, die eine vorhersagbare, stabile Expression oder einen stabilen Erhalt episomaler Vektoren (z.B. nach adenoviraler Infektion) erlauben. Keines der

zurzeit verfügbaren Systeme erfüllt alle diese Anforderungen, vgl. Tab. 2. (WONG et al., 2000; MEYER und FINER, 2001; PARDRIDGE, 2001; DAVIS, 2002). Das jeweils geeignete Vektorsystem ist abhängig vom genetischen Defekt und vom therapeutischen Ziel. Bei einem angeborenen Defekt dürfte ein Vektor am günstigsten sein, der durch die Integration in das Genom eine dauerhafte Expression des Transgens ermöglicht (z.B. retrovirale Vektoren), während sich für eine kurze, aber hohe Expression, z.B. zur Toxinexpression in Tumorzellen, andere Systeme, wie z.B. adenovirale Vektoren eignen. Von großem Interesse ist auch die Konstruktion von adenoviralen/retroviralen Hybridvektoren, die die Vorteile beider Systeme kombinieren. So wird die effiziente in-vivo Transduktion vieler Zellen (auch nicht proliferierender Zellen) durch den adenoviralen, die Integration und stabile Expression über den retroviralen Anteil möglich (FENG et al., 1997; ZHENG et al., 2000). Die Anforderungen an eine erfolgreiche Gentherapie unterscheiden sich stark. Während z.B. bei der Cystischen Fibrose nur ein Teil der Zielzellen das Transgen exprimieren muss, ist es in der Krebstherapie notwendig, alle Tumorzellen zu erreichen (MILLER und VILE, 1995).

Im Folgenden werden zum besseren Verständnis des viralen Gentransfers der Aufbau und Lebenszyklus von Adenoviren beschrieben sowie einige der wichtigsten Vektorsysteme kurz erläutert.

### **1.3.1 Adenoviren**

Adenoviren verursachen im Menschen gewöhnlich akute Atemwegserkrankungen. Sie wurden erstmals 1953 aus spontan degenerierten primären Zellen humaner Gewebewucherungen des Nasenraumes (Polypen) isoliert (ROWE et al., 1953). Bis heute umfasst die Familie der Adenoviridae über 100 Mitglieder, die eine große Zahl von Zelltypen unterschiedlicher Spezies infizieren können. Beim Menschen sind 47 Serotypen beschrieben, die in sechs Subgruppen (A bis F) anhand ihrer Fähigkeit Erythrozyten zu agglutinieren, unterteilt werden. Die meisten zum Gentransfer genutzten Adenoviren leiten sich vom Serotyp 5 der Subgruppe C ab, da sie keine pathogenen oder onkogenen Eigenschaften aufweisen.

#### **1.3.1.1 Aufbau von Adenoviren**

Adenoviren besitzen ein lineares, doppelsträngiges DNA-Genom, das von einer ikosaedrischen Proteinhülle umgeben ist (Abb. 2). Das Kapsid besitzt eine Größe von 70 bis 100 nm und setzt sich aus 252 Untereinheiten, den Kapsomeren, zusammen, die sich in 240 Hexons und 12 Pentons unterteilen.

Von den elf verschiedenen Virion-Proteinen werden sieben für die Bildung der äußeren Hülle benötigt. Das Hexon-Kapsomer ist ein Trimer aus drei eng assoziierten Polypeptid II-Molekülen. Das Gitter der Hexon Kapsomere wird von den Polypeptiden VI, VIII und IX stabilisiert. Die Proteine VIII und IX dienen zusätzlich als Verbindung zwischen Kapsid und den Kernkomponenten. Die Penton-Kapsomere bestehen aus einem Basis-Protein, das zur Kapsidoberfläche gehört und einem Glykoproteinfohrtatz, dem Fiber-Protein. Dieses Trimer besteht aus dem Polypeptid IV und ragt charakteristisch an jedem Scheitelpunkt des Ikosaeders heraus.

Der Kern des Virions setzt sich aus vier Proteinen und dem viralen Genom zusammen. Die Polypeptide V, VII, X und TP (Terminal-Protein) binden an die virale DNA. Das Protein VII ist dabei Hauptkernprotein und besitzt möglicherweise Histon-ähnliche Funktion. Protein V bindet an das Pentonkapsomer und stellt so die Verbindung zwischen Kern und Kapsid dar. Das Terminal-Protein ist kovalent an das 5` Ende der viralen DNA angeheftet und spielt bei der viralen Replikation eine wichtige Rolle. Es wurde indirekt durch seine Fähigkeit DNA zu zirkularisieren, entdeckt (ROBINSON et al., 1973).

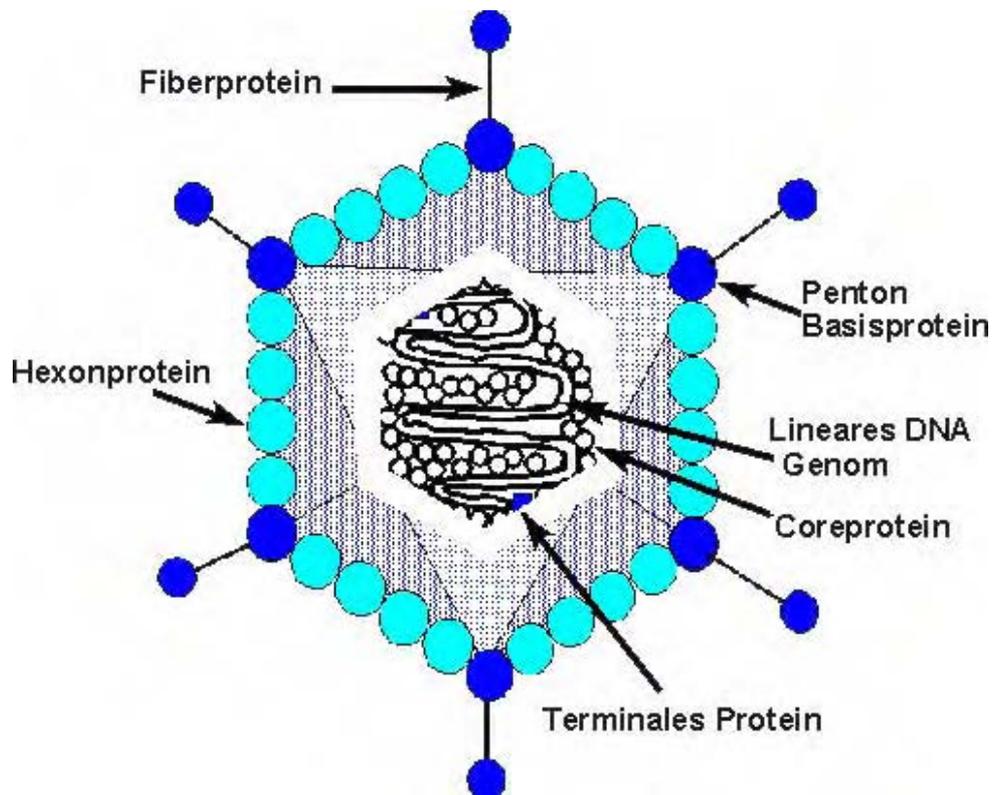


Abb. 2: Schema über den Aufbau eines Adenovirus.

