

2 Material und Methoden

2.1 Adenoviraler Vektor

Die adenoviralen Vektoren wurden von Herrn Dr. Christoph Volpers, vormals Mitarbeiter in der Nachwuchsgruppe (Leiter: PD Dr. S. Kochanek) des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) und derzeit wissenschaftlicher Leiter der Firma Cevec Pharmaceuticals, hergestellt.

Für die Produktion des high capacity adenoviralen Vektors wurde das cre-lox Rekombinationssystem des Bakteriophagen P1 genutzt (PARKS et al., 1996; HARDY et al., 1997). In diesem Produktionsschema wurde ein Helfervirus verwendet, das zwei lox-Erkennungssequenzen enthielt, die das Verpackungssignal flankierten. Der Vektor wurde in HEK 293 Zellen produziert, die die cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 exprimierten (CHEN et al., 1996). Nach Infektion der Zellen sowohl mit dem Helfervirus als auch mit dem Vektor wurde das Verpackungssignal des Helfervirus mit hoher Effizienz herausgeschnitten, was in einer präferentiellen Verpackung des Vektors resultierte. Mit Hilfe dieses Systems wurde die Produktion vereinfacht und die Kontamination des Vektors mit Helfervirus auf 0,1% mittels einer CsCl-Dichtegradientenzentrifugation minimiert. Darüber hinaus wurde gleichzeitig die Ausbeute des Vektors erhöht.

Der adenovirale Vektor, der im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, war ein Vektor der dritten Generation (high capacity (hc)) Hc-Ad CV 32. Dieser Vektor enthielt das Reporter-gen lacZ (β -Galaktosidase) und das Markerenzym SEAP (secreted human placental alkaline phosphatase), die in die E1 Region des Virusgenoms eingebracht worden sind und diese dort ersetzen. Dadurch wurden dem Virus kodierende Sequenzen, die z.B. zur Produktion viraler Proteine nötig waren, entzogen. Das Virus war somit replikationsdefizient und wies aufgrund dieser Eigenschaft nur eine geringe Toxizität und Immunogenität auf. Mit dem Einsatz der eingebrachten Marker- bzw. Reporterenzyme konnte eine erfolgreiche Transduktion der Zielgewebe sichtbar gemacht werden bzw. die Syntheserate des Reporterenzym luminometrisch bestimmt werden.

Der zweite Vektor Ad CV 39, der für die vorliegende Untersuchung herangezogen wurde, war ebenfalls ein adenoviraler Vektor der dritten Generation, der die Reportergene lacZ (β -Galaktosidase) und EGFP (enhanced green fluorescent protein) enthielt. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 507 nm. Beide verwendeten Vektoren wurden sowohl in-vivo mittels stereotaktischer Injektion im Tiermodell als auch in-vitro, d.h. in der Zellkultur, an verschiedenen Zelltypen getestet.

Die Reportergene standen unter der Kontrolle verschiedener Promoter-Sequenzen. Während der Promoter innerhalb der Sequenz des AD CV 32 Vektors der β -Gal Sequenz der Cytomegalieviruspromoter (CMV) vorangestellt war, stand die Expression des Markerenzym SEAP unter der Kontrolle eines Simian Virus 40 (SV 40) Promoters. Dagegen stand die GFP Expression des Ad CV 39 Vektors unter der Kontrolle des Elongationsfaktors 1α -Promoters (EF- 1α). EF- 1α war ein Elongationsfaktor, der ursprünglich aus der Zelle selber stammte, wo er für die Translation zuständig war. Im Falle der Verwendung in einem Vektor wie diesem, diente er einer starken Überexpression des Reportergens, indem er diesem Gen vorangestellt wurde.

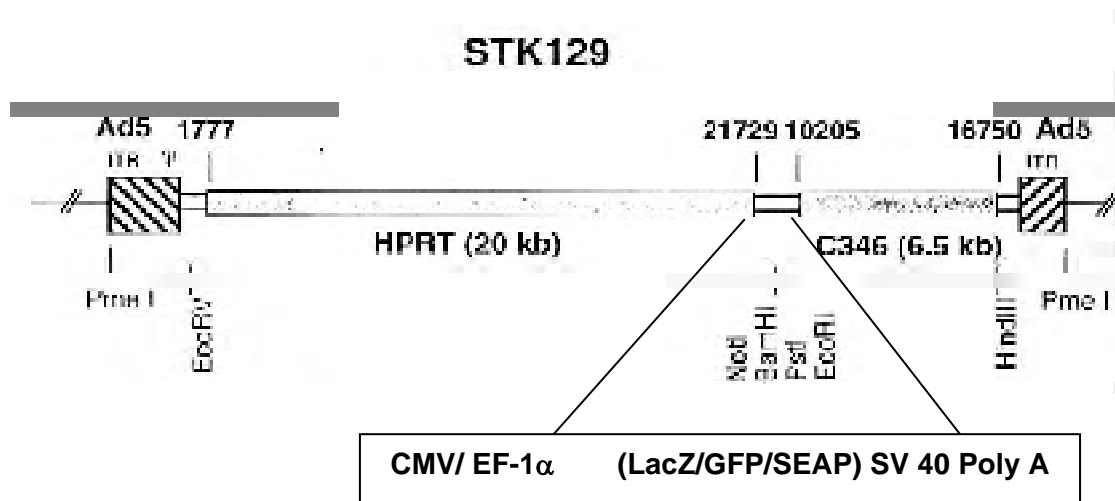


Abb. 4: Schema über den Aufbau eines high capacity adenoviralen Vektors. Der Vektor bietet eine Aufnahmekapazität von 36 kb Fremd-DNA. Als Promotoren werden alternativ der CMV Promoter bzw. der SV 40 Promoter oder der Promoter für den Elongationsfaktor 1α eingesetzt.

2.2 Untersuchung zur Transduktionseffizienz der adenoviralen Vektoren in-vitro

Für die Untersuchung der Transduktionseigenschaften in-vitro wurde in dieser Arbeit mit Astrozytenprogenitorzellen aus der embryonalen Ratte, mit humanen Astrozyten aus Resektatmaterial von neurochirurgischen Eingriffen stammend sowie neural differenzierten embryonalen Stammzellen der Wildtypzelllinie D3 und mit embryonalen Stammzellen eines Nestin Klonen (Subklon der D3 Zelllinie) gearbeitet. Darüber hinaus wurden humane mesenchymale Stammzellen hinsichtlich ihrer Transduktionseigenschaften in-vitro getestet.

2.3 Kultur der verwendeten Zelllinien

2.3.1 Astrozytenprogenitorzellen aus der embryonalen Ratte

Spontan immortalisierte astrozytäre Zellklone wurden aus neuronalen Vorläuferzellen von embryonalen Ratten der Entwicklungsstadien E16 bzw. E19 aus dem Striatum gewonnen. Dazu wurden die Zellen nach Isolation über 4 Wochen unter proliferativen Bedingungen in einem DMEM/F12 Medium (Fa. Invitrogen), das mit den Zusätzen N2 (Invitrogen) sowie mit 20 ng/ml EGF/bFGF supplementiert war, kultiviert. Anschließend wurden sie ohne den Zusatz der mitogenen Faktoren EGF/bFGF weiterkultiviert. Spontan proliferierende Zellklone wurden nach wiederholtem Passagieren der Zellen isoliert. Um die gliale Differenzierung der proliferierenden, undifferenzierten Zellen dieser Klone zu induzieren, wurden diese in ein DMEM/F12 Medium mit einem Zusatz von 10% FCS überführt.

Schließlich wurden zwei Zelllinien striataler Herkunft der Entwicklungsstadien E16 und E19 subkloniert, indem die Zellen in klonaler Dichte ausplattiert wurden. Diese Klone wurden anschließend als S16 bzw. S19 bezeichnet, sodass auf das Ursprungsareal sowie das Entwicklungsstadium der Zellisolation geschlossen werden konnte.

Die kontinuierlich proliferierenden Zellen wurden anschließend so lange in einem Medium mit einem Serumanteil von 10% auf Gewebekulturschalen bei 37°C in 5% CO₂ kultiviert, bis sie auf der Schale konfluent gewachsen waren.