### 1.3.1.2 Organisation des adenoviralen Genoms

Das Genom der Adenoviren besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA von etwa 36 kb. Eine Genkarte des Adenovirus (Abb. 3) wird konventionsgemäß beginnend mit dem E1A-Gen am linken Ende dargestellt. Jedes Ende des Genoms weist einen inverted terminal repeat (ITR) mit jeweils einem Replikationsursprung auf. Die ITRs dienen während der Virusreplikation zur Zirkularisierung von DNA-Einzelsträngen. Innerhalb der ersten 400 Basenpaare des adenoviralen Genoms ist die Verpackungssequenz lokalisiert, die die Interaktion der Virus-DNA mit den Kapsidproteinen während des Zusammenbaus neuer Viruspartikel ermöglicht. Die Verpackungssequenz besteht aus sieben Elementen, die aufgrund ihres hohen AT-Gehaltes als A-Elemente (A I bis A VII) bezeichnet werden.

Das relativ komplexe Genom der Adenoviren besitzt mehrere Transkriptionseinheiten, die in zeitlichen Clustern exprimiert werden. Die fünf frühen

Transkriptionseinheiten (E1A, E1B, E2, E3 und E4) sowie zwei verzögert frühe Einheiten (IX und IVa2) werden vor Beginn der Replikation exprimiert, die späte Transkriptionseinheit, die in fünf späte mRNA-Familien prozessiert wird, wird erst nach Beginn der Replikation exprimiert.

Allgemein gilt, dass die in den frühen und verzögert frühen Transkriptionseinheiten kodierten Proteine vor allem der Regulation der viralen und zellulären Aktivität dienen, wogegen die späte Transkriptionseinheit für die Hüllproteine kodiert. Die E1A-Einheit kodiert für zwei Proteine, die die Transkription adenoviraler Gene aktivieren und gemeinsam mit den Proteinen der E1B-Einheit den Eintritt der Zelle in die S-Phase induzieren. E2 kodiert für drei Proteine, die alle an der Replikation der Virus-DNA beteiligt sind (das Terminal-Protein: beteiligt an der Zirkularisierung der DNA; eine Polymerase; ein Einzelstrang-bindendes Protein). Die Proteine der E3-Einheit sind beteiligt an der Modulation der Immunantwort des infizierten Organismus. Die E4 kodierten Proteine besitzen regulatorische Funktionen bei der Transkription und Replikation der viralen DNA sowie beim mRNA-Transport. Die Expression der späten Gene beginnt nach Beginn der Virus-Replikation und ist in einem einzigen langen Transkript organisiert, das in mindestens 18 mRNAs prozessiert wird. Die Unterteilung der Transkripte in die Familien L1 bis L5 erfolgt aufgrund der Verwendung gleicher Polyadenylierungsstellen. Die späten Proteine spielen bei der Produktion des Viruskapsids eine Rolle (GOODRUM et al., 1996).

### **1.3.1.3 Lebenszyklus von Adenoviren**

Der Infektionszyklus des Adenovirus 5 wird in zwei Phasen unterteilt. Zur frühen Phase gehören die Adsorption und Penetration des Viruspartikels sowie die Expression der frühen Gene. Die späte Phase der Infektion beginnt mit der Replikation der viralen DNA und schließt mit der Zusammensetzung des Viruspartikels ab. Die Gesamtdauer eines Infektionszyklus` beträgt in HeLa-Zellen etwa 20 bis 24 Stunden.

#### **Frühe Phase**

Der Infektionsprozess beginnt mit der Adsorption des C-terminalen Endes des Fiberproteins, der so genannte Fiber-Knob bindet sich an den zellulären Rezeptor. Bislang wurden als zelluläre Rezeptoren die MHC I alpha2-Domäne (HONG et al., 1997) und der Coxsackievirus/Adenovirus Rezeptor (CAR) (BERGELSON et al.,

1997) identifiziert. Die Internalisierung des Virus` erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endozytose, wobei neben der Interaktion des Fiber-Proteins mit dem zellulären Rezeptor auch die Interaktion des Basis-Proteins des Penton-Kapsomers mit zellulären Integrinen erforderlich ist. Die Absenkung des pH-Wertes innerhalb der Endosomen führt zur Freisetzung der Viruspartikel in das Zytoplasma der Zellen. Der Transport der Viruspartikel zum Zellkern erfolgt wahrscheinlich mit Hilfe von Mikrotubuli (LU und SHENK, 1996). Am Kernporenkomplex wird vermutlich das lineare Adenovirus-Genom aus den Viruspartikeln in den Zellkern freigesetzt.

Der Internalisierungsprozess ist mit der selektiven Dissoziation des Virions, z.B. durch das Absenken des pH-Wertes in den Endosomen oder proteolytische Degradation, verbunden. Dabei scheint die Dissoziation des Fiber-Proteins ein initiierendes Ereignis für die nachfolgende Abbaukaskade zu sein. Jede Degradation ist Voraussetzung für nachfolgende Strukturveränderungen.

Nach Eintritt der Virus-DNA in den Zellkern erfolgt ihre über das Terminal-Protein vermittelte Assoziation an die Kernmatrix. Gleichzeitig startet die Transkription der frühen viralen Transkriptionseinheiten. Neben der Aktivierung der späten viralen Gene und der Replikation der viralen DNA modulieren die Genprodukte der frühen Gene (besonders das E1A-Protein) auch die zelluläre Aktivität der infizierten Zelle. So aktivieren sie den Zellzyklus, verhindern die Initiation der Apoptose und blockieren antivirale Maßnahmen des Wirtes (GOODRUM et al., 1996).

### **Späte Phase**

Mit dem Eintritt der infizierten Zelle in die S-Phase des Zellzyklus und der Akkumulation des E2-Proteins startet die virale Replikation am Replikationsursprung des ITRs und endet erst mit der Lyse der Zelle. Das Terminalprotein fungiert als Primer für die DNA-Replikation und vermittelt die Regeneration der Enden der Virus-DNA während der Replikationsrunden. Die Elongation wird durch zwei E2-kodierte Proteine, der Polymerase und dem Einzelstrangbindenden Protein vermittelt. Einige E4-Proteine werden ebenfalls für die Replikation benötigt, ihre genaue Funktion ist jedoch noch unklar. Die Synthese der DNA erfolgt in zwei Abschnitten. Zunächst wird nur ein DNA-Strang vollständig repliziert. Der entstandene Doppelstrang besteht aus Eltern- und Tochterstrang. Der zweite Elternstrang wurde bei der Synthese verdrängt und wird erst im zweiten Schritt als Vorlage für die Bildung eines weiteren Stranges verwendet.

Die späten Gene werden erst mit Beginn der DNA-Replikation effizient durch eine Transkriptionseinheit, die unter der Kontrolle des *major late* Promoters steht, exprimiert. Eine Kaskade von Ereignissen, in deren Verlauf das während der verzögert frühen Phase exprimierte IVa2-Protein an den *major late* Promoter bindet, führt zu dessen Aktivierung und zur Induktion der späten Gene.

Die nun erfolgende Akkumulation von Strukturproteinen sowie die Replikation der Adenovirus-DNA induzieren den Zusammenbau der Viruspartikel in der infizierten Zelle. Dabei wird zunächst ein leeres so genanntes Präkapsid aus Hexon- und Penton-Kapsomeren gebildet, in das nachfolgend durch die Interaktion der Verpackungssequenz mit dem Kapsid, die DNA, beginnend mit dem linken Ende, verpackt wird. Die Freisetzung der produzierten Viruspartikel erfolgt durch die Lyse der infizierten Zellen.

### **1.3.2 Adenoviraler Gentransfer und Sicherheitsaspekte**

Für den somatischen Gentransfer sind verschiedene virale und nicht-virale Vektoren entwickelt worden (FRIEDMANN und ROBLIN, 1972); dabei haben sich adenovirale Vektoren für den direkten in-vivo Gentransfer als besonders effizient erwiesen (HORELLOU et al., 1997). Allerdings ist der Einsatz der herkömmlichen adenoviralen Vektoren eingeschränkt, da aufgrund der auftretenden Immunreaktionen die transfizierten Zellen und damit die transgene Expression nur transienten Charakter hat (STRATFORD-PERRICAUDET et al., 1990; HERZ und GERARD, 1993; MORSY et al., 1993; ENGELHARDT et al., 1994; MUZZIN et al., 1996). Rekombinante adenovirale Vektoren wurden erstmals 1985 hergestellt und basieren auf den adenoviralen Serotypen 2 und 5, da diese nicht mit Erkrankungen oder Tumoren bei Mensch oder Tier assoziiert sind. Rekombinante Adenoviren wurden 1993 erstmalig zur Behandlung der Cystischen Fibrose eingesetzt (ZABNER et al., 1993).

Ein Vorteil dieser adenoviralen Serotypen ist die Tatsache, dass die daraus generierten Vektoren sowohl replizierende als auch nicht-replizierende Zellen in-vitro und in-vivo effizient transduzieren können. Adenoviren können mit Titern von bis zu  $10^{10}$  cfu/ml produziert werden. Sie sind sehr stabil und lassen sich leicht zu Titern von  $10^{12}$  cfu/ml aufkonzentrieren. Sie bieten sehr hohe, allerdings nur transiente Transgen-Expression. Ein noch entscheidender Nachteil bei den Vektoren der ersten und zweiten Generation ist jedoch ihre hohe Immunogenität.

Neben entzündlichen und toxischen Reaktionen des Wirtes kann es zur Eliminierung adenoviral transduzierter Zellen (TRIPATHY et al., 1996) und zur reduzierten Wirksamkeit bei erneuter Administration kommen (DAI et al., 1995). Zur Verminderung der Immunogenität der Vektoren wurden verschiedene Deletionen, mit vielfältigen und häufig differierenden Ergebnissen erprobt (ROMANO et al., 2000). Auch sogenannte „gutless“-Vektoren, also Vektoren der dritten Generation, in denen alle viralen Gene deletiert wurden, verhindern nicht vollständig die Immunogenität der Adenoviren, da die Proteine, die mit den Viren in den Organismus eingebracht werden, selbst das Immunsystem aktivieren können.

Ein weiterer Nachteil ist die nur transiente Expression der episomal verbleibenden Viruspartikel. In verschiedenen Ansätzen konnte die Transgen-Expression zwar verlängert werden, z.B. durch die Deletion des E2a-Gens (ENGELHARDT et al., 1994), jedoch blieb sie transient. Die durch Zheng et al. (2000) ermittelte Integration von chimären Adeno-/Retroviralen Vektoren könnte möglicherweise zur stabilen Expression von adenoviral transduzierten Genen genutzt werden. Diese Eigenschaften limitieren die Anwendbarkeit rekombinanter Adenoviren in der Gentherapie, wenn die stabile Langzeitexpression zur Behandlung von ererbten oder erworbenen Defekten, wie z.B. neurologischen oder kardiovaskulären Erkrankungen, notwendig ist (ROMANO et al., 2000).

Adenovirale Vektoren der ersten Generation (GILARDI et al., 1990; STRATFORD-PERRICAUDET et al., 1990) sind durch Deletion der E1A- und E1B-Gene sowie E3 charakterisiert (Abb. 3). E1A und E1B haben transformierende und transaktivierende Eigenschaften. Mit der Deletion der E1- und E3-Region verliert das Virus die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung sowie zur Modulation des Zellzyklus und der zellulären Immunantwort. Die restlichen cis-agierenden Elemente und Gene verbleiben in funktioneller Anordnung. In einigen Vektoren ist E3 deletiert, um die Kapazität für die Aufnahme von Fremd-DNA zu erhöhen. E3 ist für die Herstellung von Adenoviren in der Zellkultur entbehrlich.

Die Kapazität für die Aufnahme von Fremd-DNA bei Vektoren der ersten Generation beträgt etwa 8 kb.