Um die Differenzierungskapazität dieser Zellen in-vitro zu charakterisieren, wurden die Zellen mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase (50 μ M; Fa. Sigma), behandelt.

2.3.2 Humane Astrozyten aus Resektatmaterial

Die humanen Zellen wurden aus dem Hippokampus einer 12-jährigen Epilepsiepatientin im Zuge der Resektion eines gutartigen glioneuronalen Tumors (WHO Grad I) isoliert. Das angrenzende physiologische Hippokampusgewebe enthielt den Kopf und Teile der Digitationes hippocampi, Teile der kollateralen Eminenz sowie Teile des Subiculum. Für den zweistündigen Transport vom Epilepsiezentrum in Bethel/Bielefeld zum Institut für Anatomie der Universität zu Köln wurde das Resektatmaterial in DMEM/F12 Medium auf Eis gelagert. Nach Ankunft in Köln wurde das Material unverzüglich weiterverarbeitet. Dazu erfolgte zunächst die sorgfältige Entfernung der Meningen und die Zerkleinerung des Gewebes in kleine Würfel. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe einer feuerpolierten Pasteurpipette in einer Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien Phosphat gepufferten Salzlösung mit einem Glukoseanteil von 4,5 g/l dissoziiert. Zusätzlich wurde der Zellsuspension zur Unterstützung der Dissoziation Accutase (Fa. PAA) beigefügt und diese für 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein gleiches Volumen des Mediums DMEM/F12 zugefügt und die Zellsuspension zentrifugiert. Das Sediment wurde wieder in DMEM/F12 mit den Zusätzen L-Glutamin (2 mM), Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 μ g/ml), 1% (vol/vol) N2 Supplement (BOTTENSTEIN und SATO, 1980), 20 ng/ml EGF und 20 ng/ml bFGF in einer 100 mm Zellkulturplatte resuspendiert. Die Zellen wurden in einer feuchten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO_2 und 18,8% O_2 inkubiert.

Unter diesen Kulturbedingungen konnte keine Proliferation neuraler Stammzellen in Neurosphären beobachtet werden. Allerdings erfolgte die Adhäsion zahlreicher Zellen auf dem Boden der Kulturschale. Nach Zugabe von DMEM/F12 und den oben genannten Additiven konnten einige Zellkolonien mit Astrozyten-ähnlichen Zellen angereichert werden. Die Zellen wurden mit Hilfe der Accutase (Fa. PAA) abgelöst und wieder in DMEM/F12 Medium mit den bereits genannten Zusätzen, allerdings ohne EGF/bFGF, ausplattiert. Diese klonalen als hippokampale astrozytäre Vorläuferzellen deklarierten Zellen wurden so lange kultiviert, bis auf der Petrischale ein annähernd konfluenter Zellrasen zu detektieren war; sie wurden

jede Woche einmal in einer Verdünnung von 1:3 replattiert. Für die Transfektionsexperimente bzw. für immunzytochemische Analysen wurden die Zellen in ein Wachstumsmedium mit einer Dichte von ungefähr 50 Zellen pro mm² auf Poly-L-Lysine beschichteten Glasplättchen in eine 4-Well Kulturschale transferriert.

Einen Tag vor der Transduktion mit dem rekombinanten adenoviralen Vektor wurde der Serumanteil im Medium auf 1% reduziert.

2.3.3 Neural differenzierte embryonale Stammzellen

Für die Transduktionsexperimente an ES-Zellen wurde mit der embryonalen Stammzelllinie D3 der Maus gearbeitet (DOETSCHMAN et al., 1985). Dabei handelte es sich um pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse der Mausblastocyste gewonnen wurden. Verwendet wurden die D3-Wildtypzelllinie (American Type Culture Collection/Developmental Studies Hybridoma Bank/DSHB) sowie zwei der mit dem Nestin-EGFP-Vektor konstrukt transfizierten 25 Subklone (Subklon 1 und 2, zur Verfügung gestellt von Prof. Hescheler, Institut für Neurophysiologie der Universität zu Köln).

Die Zellen wuchsen in Kolonieförmigkeit auf gelatinebeschichteten (0,1% Gelatinelösung, Fa. Sigma) Zellkulturschälchen (Fa. Falcon) in einer feuchten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert.

Das für die Kultivierung der Zellen verwendete Medium war chemisch definiert (Knockout™ D-MEM; Fa. Invitrogen) und wurde mit 15% Knockout-Serumreplacement (Knockout-SR™; Fa. Invitrogen) supplementiert. Das Knockout-SR™-Medium wurde speziell für die Kultivierung von ES-Zellen entwickelt, um chargenabhängige Schwankungen von serumhaltigem, chemisch nicht definiertem Medium auszuschließen. Somit konnten einheitliche Versuchsbedingungen in chemisch definiertem synthetischem Medium garantiert werden.

Kultivierungsmedium für die Stammzellen (KO-SR):

15% Knockout™-SR
100 x MEM (nicht-essentielle Aminosäuren)
2 mM L-Glutamin
100 µM β-Mercaptoethanol
50 U/ml Penicillin/Streptomycin
in Knockout™ D-MEM

Alle zur Herstellung des Kultivierungsmediums benötigten Substanzen wurden von der Fa. Invitrogen erworben. Für alle Waschschriffe wurde 0,1 M PBS (Phosphat-Buffered Saline) verwendet.

Zusammensetzung des Phosphatpuffers (0,1 M PBS):

8 g/l NaCl (Fa. Merck)
0,2 g/l KCl (Fa. Merck)
1,44 g/l Na₂PO₄ (Fa. Merck)
0,24 g/l KH₂PO₄ (Fa. Merck)
in Aqua dest. (pH 7,4)

Zur Passagierung wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Ablösung der Zellen wurde durch Zugabe von 800 µl Trypsin-EDTA (Fa. Invitrogen) pro 60 mm Zellkulturschale erreicht. Nach einer Einwirkzeit von einer Minute bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von serumhaltigem Medium abgestoppt.

Medium mit Zusatz von foetalem Kälberserum

15% foetales Kälberserum (Fa. Invitrogen)
100 x MEM (nicht-essentielle Aminosäuren)
2 mM L-Glutamin
100 µM β-Mercaptoethanol
50 U/ml Penicillin/Streptomycin
in Dulbecco`s Modified Eagle Medium/DMEM (Fa. Invitrogen)

Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen (Fa. Falcon) überführt, abzentrifugiert (800 U/min, 5 Minuten) und das so erhaltene Zellkonglomerat in dem Kultivierungsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden nun mit Hilfe einer

Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden je 1 Million Zellen pro 60 mm Zellkulturschale im Kultivierungsmedium resuspendiert und in die Zellkulturschale überführt.

Durch Zusatz des Leukemia Inhibitory Factors (rekombinanter Maus Leukämie-inhibierender Faktor/LIF; 10^{-9} U/ml; Fa. Invitrogen) wurden die embryonalen Stammzellen in ihrer Differenzierung gehemmt und verblieben im undifferenzierten Zustand (SMITH et al., 1988). Bei diesem Verfahren erübrigte sich der Einsatz der sonst üblichen LIF-produzierenden Feederzellen.

Das Antibiotikum Neomycin (Genitcin™; 4 µl/ml Medium; Fa. Invitrogen) wurde für die Selektionierung der transfizierten Zellen genutzt. Alle Medien und Medienzusätze waren steril und wurden unter sterilen Bedingungen verwendet. Die ES-Zellen der beiden Nestinklone und des D3-Wildtyps wurden regelmäßig im Hinblick auf ihre Morphologie, Dichte und Grünfluoreszenz lichtmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch mit einem Axiophot-Mikroskop der Fa. Zeiss unter Einsatz eines Filters mit der Wellenlänge von 507 nm untersucht.

2.3.4 Neurale Differenzierung der ES-Zellen

In dem Standardprotokoll zur neuralen und myogenen Differenzierung der ES-Zellen wurde ausschließlich Knockout™ D-MEM mit 15% Serumersatz ohne Zusatz von LIF oder Neomycin verwendet. Die Aggregation zu dreidimensionalen Zellkonglomeraten, den sogenannten Embryoid Bodies (EBs), erfolgte über einen Zeitraum von 3 Tagen in der Präparation des hängenden Tropfens (1000 Zellen/20 µl). Die so gebildeten EBs verblieben anschließend über 4 Tage in Suspensionskultur, um dann auf Gelatine ausplattiert zu werden.

Zur gezielten Selektion neuraler Vorläuferzellen diente das ITSFn-Protokoll, bei dem das Medium mit Insulin, Transferrin, Selenchlorid und Fibronectin supplementiert wurde (OKABE et al., 1996). Die Aggregation zu Embryoid Bodies erfolgte über 3 Tage in Massenkultur. Dazu wurden 1 Million Zellen in 10 ml Medium (Knockout D-MEM mit 15% Serumersatz ohne Zusatz von LIF oder Neomycin/15% KSR) in eine bakteriologische Schale (90 mm; Fa. Greiner) gegeben. Die gebildeten EBs wurden auf Gelatine zunächst in 15% KSR ausplattiert, und nach einem Tag erfolgte ein Wechsel zum ITSFn-Medium. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über maximal 18 Tage. Innerhalb dieses Zeitraumes wurden die Zellen täglich licht- und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Zusammensetzung ITSFn-Medium:

5 µg/ml Insulin
50 µg/ml Transferrin
30 nM Selenchlorid
5 µg/ml Fibronectin
in D-MEM/F12

Sämtliche Bestandteile des ITSFn-Mediums wurden von der Fa. Invitrogen erworben.

Okabe et al. (1996) beobachtete am sechsten bis achten Tag nach Plattieren der EBs das Maximum an neuronalen Vorläuferzellen. Aus diesem Grund und aufgrund eigener Beobachtungen an den Nestin-Klonen (ANDRESSEN et al., 2001) wurde der siebte Tag nach Plattieren der EBs für die weitere Selektion der neuronalen Vorläuferzellen gewählt.

Zur Ausdifferenzierung der nach dem ITSFn-Protokoll gewonnenen neuronalen Vorläuferzellen zu reifen Neuronen wurde B27-Medium verwendet.

Zusammensetzung B27-Medium:

B27-serumfreies Supplement 2% (Fa. Invitrogen)
Penicillin/Streptomycin 50 U/ml (Fa. Invitrogen)
in D-MEM/F12 (Fa. Invitrogen)

Je 1 Million der nach dem ITSFn-Protokoll gewonnenen Zellen wurden am siebten Tag nach Plattieren der EBs in ein Laminin/Polyornithin-beschichtetes Zellkulturschälchen (60 mm Durchmesser) in B27-Medium überführt. Zuvor wurden die EBs mit Hilfe von 100 mM EDTA (Fa. Merck) in PBS schonend dissoziiert. Eine Beschichtung mit Laminin (10 µg/ml PBS) und Poly-L-Ornithin (0,01%, beides Fa. Sigma) verbesserte die Anheftung und unterstützte die neurale Differenzierung der Zellen. Die Differenzierung der nach dem ITSFn-Protokoll gewonnenen neuronalen Vorläuferzellen zu reifen Neuronen wurde semiquantitativ durch Anfärbung verschiedener neuronaler Differenzierungsstadien mit spezifischen Antikörpern kontrolliert, s.o.

Für die Zugabe des basic fibroblastic growth factors/bFGF als Proliferationsförderer wurden nach dem ITSFn-Protokoll differenzierte EBs ebenfalls am siebten Tag nach Plattieren mit Hilfe von EDTA dissoziiert und je 500.000 Zellen in eine Laminin/Polyornithin beschichtete Zellkulturschale (30 mm Durchmesser) überführt. Als Medium wurde ITSFn-Medium mit Zusatz von 5 ng/ml bFGF (Fa. Invitrogen) verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen licht- und fluoreszenzmikroskopisch beobachtet und anschließend mittels des adenoviralen Vektors infiziert.

2.3.5 Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark

Für die Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus der Ratte wurden die langen Röhrenknochen (Femur und Tibia) aus 8-12 Wochen alten männlichen Ratten freipräpariert und die Epiphysen abgetrennt. Anschließend wurde das Knochenmark unter Verwendung von 5 ml α -MEM (Fa. Invitrogen) mittels einer Spritze herausgespült. Zwischen 100 und 200 x 10⁶ Zellen der isolierten Zellen wurden anschließend auf 10 mm Kulturschalen ausplattiert. Das Plattierungsmedium bestand aus α -MEM mit einem Serumanteil von 10% foetalem Kälberserum (FCS). Nach 24 Stunden wurden die nicht-adhärenenten Zellen mit einem Mediumwechsel entfernt. Die weiteren Medienwechsel erfolgten alle 2-3 Tage, wenn die Zellen den Boden der Kulturschale konfluent bedeckten.

Humane mesenchymale Stammzellen wurden aus dem Femur im Zuge von Hüftgelenksoperationen, die an der Klinik für Orthopädie der Universität zu Köln durchgeführt wurden, von weiblichen oder männlichen Spendern zwischen 19 und 65 Jahren isoliert. Eine weitere Quelle des Knochenmarks war Sternalpunktat, das aus der Klinik für Thorax- und Herzchirurgie der Universität zu Köln zur Verfügung gestellt wurde. Das Zellmaterial wurde 1:1 mit α -MEM mit einem Serumanteil von 20% FCS verdünnt und mittels eines Dichtegradienten (Ficoll-Paque Plus, 1,077 g/ml, Pharmacia) für 30 min bei 800 g aufgetrennt. Der Überstand und die Zwischenphase wurden vereint und auf ein Endvolumen von 50 ml mit α -MEM mit einem Serumanteil von 20% FCS verdünnt und anschließend zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Resuspendierung des entstandenen Pellets in 1 ml Medium. Die kernhaltigen Zellen wurden gezählt und in einer Konzentration von 1 x 10⁷/ml in α -MEM in Gegenwart von 20% FCS

resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in einer Dichte von $3 \times 10^6/\text{cm}^2$ in 100 mm Falcon Kulturschalen ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 Tage inkubiert und die nicht-adhärenenten Zellen durch einen Mediumwechsel entfernt. Nachdem die Zellen in den Kulturschalen konfluent gewachsen waren, wurden sie mittels Accutase (Fa. PAA, Cölbe) bei 37°C innerhalb von 3-4 Minuten abgelöst. Sie wurden dann in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt und erneut replattiert.

Für die Selektion und Expansion von neuronalen Vorläufer-ähnlichen Zellen wurden 150.000 mesenchymale Stammzellen auf Poly-Ornithin beschichteten Kulturschalen für 5 Tage in einem DMEM/F12 Medium, welches mit dem Supplement B27 (Fa. Invitrogen) versehen war, kultiviert. Darüber hinaus erfolgte noch die Zugabe der mitogenen Faktoren EGF und bFGF.

Erste Zellen mit neuronalen Charakteristika (Markerexpression) konnten 5 Tage nach Selektionierung beobachtet werden.

2.4 Transfektion der verschiedenen Zellen

Die Astrozytenzelllinien der Ratte sowie die humanen Astrozyten, die aus Resektatmaterial gewonnen wurden, wurden in einer 24-Loch Multi-Well Platte mit je 200.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Das für die Kultivierung verwendete Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Medium mit Zusatz von foetalem Kälberserum

1% foetales Kälberserum (Fa. PAA Laboratories)

100 x MEM (nicht-essentielle Aminosäuren) (Fa. Invitrogen)

2 mM L-Glutamin 200 mM 100 x (Fa. Invitrogen)

100 µM β-Mercaptoethanol

50 U/ml Penicillin/Streptomycin 5000 U/ml (Fa. Invitrogen)

in Dulbecco`s Modified Eagle Medium/DMEM 4500 mg

Glucose (Fa. Sigma)

Die Zellen wuchsen gleichmäßig verteilt auf Poly-L-Lysin (0,01% Lösung, Fa. Sigma) beschichteten Glasplättchen in den 24-Loch-Schalen bei einer feuchten Atmosphäre von 37°C und 5% CO₂. Am ersten Tag nach dem Ausplattieren wurden

die Astrozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 MOI, 50 MOI, 100 MOI) des adenoviralen Vektors infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurde an diesen Zellen der β -Galaktosidase-Nachweis durchgeführt sowie die SEAP Expression histochemisch und immunhistochemisch nachgewiesen.