Adenovirale Vektoren der zweiten Generation (Abb. 3) sind durch Deletion von E2 und/oder E4 zusätzlich zu Deletion von E1A und E1B charakterisiert (ENGELHARDT et al., 1994). In einigen Vektoren ist außerdem E3 deletiert, um die Kapazität für die Aufnahme fremder DNA zu erhöhen. Adenovirale Vektoren der

zweiten Generation wurden entwickelt, um die Transkription von viralen Genen und die Expression viraler Proteine weiter zu reduzieren und um somit die antivirale Immunantwort weiter zu verringern.

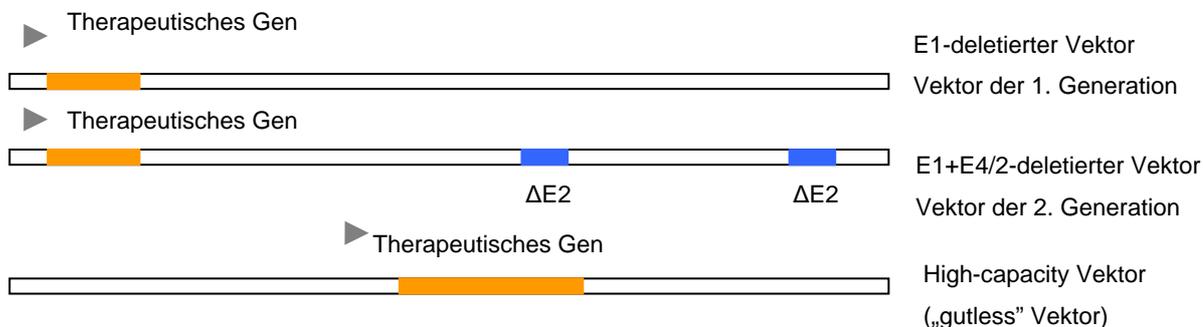


Abb. 3: Genkarten der drei verschiedenen adenoviralen Vektorgenerationen.

#### *Adenovirale Vektoren der dritten Generation (high capacity Vektoren)*

Adenovirale Vektoren mit großer DNA-Kapazität sind dadurch gekennzeichnet, dass sie keine viral kodierenden DNA-Kapazitäten enthalten (MITANI et al., 1995). Diese Vektoren enthalten lediglich die viralen Enden unter Einschluss der ITRs und des Verpackungssignals. Die Kapazität für die Aufnahme fremder DNA beträgt etwa 36 kb (FISHER et al., 1996; KOCHANNEK et al., 1996), da der weit überwiegende Teil des adenoviralen Genoms entfernt worden ist. Es sind verschiedene Systeme zur Herstellung adenoviraler Vektoren der dritten Generation beschrieben (KOCHANNEK, 1999). Der Vorteil dieser adenoviralen Vektoren der dritten Generation im Gegensatz zu adenoviralen Vektoren der ersten und zweiten Generation liegt in einer geringeren Toxizität und Immunogenität und in einer größeren Aufnahmekapazität von fremder DNA. Hierdurch ist es möglich, ein oder mehrere Gene oder Expressionskassetten in die Zielzellen zu integrieren.

#### *Deletierte adenovirale Vektoren*

Deletierte adenovirale Vektoren werden als Vektoren der ersten Generation beschrieben. Die loxP Erkennungssequenzen des Bakteriophagen P1 sind derart im viralen Genom positioniert, dass bei Infektion von Cre-exprimierenden 293-Zellen durch Rekombination zwischen den loxP-Erkennungssequenzen der größte Teil der viral kodierenden Sequenzen insgesamt entfernt worden sind (LIEBER et al., 1996).

Die Genomgröße deletierter Vektoren beträgt etwa 9 kb. Die Aufnahmekapazität dieser Vektoren liegt ebenfalls bei etwa 9 kb.

#### *AAV-Vektoren*

AAV-Vektoren beruhen auf dem adenoassoziierten Virus und enthalten lediglich die ITRs von AAV und wenige benachbarte, nicht-kodierende Sequenzen. Aus diesem Grund liegt die Kapazität für die Aufnahme fremder DNA nur bei etwa 4,5 kb (CARTER und SAMULSKI, 2000; SAMULSKI, 2003).

### **1.3.3 Retroviraler Gentransfer und Lentivirusvektoren**

Retrovirale Vektoren, d. h. von Retroviren abgeleitete Vektoren und Lentivirusvektoren, also von Lentiviren abgeleitete Vektoren, sind ebenfalls als Vehikel zur Transfektion im Rahmen von gentherapeutischen Behandlungen von großer Bedeutung. Sie werden seit Anfang der 80er Jahre für den Gentransfer von Fremdgenen in verschiedenen Zielzellen eingesetzt. Diese Vektoren können gut und einfach in stabilen Vektor-Produktions-Zelllinien hergestellt werden oder durch eine transiente Transfektion. Dabei werden die in trans wirkenden retroviralen Leseraster (gag-pol-env) im einfachsten Fall gegen das zu transferierende Fremdgen und einen zusätzlichen Selektionsmarker zur Detektion erfolgreich transduzierter Zellen ausgetauscht. Die einzelnen Komponenten, die zur Herstellung von retroviralen Vektoren verwendet werden, schließen üblicherweise ein oder mehrere Plasmide ein, die die Struktur-, die Replikations- und Integrationsproteine exprimieren, und ferner ein Plasmid, das den Vektor selbst enthält (MILLER et al., 1997).

### **1.3.4 Chimäre Vektoren**

Unter „chimären Vektoren“ werden Vektoren verstanden, die das Produkt einer Fusion von Nukleinsäuren zweier oder mehrerer verschiedener viraler Vektoren sind. In diesem System trägt z.B. ein Adenovirusvektor, bevorzugt ein adenoviraler Vektor der dritten Generation, ein DNA-Fragment, das die Sequenzinformation für ein integrierendes Virus enthält, welches z.B. von einem Retrovirus oder von einem AAV abgeleitet ist. Nach Transduktion einer Zielzelle wird das integrierende Virus, das ein therapeutisches Gen trägt, vom adenoviralen Hintergrund freigesetzt (z.B.

im Falle eines retroviralen Inserts durch Herstellung infektiöser retroviraler Partikel, die benachbarte Zellen transduzieren und stabil als DNA integrieren). Beispiele von chimären Vektoren sind chimäre Adenovirus-Retrovirus-Vektoren (FENG et al., 1997) und chimäre Adenovirus-AAV-Vektoren (RECCHIA et al., 1999).