Die embryonalen Stammzellen der D3-Zelllinie wurden nach Selektionierung der neuralen Vorläuferzellen für die Transfektion auf gelatinebeschichteten Kulturschalen (Durchmesser 6 cm) ausplattiert. Nach Plattierung wurden die neural selektionierten ES-Zellen ebenfalls mit unterschiedlichen Konzentrationen (siehe oben) des adenoviralen Vektors infiziert. Nach zweitägiger Inkubation der infizierten Zellen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂, wurde an diesen Zellen ein SEAP bzw. β -Galaktosidaseassay zum Nachweis des Transduktionserfolges durchgeführt.

In gleicher Weise wurden auch die humanen mesenchymalen Stammzellen transduziert.

2.4.1 Transfektion von Rattenastrozyten nach Behandlung mit einem Proliferationsinhibitor

Rattenastrozyten, die sich in der siebten Passage befanden, wurden in einer 24-Loch Schale ausgesät. In jede Vertiefung, in der sich ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Glasplättchen befand, wurden 5.000 Zellen gegeben und in 10% DMEM gehalten. Nach zweitägiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt waren die Zellen auf dem gesamten Plättchen gut angewachsen. Anschließend wurden sie mit dem Proliferationsinhibitor Mitomycin C (Fa. Sigma) behandelt und somit in ihrer weiteren Teilung blockiert. Mitomycin wurde in einer Konzentration von 1,25 μ l/500 μ l Medium eingesetzt, und die Zellen wurden eine Stunde bei 37°C in 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Einwirkzeit wurden die Zellen mit 500 μ l 10% DMEM Medium gewaschen und schließlich mit je einem Milliliter frischem Medium aufgefüllt. 24 Stunden später erfolgte die Infektion der wachstumblockierten Zellen mit dem adenoviralen Vektor Ad CV 32 in einer Konzentration von 50 MOI über 48 Stunden wiederum im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂.

Der Kulturüberstand wurde nach den ersten 48 Stunden nach der Transfektion zunächst verworfen, um zu verhindern, dass im Medium enthaltene Vektorpartikel das Ergebnis verfälschten. Anschließend wurde das Medium der Astrozyten alle zwei Tage in einem Pool gesammelt und ein Milliliter davon bei -20°C gelagert, um die sezernierte alkalische Phosphatase im dem Medium luminometrisch nachweisen

bzw. quantifizieren zu können. Im Weiteren wurden alle zwei bis drei Tage transfizierte Zellen zur immunhistochemischen Analyse von SEAP herangezogen. Der Versuchszeitraum betrug insgesamt vier Wochen.

2.5 Stereotaktische Injektion der adenoviralen Vektoren

Für die stereotaktische Vektorinjektion wurden ausschließlich männliche adulte Han Wistar Ratten mit einem Gewicht von 280-300 Gramm verwendet (n=3). Nach vorheriger Betäubung mit CO₂ (Fa. Air Liquide, Düsseldorf) wurden die Tiere mit einer Injektionsnarkose Ketanest/Rompun (Ketamin 87 mg/kg i.p., Fa. Parke Davis und Xylazinhydrochlorid 13 mg/kg i.p., Fa. Bayer) anästhesiert.

Der Kopf des Tieres wurde an drei Punkten (am Oberkiefer und den beiden äußeren Gehörgängen) in einen stereotaktischen Rahmen (Fa. Stoelting, Wood Dale, Illinois) gespannt und so fixiert, dass das Schädeldach in Höhe des Bregmas waagrecht stand. Der Bereich der Trepanation wurde mit Hilfe eines Rattenanatomieatlasses (Paxinos und Watson, 1986) ermittelt. Nach Anlegen eines sagittalen Hautschnittes wurde das knöcherne Schädeldach mit Hilfe eines Präzisions-Wellenbohrers (Fa. Proxon, Minimot 40/E), unter Vermeidung einer Duraläsion, geöffnet. Die Koordinaten der Trepanationsöffnung entsprachen denen für das Striatum bzw. denen des lateralen rechten Ventrikels und des Corpus callosum (CC) (Bregma: A + 0,3 mm, L 3,5 mm, V 5,4 mm Striatum und A – 0,8 mm, L 1,6 mm, V 3,5 mm rechter Ventrikel sowie A 0,0 mm, L 1,5 mm, V 2,8 mm Corpus callosum).

Pro Tier wurden 10 µl ($1,3 \times 10^7$ infectious units) des Vektors in einem sterilen Trägermedium (physiologische Kochsalzlösung) mit Hilfe einer 25 µl N-702-N Hamilton-Spritze durch das Bohrloch langsam injiziert, d. h. über mehrere Minuten (Injektionstiefe: 5,4 mm Striatum bzw. 3,5 mm rechter Ventrikel und 2,8 mm CC). Nach abgeschlossener Injektion blieb die Injektionsnadel für weitere zwei Minuten im Injektionsareal liegen, um ein Angleichen des finalen Injektionsdrucks zu ermöglichen. Anschließend wurde die Injektionsnadel wieder langsam entfernt. Der Verschluss der Operationsöffnung erfolgte mit einer Hautnaht.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden anstelle des Vektors in-vitro transfizierte Zellen in das Striatum (unilateral) der adulten Ratte injiziert. Dabei handelte es sich um Rattenastrozyten (S19), die mit einem GFP/lacZ Vektor in einer Konzentration

von 50 MOI in-vitro transfiziert wurden. Die Zellen wurden zuvor 48 Stunden in Kultur gehalten, bis das GFP Signal (Grünfluoreszenz) unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden konnte. Die Astrozyten wurden dann in 5 µl Zellsuspension, in der circa 60.000 Zellen in DMEM-Medium enthalten waren, langsam in das Striatum der Ratte injiziert. Der allgemeine Ablauf der Zellinjektion entsprach dem oben geschilderten für die direkte Vektorinjektion.

2.6 Anbringen einer permanenten Sonde in den lateralen Ventrikel bei der Ratte

In diesem Versuchsansatz wurden ebenfalls männliche Han Wistar Ratten verwendet (n=1). Sie wiesen allerdings ein etwas geringeres Körpergewicht auf (ca. 220 Gramm) als in dem vorher beschriebenen Versuchsabschnitt.

Zunächst wurde der Katheter angefertigt. Dieser wurde aus einer 16 Gauge Kanüle (0,6 mm x 25 mm) hergestellt. Dazu wurde die Kanüle in 6 mm lange Einzelstücke geschnitten und die Enden konisch angeschliffen. In die Oberfläche dieser neu entstandenen Katheter wurden für eine bessere Verankerung im Schädelknochen mit einem Skalpell mehrere parallel angeordnete Rillen eingeschnitten.

Die Applikationskanüle wurde ebenfalls aus einer 16 Gauge Kanüle in Verbindung mit einer Hamiltonkanüle hergestellt (79632 RN NDL (32/2"/3) S3 PK). Aus der 16 Gauge Kanüle wurde ein 10 mm langes Stück herausgeschnitten, welches zur Stabilisierung der sehr dünnen Hamiltonkanüle diente. Die Hamiltonkanüle wurde so in die 16er Kanüle eingeführt, dass 9 mm am vorderen Ende herausragten. Am hinteren Ende konnte die Hamiltonkanüle beliebig weit überstehen. Dieses Ende diente der Befestigung am Applikationsschlauch. Die Hamiltonkanüle wurde mit Sekundenkleber mit der 16er Kanüle verklebt. Die Applikationskanüle diente zum einen der Verabreichung des in das Ventrikelsystem zu injizierenden Vektors Ad CV 32, andererseits konnte mit Hilfe dieser Kanüle der Liquor cerebrospinalis entnommen werden, sodass mittels eines luminometrischen Nachweisverfahrens die sekretierte humane alkalische Phosphatase der Plazenta bestimmt werden konnte.

Die Tiere wurden anschließend genau wie bei der zuvor beschriebenen stereotaktischen Vektor- bzw. Zellinjektion betäubt und anschließend in den Stereotaxierahmen eingespannt (s.o.). Zunächst wurde die Kopfregion geschoren und desinfiziert (Cutasept Hautdesinfizienz, Fa. Bayer). Mit einem Scherenschlag

wurde die Haut geöffnet (1 cm x 0,5 cm). Anschließend musste die Knochenhaut mit einem Skalpelli abgeschabt werden. Die Sonde wurde in den rechten lateralen Ventrikel eingebracht, sodass die Koordinaten nach Bregma: A – 0,8 mm, L 1,6 mm, V 3,5 mm verwendet wurden.

Insgesamt entstanden drei Bohrlöcher in der Schädeldecke: eines entsprach dem des Katheters, zwei weitere wurden nebeneinander und kaudal der Sondenöffnung gebohrt. In die zwei hinteren Bohrlöcher wurden zwei kleine Schrauben eingefügt. Diese dienten der Stabilisierung der Sonde und wurden mit Hilfe von Dentalzement, der aus zwei Komponenten bestand, dem Carboxylate Cement Powder und dem Carboxylate Cement Liquid (90 g/30 ml) (Fa. Heraeus), befestigt. Dann wurde die mit einem Plastikschlauch an dem Stereotaxiegerät befestigte Sonde in die Trepanationsöffnung eingeführt. Die Schrauben und die Sonde wurden mit frisch zubereitetem Dentalzement umgeben und somit stabilisiert. Lokal wurden die Ratten mit einem antibiotikumhaltigen Puder behandelt (Nebacetin, Lokalantibiotikum, Fa. Yamanouchi), um eine eventuell auftretende bakterielle Infektion zu vermeiden.

Die Tiere wurden postoperativ über zwei Wochen beobachtet, um eine ausreichende Wundheilung zu ermöglichen.

Die Kontrolle über die richtige Lage der Sonde im seitlichen Ventrikel wurde mit Hilfe von Angiotensin II getestet, welches mit der eigens hergestellten Applikationskanüle verabreicht wurde. Im positiven Fall suchten die Tiere die Wassertränke auf, da durch Angiotensin II ein kurzzeitiges Durstgefühl ausgelöst wurde.

Die Tiere, bei denen die Sonde im lateralen Ventrikel platziert war, wurden anschließend für den weiteren Versuchsablauf herangezogen. Zunächst wurde den Ratten Liquor entnommen, der als Negativkontrolle diente, d. h., in diesem Liquor war noch kein Substrat enthalten. Danach konnten 8 µl des adenoviralen Vektors Ad CV 32 in sterilem Trägermedium mit einer Konzentration von $1,3 \times 10^7$ infektiösen Partikeln mit Hilfe der Applikationskanüle über den Katheter langsam in das Ventrikelsystem injiziert werden. Nach definierten Zeiträumen (2, 4, 6 Tage bis zu 10 Wochen) wurden den Ratten Liquorproben entnommen. Während des gesamten Versuchszeitraumes wurden Verhaltensbeobachtungen der Tiere wie Fress- und Trinkverhalten, Körper- und Kopfhaltung sowie Beobachtungen des allgemeinen Verhaltens und Befindens durchgeführt.

Die entnommenen Proben wurden zur luminometrischen Bestimmung von SEAP herangezogen.

Nach ca. vier bis zehn Wochen wurden die Tiere mit 4% Paraformaldehyd (Fa. Merck-Schuchardt) perfusionsfixiert und das Gehirn entnommen. Die Expression von SEAP und lacZ fand an Kryostatschnitten der entsprechenden Lage der Sonde statt.

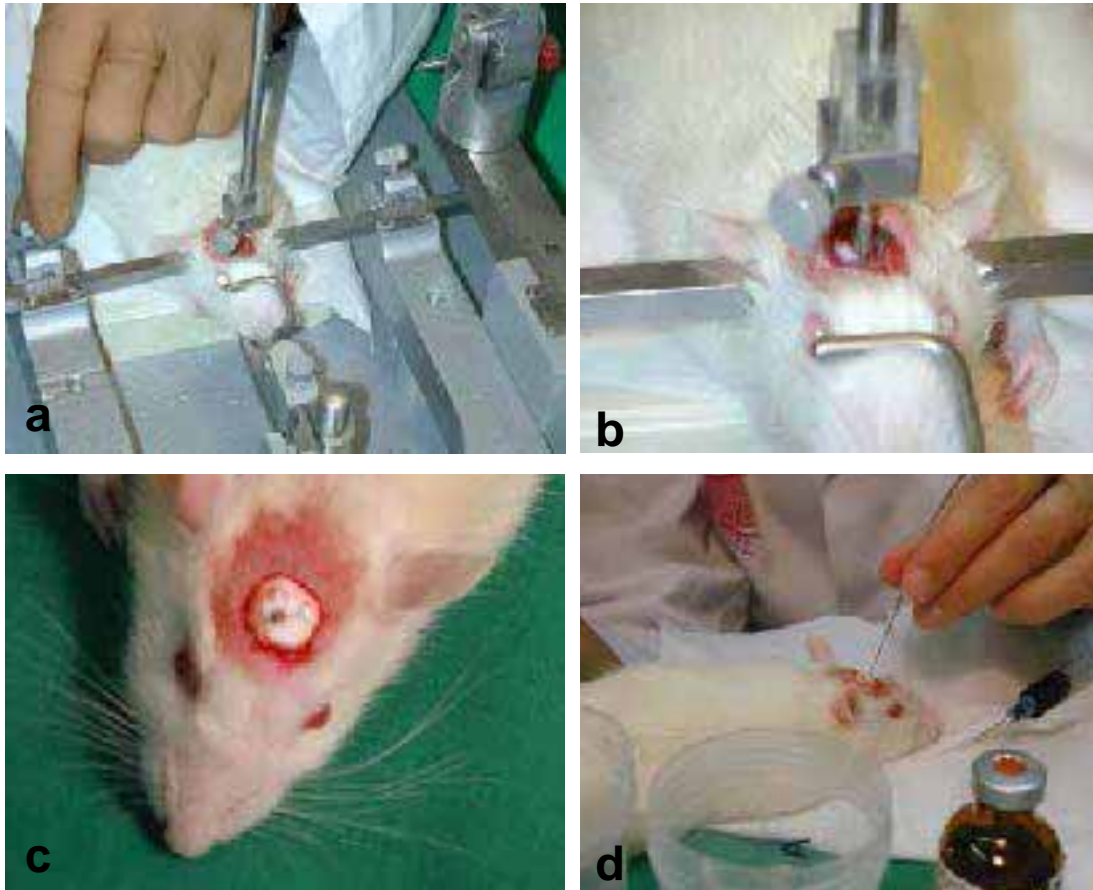


Abb. 5: Einzelne Operationsschritte zum Anbringen einer permanenten Sonde a) Übersichtsdarstellung der stereotaktischen Apparatur zum Einbringen der Sonde in den lateralen Ventrikel, b) die Sonde ist an eine Kanüle mittels eines Schlauches befestigt, c) Fixation der Sonde mittels Dentalzement in Verbindung mit zwei Halteschraubchen, d) Einführen der Applikationskanüle in die permanente Sonde unter leichter Sedation.