### **1.3.5 Nicht-virale Vektoren**

Unter nicht-viralen Vektoren werden Vektoren verstanden, die nicht auf der Verwendung eines Virus basieren. Derart transferierte DNA wird nur in den seltensten Fällen stabil in das zelluläre Genom integriert (LEDLEY, 1995), was in einer transienten Genexpression resultiert.

Dabei stellt die Mikroinjektion eine sehr effiziente, aber auch eine sehr aufwendige Methode dar. Grundlage ist die Injektion der zu transfizierenden DNA mittels einer Glaskapillare in den Zellkern der Zielzelle.

Die einfachste Form des nicht-viralen Gentransfers ist die Verwendung nackter DNA. In-vivo injizierte DNA kann von Zellen aufgenommen und exprimiert werden (WOLFF et al., 1990).

Bei der Elektroporation werden die Zellen in ein elektrisches Feld in einer DNA-haltigen Lösung gebracht und die Zellmembran durch kurze elektrische Impulse eröffnet (Porenbildung) (ROLS et al., 1998). Durch diese Mikroöffnungen kann die DNA in die Zelle eindringen.

Zu den nicht-viralen Vektoren gehört ebenso der liposomale Gentransfer, dessen Grundlage die Verpackung von gewünschten DNA-Sequenzen in Liposomen ist, die sich nach Kontakt mit der Zielzelle in deren Zellmembran integrieren, sodass die DNA-Sequenzen in die Zielzelle internalisiert werden (FELGNER et al., 1987). Die DNA verbleibt dann episomal im Zytoplasma, d.h. sie wird nicht in das zelluläre Genom integriert.

Um den Gentransfer und Genexpression effektiver zu machen, wurden zusätzlich physikalische Methoden entwickelt.

Mit Hilfe von Mikroprojektilen bzw. der so genannten „gene gun“, können Gensequenzen in Zielzellen eingebracht werden (YANG et al., 1990). Ein ähnliches Prinzip liegt der Kalzium-Phosphat-Präzipitation zugrunde. Dabei werden die Oberflächen von Wolfram- oder Goldpartikeln (Durchmesser 1 µm) mit einer dünnen DNA-Schicht beschichtet. Mit diesen beschichteten Kügelchen werden die Zellen beschossen (WELLS, 2004). Eine weitere Möglichkeit der Einschleusung des

gewünschten Gens in die Zielzelle ist die Ultraschall-vermittelte Transfektion oder eine direkte Injektion von DNA in das Gewebe (Muskulatur, Schilddrüse) mittels Rezeptor-vermitteltem Gentransfer. Der Nachteil all dieser nicht-viralen Gentransfermethoden, im Vergleich zu viralen Vektoren, ist die relativ geringe Transduktionseffizienz.

## **1.4 Reportergene**

Reportergene, auch Markergene genannt, werden in Zielzellen eingebracht, um eine entsprechende Kontrolle des Gentransfers gewährleisten zu können. Solche Gene kodieren beispielsweise ein Protein, welches detektiert wird oder ein Enzym, dessen Aktivität nachgewiesen werden kann. Es bietet sich somit die Möglichkeit, Lokalisation, Höhe und Dauer der Genexpression entsprechend darzustellen. Reportergene können von einem Genvektor als alleiniges Transgen, kombiniert mit einem zweiten Transgen oder fusioniert an ein zweites Gen exprimiert werden. Ein Reporter gen sollte mehrere Anforderungen erfüllen (KAIN, 1997; KAIN, 2001).

1. Das Reporter- oder Markerprotein darf im normalen Zustand nicht im Organismus bzw. der Zelle vorhanden sein und muss leicht von endogenen Versionen unterscheidbar sein.
2. Einfache, schnelle und sensitive Detektion des Reporterproteins.
3. Schwankungen der Produktkonzentration müssen sicher nachweisbar sein.
4. Das Reporterprotein darf nicht toxisch sein.

Bisher wurden mehrere Reportersysteme entwickelt, die diesen Anforderungen gerecht werden.

### **1.4.1 $\beta$ -Galaktosidase**

Das LacZ Gen stammt aus dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*). Dieses Gen kodiert das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, welches die Hydrolyse von  $\beta$ -Galaktosiden (Zuckermolekülen) katalysiert. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden verschiedene

Substanzen entwickelt, die dem Nachweis dieses Enzyms dienen. Die gängigste Methode ist der histochemische Nachweis, der schon im Jahre 1963 von PEARSON und Mitarbeitern durchgeführt wurde. Bei diesem Nachweis entsteht nach Spaltung eines farblosen Substrates (5-Bromo-4Chlor-3Indolyl-D-Galaktopyranosid) durch  $\beta$ -Galaktosidase ein blauer Farbstoff, welcher in der infizierten Zelle nachgewiesen werden kann. Er wird als genetischer Marker zur Lokalisation einzelner Zellen in vivo und in-vitro genutzt. Für die Verwendung als Reporter gen existieren zwei verschiedene LacZ Formen. Die ursprüngliche zytoplasmatische  $\beta$ -Galaktosidase (cLacZ), welche nach X-Gal-Färbung zu einer Blaufärbung des Zytoplasmas führt, und die nukleäre  $\beta$ -Galaktosidase (nuclear leader sequence-LacZ, nlsLacZ) zählen zu diesen LacZ Formen. Letzteres besitzt eine kurze Signalsequenz des Simian Virus 40 (SV 40), welche mit dem LacZ Gen fusioniert. Diese Signalsequenz bewirkt den Transport eines fusionierten Genprodukts vom Zytoplasma einer Zelle in den Zellkern. Dadurch führt nlsLacZ nach einer X-Gal Färbung markierter Zellen zu einer Blaufärbung des Zellkerns.

#### **1.4.2 Grün fluoreszierendes Protein (Green fluorescent protein)**

Das Gen, welches das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, stammt aus der Tiefseealge *Aequorea Victoria*. Es ermöglicht die Expression von enhanced green fluorescent protein (eGFP) in prokariotischen und eukariotischen Organismen (PRASHER et al., 1992). Das GFP-Chromophor wird in einer autoanalytischen Reaktion gebildet, ohne dass Kofaktoren notwendig sind. Ein direkter Nachweis ist somit möglich. In hoher Konzentration ist das GFP-Protein toxisch (LIU et al., 1999), dennoch zeigt die Generierung GFP-exprimierender transgener Tiere eine gute Verträglichkeit des Reportergens (CHALFIE et al., 1994; HADJANTONAKIS et al., 1998). Dies ermöglicht die breite Anwendung in lebenden Zellen und in Organismen (MISTELI und SPECTOR, 1997).