2.7 Histologische Präparation des Rattengehirns

Die Tiere wurden über definierte Zeiträume (1, 2, 3 Wochen sowie 1, 2, 3, 4 und 6 Monate) auf physische und psychische Auffälligkeiten hin beobachtet. Nach Ablauf dieser Zeiträume wurden die Ratten für die Perfusionsfixation vorbereitet. Die Tiere wurden mittels CO₂ betäubt, dann wurde die Narkose durch intraperitoneale

Injektion von Ketanest/Rompun (s.o.) eingeleitet. Zur Gerinnungshemmung erhielten die Tiere 250 IE Heparin (0,1 ml Thrombophob 25.000, Fa. Nordmark) ebenfalls durch intraperitoneale Injektion. Nach Eintritt der Narkose wurden die Tiere in Rückenlage auf der Präparationsfläche fixiert und der Thorax sowie das Abdomen mit einer Schere eröffnet. Der Herzbeutel wurde aufgeschnitten, die Perfusionskanüle (Abbocath-T, Fa. Abbott) über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt und mit einer Schere das rechte Herzohr geöffnet, um den Zirkulationskreislauf der verabreichten Lösungen zu ermöglichen. Anschließend wurde die Perfusionskanüle bis in die Aorta vorgeschoben. Dieser Vorgang führte zum Exitus der Ratte. Die Tiere wurden im nächsten Schritt transcordial mit 200 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS 0,1 M, pH 7,4) perfundiert. Nach ca. 5 Minuten erfolgte die Perfusion mit der Fixierlösung (insgesamt 500 ml 4% Paraformaldehyd/PFA (Fa. Merck-Schuchardt) in 0,1 M PBS) über 10 Minuten mit einem konstanten Perfusionsdruck von 90 mm Hg.

Nach 20-minütiger Perfusion wurden die Gehirne der Tiere freipräpariert, entnommen und über Nacht in der gleichen Fixierlösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Die mit PFA behandelten Gehirne wurden nach dem Ende der Fixationszeit drei Mal für jeweils 1,5 Stunden in 0,1 M PBS gewaschen und anschließend über 24 Stunden in 18% Succrose (Fa. Merck) in 0,1 M PBS kryoprotectiert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Gehirne aus der Lösung entnommen, in Tissue Freezing Medium (Fa. Jung) über 6 Stunden eingelegt und danach bei -80°C eingefroren.

Zur Beurteilung der Expression von lacZ und SEAP wurden 8 µm dicke Transversalschnitte durch beide Hemisphären des Großhirn auf Höhe des Striatums bzw. der Ventrikel bei -25°C an einem Kryostaten (Jung Frigocut 2800E, Fa. Leica) angefertigt und auf mit Poly-L-Lysin (0,05%; Fa. Sigma) beschichteten Objektträgern aufgezogen. Es wurden ca. 20 Präparate pro Tier angefertigt, die anschließend bis zur Weiterverarbeitung für die Immunhistochemie bei -80°C gelagert wurden.

2.8 Histochemische Nachweisverfahren

Enzymatischer Nachweis der bakteriellen β -Galaktosidase an Zellen

Zunächst wurde der Mediumüberstand abgesaugt und die Zellen einmal mit 0,1 M PBS gewaschen.

Danach wurden die Zellen in einer 1% Glutaraldehyd-Lösung (Fa. Merck, Konz. 25%) in 0,1 M PBS fixiert. Während der Inkubationszeit bei Raumtemperatur von 15 Minuten wurde der zu verwendende Farbstoff frisch angesetzt.

Färbelösung/Reaktionslösung

Farbstoff X-Gal 1 mg/ml (5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid, Fa. Sigma)

5 mM Potassium Ferrocyanide (Kaliumhexacyanoferrat) ($K_4 Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$) und

5 mM Potassium Ferrocyanide (Kaliumhexacyanoferrat) ($K_3 Fe(CN)_6$) sowie

2 mM Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) in 0,1 M PBS.

Es folgten fünf Waschschrte mit einer 0,1 M PBS-Lösung über jeweils 5 Minuten. Anschließend wurde die Färbelösung den Zellen hinzugefügt und bei 37°C im Brutschrank unter Lichtausschluss für 2-16 Stunden, je nach Reaktionszeit der Zellen, inkubiert.

Die Reaktionslösung wurde mit PBS einmalig abgespült.

Eine Negativkontrolle wurde ohne das Substrat X-Gal (Galaktose) angefertigt.

Unter dem Mikroskop wurde nach blau angefärbten Zellen gesucht, da sich die β -Galaktosidaseaktivität in einem dunkelblauen Reaktionsprodukt zeigt.

Nach Beendigung des histochemischen Nachweises wurden die Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%; 90%; 100%) entwässert und nach einer kurzen Xylolbehandlung als Dauerpräparat in Entellan eingedeckt.

LacZ Nachweis für Gehirngefrierschnitte der Ratte

Die Gehirne waren bereits nach der Entnahme aus der Ratte mit der oben genannten Fixierlösung konserviert, kryoprotectiert und in 8 μ m dicke Transversalschnitte geschnitten. Sie wurden mit 0,1 M PBS- $MgCl_2$ über 5 Minuten gewaschen und rehydriert.

Zusammensetzung des PBS (10 X)

40 g Natriumchlorid (NaCl)

1 g Kaliumchlorid (KCl)

5,75 g Natrium-dihydrogen-Phosphat (Na_2HPO_4)

1 g Kalium-dihydrogen-Phosphat (KH_2PO_4)

2 mM Magnesiumchlorid (MgCl_2)

(dieses wurde erst am Schluss in gelöstem Zustand hinzugefügt (0,1 g MgCl_2 in 250 ml Aqua dest. gelöst))

alles wurde in 500 ml Aqua dest. gelöst.

Gebrauchslösung: 1 x PBS: 10 ml 10 X PBS mit 90 ml Aqua dest. mischen.

Alle oben genannten verwendeten Substanzen wurden von der Firma Merck bezogen.

Danach folgte die X-Gal- Färbung, wobei die Färbelösung über Nacht (eventuell bis zu 24 Stunden) bei 37°C im Brutschrank auf den Schnitten inkubierte. Die Färbelösung überdeckte die Gehirnschnitte vollständig.

Zusammensetzung der X-Gal-Färbelösung

X-Gal-Farbstoff (5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranoside, Fa. Sigma) wurde in DMF (Fa. Merck) gelöst in einer Konzentration von 40 mg/ml.

5 mM Kaliumhexacyanoferrat-III

5 mM Kaliumhexacyanoferrat-II

2 mM Magnesiumchlorid (MgCl_2) (Fa. Merck)

1 mg/ml X-Gal in PBS mit 1), 2) und 3) lösen.

Die Reaktionslösung wurde mit Aqua dest. entfernt.

Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Kernechtrot über 5 Minuten.

Zusammensetzung der Kernechtrotlösung

Aluminiumsulfat (Fa. Merck)

Aqua dest.

Kernechtrot (Fa. Merck)

Anschließend wurden die Kryostatschnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, kurz mit Xylol behandelt und als Dauerpräparat mit Entellan eingedeckt. Bei einem positiven Ergebnis würden sich auch hier als Reaktionsprodukt der β -Galaktosidaseaktivität blau angefärbte Zellen zeigen.

Ein negativer Kontrollansatz wurde auch in diesen Ansätzen ohne den X-Gal Farbstoff mitgeführt.

Nachweis der alkalischen Phosphatase in Gefrierschnitten der Rattenhirne und an verschiedenen Zelltypen (in-vitro)

Die Fixation der adhärennten Zellen wurde mit einer 4% Paraformaldehydlösung (Fa. Merck-Schuchardt) über 5 min durchgeführt. Die Gefrierschnitte des Rattengehirns waren bereits fixiert, s.o. (Perfusionsfixation).

Die fixierten Schnitte und die Zellen wurden in einer Küvette mit vorgewärmten 0,1 M PBS MgCl₂-Gemisch für 30-45 min bei 60°C im Brutschrank inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe zu je 5 min bei Raumtemperatur mit 0,1 M PBS MgCl₂.

X-Phos-Nitroblautetrazoliumchlorid-Detektion-Buffer wurde anschließend für 10 min aufgetragen. Nach diesem Schritt wurden die Schnitte und Zellen in X-Phos-Reaction-Mix für 1-12 Stunden wieder bei Raumtemperatur gegeben. Diese Lösung entsprach der Färbelösung. Während der Inkubationszeit musste eine ständige Kontrolle der Färbung erfolgen, um eine eventuell auftretende Hintergrundfärbung zu vermeiden.