### **1.4.3 Sezernierte alkalische Phosphatase (SEAP)**

Bei dem relativ neuen Reporter-gen mit der Sequenz für die secreted placental alkaline phosphatase (SEAP) handelt es sich um eine Modifikation des Gens für die humane alkalische Phosphatase der Plazenta (PLAP) (BERGER et al., 1988; KAIN, 1997).

Unter Verwendung dieses Reporter-gens, in Verbindung mit einer Adenovirus vermittelten Transfektion, können einige der Nachteile der bisherigen Reporter-gene, wie das Vorkommen von vergleichbaren endogenen Enzymen, vermieden werden. Darüber hinaus stehen für den Nachweis von alkalischen Phosphatasen (AP) in diagnostischen Laboren einfache, schnelle und relativ preisgünstige kolorimetrische Detektionsverfahren zur Verfügung, die es erlauben, das Enzym in Lösungen zu detektieren (MCCOMB und BOWERS, 1972). Die SEAP-Konzentration kann somit in den Kulturüberständen der entsprechend transduzierten Zellkulturen bzw. in Körperflüssigkeiten wie dem Liquor cerebrospinalis ermittelt werden (CULLEN und MALIM, 1992). Damit kann direkt auf die Transduktionsrate rück geschlossen werden.

## **1.5 Mögliche Zielzellen eines gentherapeutischen Ansatzes bei neurodegenerativen Erkrankungen**

Zu den Zellen, deren Eignung in dieser Arbeit als Zielzellen für einen gentherapeutischen Ansatz sowohl in-vivo als auch in-vitro untersucht werden soll, gehören Neurone, Gliazellen sowie Ependymzellen. Während durch die Transduktion von Neuronen ein genetischer Defekt direkt kompensiert bzw. eine fehlende Transmittersynthese substituiert werden kann, wird durch die genetische Manipulation von Glia- oder Ependymzellen ein eher indirekter therapeutischer Effekt erzielt. Durch die Transduktion der Gliazellen kann beispielsweise die Synthese von neurotrophen Faktoren oder von fehlenden biogenen Aminen (z. B. Dopamin, Serotonin, Gamma-Amino-Buttersäure (GABA), Acetylcholin) induziert werden, sodass gefährdete Neurone vor einer Degeneration geschützt werden können. Ähnliche Effekte sind durch eine Transduktion der ventrikelauskleidenden Ependymzellen zu erwarten. Allerdings ist davon auszugehen, dass die synthetisierten Substanzen im Liquor cerebrospinalis zirkulieren, sodass von einem generalisierten therapeutischen Effekt ausgegangen werden kann.

Im Folgenden wird kurz auf die in dieser Arbeit beschriebenen Zielzellen eingegangen.

Zu der wichtigsten Zellpopulation, die mittels eines gentherapeutischen Verfahrens erfasst werden kann, gehören die Nervenzellen, die Neuronen (Projektions- und Interneurone). Nervenzellen entsprechen hochspezialisierten Zellformen, die in der Lage sind, Signale aufzunehmen, weiterzuleiten, zu übertragen und zu verarbeiten. Diese Zellen sind in ihrer Spezialisierung so weit differenziert, dass sie nicht mehr in der Lage sind, sich eigenständig stoffwechselaktiv zu versorgen. Für die nutritive Versorgung benötigen sie entsprechende unterstützende Zellen oder Stützzellen. Diese Aufgabe wird im Allgemeinen von Gliazellen übernommen (SCHWARZ et al., 1995).

Zur Gruppe der Gliazellen, die sich ebenfalls als Zielzellen für einen gentherapeutischen Ansatz eignen können, gehören Astrozyten, Oligodendrozyten und Ependymzellen (Neuroglia-Glia), die, wie die Neurone, neuroektodermalen Ursprungs sind.

Die sogenannte Neuroglia besitzt die Fähigkeit, neurotrophe Faktoren zu produzieren, die das Überleben, das Wachstum und die Differenzierung von Neuronen beeinflussen. Zu diesen Faktoren gehören u.a. der Nerven-Wachstumsfaktor (nerve growth factor, NGF), der Gehirn-abstammende Wachstumsfaktor (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) und Neurotrophin (NT 3-5). Es wird vermutet, dass trophische Wechselwirkungen zwischen transmitterhaltenden Neuronen und Gliazellen mit den entsprechenden Rezeptoren bestehen und diese Wechselwirkungen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung des Gehirns spielen. Gliazellen dienen nicht nur der Ernährung und dem Stoffaustausch der Nervenzellen, sie fördern vielfach die Erregungsleitung durch die Ausbildung von Nervenfasershüllen (Markscheiden) und übernehmen gelegentlich als Sonderbildungen des Makrophagensystems (Mikroglia) unspezifische Abwehrfunktionen. Die meisten Nervenzellen stehen in engem strukturellem und funktionellem Kontakt zu den Astrozyten, die als die Ammenzellen des Nervensystems betrachtet werden. Sie sind die größten Gliazellen des Zentralnervensystems und stellen die Hauptstützzellen des ZNS dar. Sie bilden zytoplasmatische Fortsätze aus, die zum einen mit Nervenzellen, zum anderen mit weichen Hirnhäuten in Verbindung stehen und den Blutkapillaren perivaskulär anliegen. Astrozyten entwickeln hierbei mit terminal verbreiterten Fortsätzen gliäre Grenzmembranen, die als Membrana limitans gliae superficialis die Oberfläche des Gehirns abdecken oder die intracerebralen Gefäßräume gegenüber dem Gehirn

abgrenzen (Membrana limitans gliae perivascularis). Astrozyten sind damit Bestandteile der sog. Blut-Hirn-Schranke. Durch diese Barrierefunktion der Astrozyten werden im Nervensystem Mikrokompartimente für Nervenzellen aufgebaut, deren Existenz wesentlich für die Funktion des Nervengewebes ist.

Astrozyten verbinden sich durch ihre Zytoplasmaausläufer mit Nervenzellen und dienen dem Flüssigkeits- und Nährstofftransport zwischen der Nervenzelle und der Kapillare. Diese Gliazellen regulieren die Ionenkonzentration des Nervengewebes (Elektrolythaushalt) und schaffen damit die Voraussetzung für die Membranveränderungen während der Erregungsleitung (Ionenpumpe). Alle Astrozyten enthalten Filamente in ihrem Zytoplasma, das sog. saure Gliafaserprotein (GFAP).

Oligodendrozyten sind kleine runde, lymphozytenähnliche Zellen der weißen Substanz, die im ZNS für die Bildung der Markscheiden verantwortlich sind. Sie umschließen mit ihren Fortsätzen, den Myelinscheiden, typischerweise mehrere Axone und ermöglichen somit die schnelle saltatorische Erregungsüberleitung. Oligodendrozyten, die in ihrer Funktion gestört sind, führen zur Degeneration der Myelinscheiden und somit zur Entmarkung (Multiple Sklerose).

Ependymzellen sind Abkömmlinge der inneren Wandauskleidung des embryonalen Neuralrohrs (Neuroglioblasten) und bleiben zeitlebens am Ort ihrer Entstehung lokalisiert. Sie sind im engeren Sinn gesehen keine Gliazellen. Ependymzellen kleiden als ein iso- bis hochprismatisches Epithel die Hohlräume des zentralen Nervensystems (Ventrikelsystem) und den Zentralkanal des Rückenmarks aus. Bei diesen wandauskleidenden Zellen handelt es sich um spezialisierte Gliazellen, die mittels ihrer Fortsätze einen Flüssigkeits- und Stoffaustausch zwischen Ventrikelliquor und dem Interzellularraum des ZNS ermöglichen (BRUNI et al., 1985). Hierfür sind oberflächlich bei der Mehrzahl der Ependymzellen Mikrovilli und als Reste ihrer Embryonalentwicklung oftmals Kinozilien ausgebildet. Die Produktion des Liquors cerebrospinalis findet im gefäßreichen Plexus choroideus statt. An der Zellbasis verzweigen sich in großer Zahl unterschiedlich lange Fortsätze, die sich Neuronen und lockerem Bindegewebe anlegen. In seiner Gesamtheit stellt dieser ependymale Epithelverband eine funktionsaktive Schranke zwischen den Hohlräumen des Nervensystems und den Neuronen dar.

Da die mittlere turn-over Rate der Ependymzellen bei adulten Tieren mehr als 180 Tage beträgt, ist davon auszugehen, dass eine relativ stabile Transduktion erreicht

werden kann, sodass eine lang anhaltende Synthese der gewünschten Stoffe gewährleistet ist. Der weitere Vorteil der Ependymzellen als Zielzellen für einen direkten somatischen Gentransfer besteht darin, dass sich die Ventrikel in unmittelbarer Nachbarschaft der bei degenerativen Erkrankungen betroffenen Kerngebiete befinden, sodass die Diffusionsstrecken für die synthetisierten, therapeutisch wirksamen Faktoren relativ kurz sind. Des Weiteren sind die Ventrikel für stereotaktische Eingriffe gut zugänglich, sodass die Vektoren sicher und zielgerichtet appliziert werden können.

Mikrogliazellen entsprechen den sogenannten Hirnmakrophagen und stellen die resistente Immunzelle des Zentralnervensystems dar. Sie liegen als kleine, meist sternförmige Gliazellen oft in der Nähe von Gefäßen (perivaskulär) oder im Hirnparenchym vor. Sie besitzen längliche Zellkerne und bizarr geformte, kurze und dünne Ausläufer. Mikroglia haben antigenpräsentierende Eigenschaften, können sich aber auch in phagozytierende Makrophagen umwandeln, bei denen dann intraplasmatisch Phagolysosomen auftreten, die abgestorbene Nervenzellen enthalten (VAN ROSSUM und HANISCH, 2004).

## **1.6 Auswahl spezifischer Hirnareale für einen möglichen gentherapeutischen Ansatz**

Verbunden mit der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung von geeigneten Zielzellen für einen gentherapeutischen Ansatz, ist die Wahl geeigneter Hirnkompartimente, in denen die direkte Injektion der adenoviralen Vektoren bzw. die Transplantation der zuvor transduzierten Trägerzellen von größtem therapeutischem Nutzen sein kann. In der vorliegenden Untersuchung wird dabei als eine der Zielstrukturen das Striatum gewählt, da Zellen dieses Hirnareals bzw. Projektionen von Zellen in dieses Hirnareal bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere bei M. Parkinson und M. Huntington, degenerieren. Da das Corpus striatum (Nucleus caudatus und Putamen) als Teil der Basalganglien in die extrapyramidale Motorik eingebunden ist, ziehen Schädigungen in diesem Areal unwillkürlich schwerwiegende Bewegungsstörungen nach sich.

Das zweite Kompartiment, welches in der vorliegenden Untersuchung als Zielstruktur für eine direkte Vektorinjektion herangezogen wird, ist das Corpus callosum.

Das Corpus callosum stellt ein dickes Faserbündel dar, das eine Verbindung funktionell verwandter Teile der linken und rechten Hemisphäre ist. Das Corpus callosum oder der Balken bildet das Dach des dritten Ventrikels. Nach unten schließt sich als Trennung der beiden Seitenventrikel das Septum pellucidum an. Cranial befindet sich eine weitere Verbindungsstruktur zwischen linker und rechter Hemisphäre, die „vordere Verbindung“ (Commissura anterior).

An die direkte Injektion der Vektorpartikel in das Corpus callosum ist die Fragestellung geknüpft, ob nach Injektion von Vektorpartikeln in diesen Fasertrakt eher eine lokale Transduktion der Zellen um das Injektionsareal erzielt wird oder ob eine Verteilung des Vektors innerhalb des Fasertraktes auch in Richtung der kontralateralen Hemisphäre und damit eine generalisierte Zelltransduktion erzielt werden kann.

Die dritte Zielstruktur für eine Vektorinjektion innerhalb des ZNS ist das Ventrikelsystem. Dabei soll untersucht werden, ob es nach Vektorinjektion zu einer generalisierten Transduktion der ventrikelauskleidenden Ependymzellen kommt. Der Hintergrund für diese Teiluntersuchung ist die Frage, ob die Ependymzellen genetisch derart modifiziert werden können, dass sie für einen therapeutischen Nutzen beispielsweise zur Synthese von neurotrophen Faktoren oder biogenen Aminen angeregt werden können. Dies ist deshalb von großer Bedeutung, da die Ependymzellen bzw. der gesamte Liquorraum in unmittelbarer Nachbarschaft zu den verschiedensten Kerngebieten des ZNS stehen, wo ein therapeutischer Eingriff nötig und damit vorteilhaft sein kann.