Die Färbelösung wurde entfernt, mit 0,1 M PBS MgCl₂ gespült, und die Schnitte wurden mit Mowiol Eindeckmedium konserviert. Die Zellen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, kurz mit Xylol behandelt und anschließend mit Entellan (Fa. Merck) eingedeckt.

Ansatz des Reaktionsgemisches

in 5 ml NBT-Detection-Buffer wurden gelöst:

- 50 μ l Levamisole (Fa. Sigma), zur Blockierung der endogenen Peroxidase
- 50 μ l NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid, Fa. Boehringer Mannheim)
- 100 μ l X-Phos-Stock (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat, 4-Toluidin Salz/ X-Phosphat (BCIP), Fa. Boehringer Mannheim)

X-Phos-NBT-Detection-Buffer, pH 9,5

100 mM Tris

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

gelöst in Aqua dest.

X-Phosphat diente als Substrat der alkalischen Phosphatase. Das Produkt der enzymatischen Reaktion, 5-Brom-4-Chlor-3 Indolyl, reagierte spontan mit Sauerstoff unter Ausbildung eines unlöslichen violetten Indigo-Farbstoffes. In diesem Versuchsansatz wurde außer dem Sauerstoff ein weiterer Elektronenakzeptor verwendet, nämlich Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT). Bei kombiniertem Einsatz trat eine verstärkte Farbreaktion auf.

2.8.1 Immunzytochemie/Immunhistochemie

Für das immuncyto- bzw. immunhistochemische Nachweisverfahren wurde zunächst das Medium der Zellen abgesaugt und mit 0,1 M PBS gespült.

Die Zellen wurden anschließend für 20 min in einer 4% Paraformaldehyd-Fixierlösung (Fa. Merck-Schuchardt) in 0,1 M PBS (pH 7,4) fixiert, wobei dieser Schritt bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank stattfand. Die schon fixierten, kryoprotektierten Gehirnschnitte, die über Nacht aufgetaut waren, sowie die frisch fixierten Zellen wurden mit einer 0,05 M TBS-Lösung (Tris-Buffered-Saline-Lösung) vier Mal zu je 10 min gewaschen.

Ebenso wurden Organpräparate wie die der Lunge, der Niere und der Leber von transfizierten Tieren (Ad CV 32) zur immunhistochemischen Analyse herangezogen. Als Positivkontrolle für den Nachweis von SEAP diente die humane Plazenta.

Zusammensetzung des 0,05 M Trispuffers/TBS pH 7,6

Tris(hydroxymethyl)aminomethan 6,057 g/l (Fa. Merck)

NaCl (8,766 g/l (Fa. Merck)

in 1000 ml Aqua dest.

Wenn die Immunreaktion mit Hilfe der Meerrettich-Peroxidase nachgewiesen wurde, folgte die Hemmung der endogenen Peroxidase der Zellen für 20 min mit 3% H₂O₂ (Fa. Merck) in Methanol (Fa. Merck). Nach zwei Waschschrritten mit 0,05 M TBS wurden die Zellen bzw. die Gewebeschnitte für 10 min mit 0,25% Triton X-100 (Fa. Serva) und 0,5 M Ammoniumchlorid (Fa. Sigma) in 0,05 M TBS permeabilisiert. Zwei weitere Waschschrritte folgten mit 0,05 M TBS. Eine Hemmung unspezifischer Reaktionen wurde durch die Inkubation mit 5%igem bovinem Serumalbumin/BSA (Fa. Sigma) in 0,05 M TBS über 60 min bewirkt. Unmittelbar nach diesen 60 min wurde der Primärantikörper in entsprechender Konzentration hinzugefügt.

Folgende Primärantikörper wurden in der angegebenen Konzentration verwendet:

Anti-Alkaline Phosphatase (1:1000, Fa. Sigma, monoklonal, Maus)

X-gal-40 (1:1000, Fa. Sigma, monoklonal, anti-β-Galaktosidase clone gal 40, Maus)

GFAP (1:1000, Fa. Progen, polyklonal, Meerschweinchen)

NeuN (1:50, Fa. Chemicon, monoklonal, Maus)

Polyclonal Rabbit Anti-Human Placental Alkaline Phosphatase (1:50, Fa. Biomeda, polyklonal, Ratte)

Vimentin (1:40, Fa. Sigma, monoklonal, Maus)

IBA-1 (1:100, Mikroglia rabbit polyklonal, gift of Yoshinori Imai, National Institute of neuroscience Kodaira, Tokio Japan)

ED-1 Makrophagen/Mikroglia (1:200, Fa. BMA, monoklonal, Maus)

O4 (1:20, Fa. Chemicon, monoklonal, Maus)

Galactocerebroside (1:1000, Fa. Boehringer Mannheim, monoklonal, Maus)

A₂B₅ (1:10, Fa. American Type Culture Collection, Hybridoma Überstand, monoklonal, Maus)

Die Antikörper wurden in 0,8%igem bovinen Serumalbumin in 0,05 M TBS verdünnt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Negativkontrolle wurde durch Inkubation der Zellen bzw. Gewebeschnitte in 0,8%igem BSA ohne Zusatz des Primärantikörpers durchgeführt. Am folgenden Tag wurden zum einen die Zellen, zum anderen die Gewebeschnitte viermal mit 0,05 M TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in 0,05 M TBS über eine Stunde. Die Immunreaktion wurde entweder durch direkt gekoppelte Fluorochrome (goat anti mouse CY3-Komplex, Rockland, 1:1000) durchgeführt oder sie wurde mit einem Biotin-konjugierten Sekundärantikörper (goat anti-mouse biotin, DAKO, 1:400) und anschließender Inkubation mit einem Streptavidin-konjugierten

Horseradish-Peroxidase-Komplex (Amersham, 1:150) sowie nachfolgender Entwicklung mit einer nickel- und glukosehaltigen Diaminobenzidinlösung über eine schwarze Farbreaktion sichtbar gemacht.

Zusammensetzung der Entwicklungslösung

150 µl (0,05%) Diaminobenzidin (DAB, Fa. Sigma)
150 µl (0,03%) Ammoniumchlorid (NH₄Cl, Fa. Sigma)
300 µl (3 mM) Nickel(II)sulfat (Fa. Merck)
300 µl 10% β-D-Glukose (Fa. Sigma)
50 µl Glukoseoxidase (Fa. Sigma, Typ VII, G2133,50000U)
in 15 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4

Zusammensetzung des Phosphatpuffers (PB) Stammlösung 0,2 M, pH 7,4

Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Fa., Merck): 28,8 g/l
Natriumhydrogenphosphat Monohydrat (Fa., Merck): 5,2 g/l
in 1000 ml Aqua bidest. gelöst
Gebrauchslösung 0,1 M PB: 1:2 mit Aqua dest. verdünnt

Der CY3-gekoppelte Sekundärantikörper absorbiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 552 nm und emittiert rotes Licht mit einer Wellenlänge von 565 nm. Da dieser Fluoreszenzantikörper lichtempfindlich ist, wurden alle Waschschriffe unter Lichtschutz durchgeführt.

Bei jedem Grundversuch wurde ein Präparat mit Hoechst dye (Fa. Hoechst) gegengefärbt, um die Gesamtpopulation der Zellen sichtbar zu machen. Aus dem Vergleich der GFP-exprimierenden Zellen mit den Hoechst Dye positiven Zellen konnte die Transduktionsrate ermittelt werden (vgl. Abb. 8).

Nach Beendigung der Immunzytochemie bzw. -histochemie wurden die Zellen/Gefrierschnitte im Falle einer DAB-Entwicklung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100%) entwässert und nach einer kurzen Xylolbehandlung mit Entellan (Fa. Merck) als Dauerpräparat eingedeckt.

Im Fall der Verwendung eines fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers wurde ein spezielles, präparatschonendes Eindeckmedium, wie z.B. Mowiol oder Aqua Poly/Mount (Fa. Polyscience), genutzt.

2.8.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (KLSM)

Für die detaillierte Detektion der vektorinfizierten Zellen im Empfängergewebe nach direkter Vektorinjektion wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (KLSM) verwendet. Dazu wurde ein Gerät vom Typ LSM 510 (Fa. Carl Zeiss) eingesetzt. Der große Vorteil der KLSM ist die Möglichkeit, dass das von einem Präparat emittierte Licht aus einer einzigen Ebene gesammelt werden kann, während die sogenannte „out-offocus information“ vernachlässigt wird. Abb. 6 zeigt schematisch den Aufbau des Gerätes. Der von einem Argon-Ionen-Laser (1) emittierte Strahl wird ausgeweitet und gelangt zum Hauptfarbteiler („beam splitter“, 2), der mittels eines dichroitischen Spiegels einen Lichtstrahl mit einer Wellenlänge von 495 nm emittiert. Durch das Objektiv (3) wird der Lichtstrahl auf einen einzigen Punkt der Probe (4) gebündelt. Das von der Probe emittierte Fluoreszenz- und Reflektionslicht passiert wiederum das Objektiv und gelangt zum Hauptfarbteiler (2), der den von der Probe reflektierten Anteil des Lichtstrahls ablenkt. Nur das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht gelangt zur konfokalen Blende („pinhole“, 5). Sie ist zur Fokusebene konfokal angeordnet und sorgt dafür, dass sämtliches Licht, das nicht aus dieser Ebene stammt, auch nicht vom Detektor (6) erfasst werden kann. Das im Detektor einfallende Licht wird mit Hilfe von Photomultipliern verstärkt. Das Gesamtbild wird aus einer Menge von Daten zusammengesetzt, wobei das Präparat Punkt für Punkt und Zeile für Zeile abgetastet wird. Als Ergebnis wird die am Detektor gemessene Intensität über der Position der Probe aufgetragen (Intensitätsgraphik). Indem die Fokusebene verschoben wird, lassen sich einzelne Bilder (optische Schnitte) zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammensetzen.

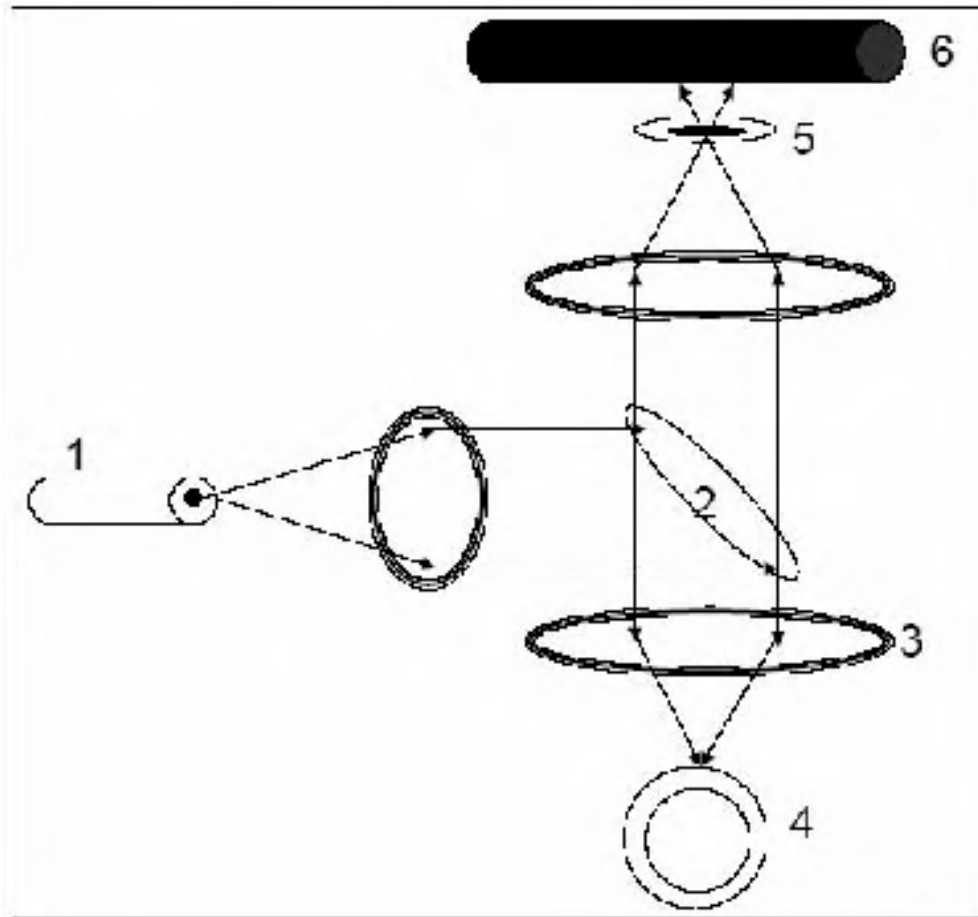


Abb. 6: Meßprinzip der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie: 1: Lichtquelle (Laser), 2: Hauptfarbteiler („beam splitter“), 3: Objektiv, 4: Präparat, 5: konfokale Blende („pinhole“), 6: Detektor.

2.8.3 Luminometrischer Nachweis

Der luminometrische Nachweis von SEAP aus dem Zellüberstand (Kulturmedium) bzw. dem Liquor cerebrospinalis von transfizierten Sondentieren (Ratten) wurde in den Laboratorien des ZMMK der Universität zu Köln bzw. in den Labors der Fa. Cevec Pharmaceuticals in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. C. Volpers durchgeführt. Lumineszenz bedeutet, dass bei einer enzymatisch katalysierten Reaktion ein Teil der freien Energie in Form von Lichtquanten abgegeben wird. Bei der Luminometrie werden diese Lichtquanten durch geeignete Detektoren der Messung zugänglich gemacht.

Der verwendete Phospha-Light-Kit (Fa. Applied Biosystems) ist ein sensitives Reporter-Gen-Test-System, welches die abgesonderte alkalische Phosphatase aus dem Zellkulturüberstand bzw. der Gewebeflüssigkeit ermittelt. Das SEAP-Genprodukt ist eine beschnittene Form der humanen plazentären alkalischen Phosphatase. Das Phospha-Light System ist eine einfache und schnelle Methode zum Nachweis der Transfektions-Leistung. Die sezernierte alkalische Phosphatase wurde 72 Stunden bis über drei Wochen nach der Zelltransfektion im Kulturüberstand oder in einer Gewebeflüssigkeit (Liquor) gemessen. Der Kulturüberstand wurde mit dem Reaktionspuffer inkubiert, bis die maximale Lichtemission erreicht war. Die Lichtemission wurde dann mit einem Luminometer (Fa. Applied Biosystems) gemessen. Endogene nicht plazentäre Enzyme wurden durch Hitzeinaktivierung reduziert.

In dem Kit waren folgende Komponenten enthalten:

Mikrotiterplatten

5 x Dilution Buffer

Assay Buffer (enthält verschiedene Phosphatasehemmer)

CSPD^R Chemiluminescent Substrat

Reaction Buffer Diluent with EmeraldTM Enhancer

Control Enzyme (gereinigte humane plazentäre alkalische Phosphatase, 3 ng/µl, in 150 mM Tris (pH 7,8), 50 mM NaCl, 50% Glycerol)

Die Durchführung des Chemilumineszenz Assays wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Proben in einer Mikrotiterplatte mit dem Lösungspuffer des Kits gemischt und auf 65°C für 30 Minuten erwärmt und anschließend auf Eis bei Raumtemperatur abgekühlt.

Nach Zugabe weiterer Reaktionspuffer wurden die Schalen in das Luminometer eingesetzt und die Messung in einem Zeitraum von 0,1-1 Sekunden durchgeführt.

Datenanalyse

Die erhobenen Daten wurden als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen angegeben. Die statistische Signifikanzanalyse auf Unterschiede der Mittelwerte erfolgte mit einem Student's t-Test für abhängige Stichproben unter Angabe der p-Werte. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Excel Tabellenkalkulationsoftware (Microsoft, USA).