Dieses von Ependymzellen ausgekleidete System von Hohlräumen setzt sich aus zwei Seitenventrikeln, die sich in jeder der beiden Gehirnhälften befinden (auch 1. und 2. Ventrikel genannt) und jeweils mit dem in der Mitte (zwischen den Thalami) gelegenen 3. Ventrikel verbunden sind, zusammen. Vom 3. Ventrikel führt in Höhe des Mittelhirns ein schmales Röhrchen, der Aquäduktus cerebri, zum rautenförmigen 4. Ventrikel. Die Wand des 4. Ventrikels wird nach caudal vom Kleinhirn und nach cranial vom Rautenhirn des Hirnstamms gebildet. Hier existieren seitliche Verbindungen zum Subarachnoidalraum, nach unten schließt sich der zentrale Liquorraum des Rückenmarks, der Zentralkanal, an. In den Gehirnentrikeln befindet sich ein mit Mikrovilli ausgestattetes, gefäßreiches Gewebe, der Plexus choroideus genannt wird, in welchem der Liquor produziert wird (BRUNI et al., 1985).

## **1.7 Therapeutisch relevante Substanzen für einen genterapeutischen Einsatz**

Bei den therapeutisch relevanten Substanzen zur Behandlung der Parkinsonschen Krankheit wird generell zwischen zwei Gruppen, symptomatisch vs. neuroprotektiv, unterschieden. Bei der einen Gruppe handelt es sich um die Substitution von Neurotransmittern (L-Dopa) bzw. Dopaminrezeptor-Agonisten (Bromocriptin, Pergolid, Carbergolin, Ropinirol), da im Zuge von neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise bei Morbus Parkinson, häufig ein Mangel eines der für die Motorik dringend benötigten Neurotransmittern entsteht, wodurch die Signalweitergabe von einer Nervenzelle zur anderen garantiert wird. Durch die Erregung der Präsynapse wird das elektrische Signal in ein chemisches Signal (Neurotransmitter) umgewandelt. Eine Mikroinjektion eines entsprechenden Transmitters in den synaptischen Spalt ruft die gleiche Reaktion hervor wie eine Erregung der präsynaptischen Nervenzelle. Weiterhin müssen die präsynaptischen Nervenendigungen (Vesikel) reich an dieser Substanz sein und, um auf postsynaptische Nervenendigungen einwirken zu können, muss die gezielte Freisetzung des Transmitters aus der präsynaptischen Nervenzelle zum richtigen Zeitpunkt und in ausreichender Menge erfolgen. Im Zuge von M. Parkinson kommt es zum Verlust des Neurotransmitters Dopamin, der von den dopaminergen Neuronen in der Pars compacta der Substantia nigra synthetisiert wird. M. Parkinson zeichnet sich durch Zittern, Muskelstarre und Störungen der Körperhaltung aus. Dopamin gehört zusammen mit Adrenalin und Noradrenalin zur Familie der Katecholamin-Neurotransmitter. Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin sind ein Decarboxylierungsprodukt der Aminosäure Tyrosin (GRACE et al., 1998). Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und auch Serotonin kommen in den verschiedenen Regionen des Gehirns unterschiedlich oft vor und werden in den sympathischen Nervenendigungen und in der Nebenniere aus Tyrosin bzw. Tryptophan synthetisiert. Die Aminosäure Tyrosin wird zu 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) hydroxyliert. Diese Reaktion wird von der Tyrosin-Hydroxylase (TH-Hydroxylase) katalysiert. Molekularer Sauerstoff wird von Tetrahydropterin, dem Cofaktor, aktiviert. Der nächste Schritt ist die Dekarboxylierung von Dopa durch die Dopa-Decarboxylase (pyridoxalphosphatabhängig) zu 3,4-Dihydroxyphenylethylamin (Dopamin). Zur Therapie der Parkinsonschen Krankheit werden Dopa und Inhibitoren der Decarboxylase eingesetzt.

Noradrenalin entsteht weiterhin durch Hydroxilierung von Dopamin. Diese Reaktion wird durch eine kupferhaltige Dopamin  $\beta$ -Hydroxylase katalysiert. Anschließend wird Noradrenalin durch eine Transmethylase zu Adrenalin methyliert (STRYER, 1994).

Die zweite Gruppe der therapeutisch relevanten Substanzen umfasst die Gruppe der neurotrophen Faktoren, deren adenoviral induzierte Überexpression zu einer verstärkten Anflutung im geschädigten Hirnareal führen kann. Es wird davon ausgegangen, dass dieses erhöhte Aufkommen der trophischen Faktoren einer Degeneration entgegenwirken kann. Zu den Faktoren, von denen solch eine protektive Wirkung gezeigt werden kann und deren Sequenzen für den Einsatz von gentherapeutischen Behandlungsstrategien diskutiert wird, gehören NGF, BDNF, GDNF etc. Experimentelle in-vitro Untersuchungen lassen vermuten, dass neurotrophe Faktoren wie der nerve growth factor, der brain-derived neurotrophic factor und der glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) das Potential zur Therapie verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. des M. Parkinson, besitzen (KNUSEL et al., 1991; HYNES et al., 1994; MEYER et al., 2000; KRIEGLSTEIN, 2004). Insbesondere vom glial cell line derived neurotrophic factor, einem Mitglied der Familie des transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ist gezeigt worden, dass er das Überleben und die morphologische Differenzierung von embryonalen dopaminergen Neuronen fördert (LIN et al., 1993; GASH et al., 1996). Eine Stimulierung über GDNF resultiert in einer extensiveren Fortsatzbildung, vergrößerter Zellsomata und einer erhöhten Dopaminaufnahme. Außerdem kann gezeigt werden, dass GDNF einen protektiven Effekt auf degenerierende adulte dopaminerge Neurone in-vivo hat (BECK et al., 1995). Eine einzige intranigrale Injektion von GDNF, 24 Stunden vor der Induktion einer nigralen Läsion mittels 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), vermag eine TH Immunreaktivität für mehr als 2 Wochen im Rattenhirn aufrechtzuerhalten (KEARNS und GASH, 1995). Darüber hinaus kann eine funktionelle Verbesserung der Parkinsonsymptome in MPTP geschädigten Primaten gezeigt werden (GASH et al., 1996).