

3 Ergebnisse

3.1 In-vitro Versuche

Für die Untersuchung von geeigneten Trägerzellen für einen ex-vivo gentherapeutischen Ansatz wurden Zellen verschiedener Zelllinien bzw. Herkunft mittels der high capacity adenoviralen Vektoren (Hc-Ad CV 32/Hc-Ad CV 39) transduziert. Zu der Gruppe der transduzierten Versuchszellen gehörten astrozytäre Vorläuferzellen der Ratte und des Menschen. Darüber hinaus wurden auch neural differenzierte embryonale Stammzellen sowie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark des Menschen hinsichtlich ihrer Transduktionseigenschaften getestet (siehe Abb. 7).

Die Transduktionszeit nach Vektorapplikation betrug bei allen hier untersuchten Zelllinien 48 Stunden.

Zur Darstellung der Transduktionseffizienz bzw. der minimalen Vektordosis für eine effiziente Transduktion der verschiedenen Zellen wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen (10 MOI, 50 MOI und 100 MOI) des Vektors transduziert.

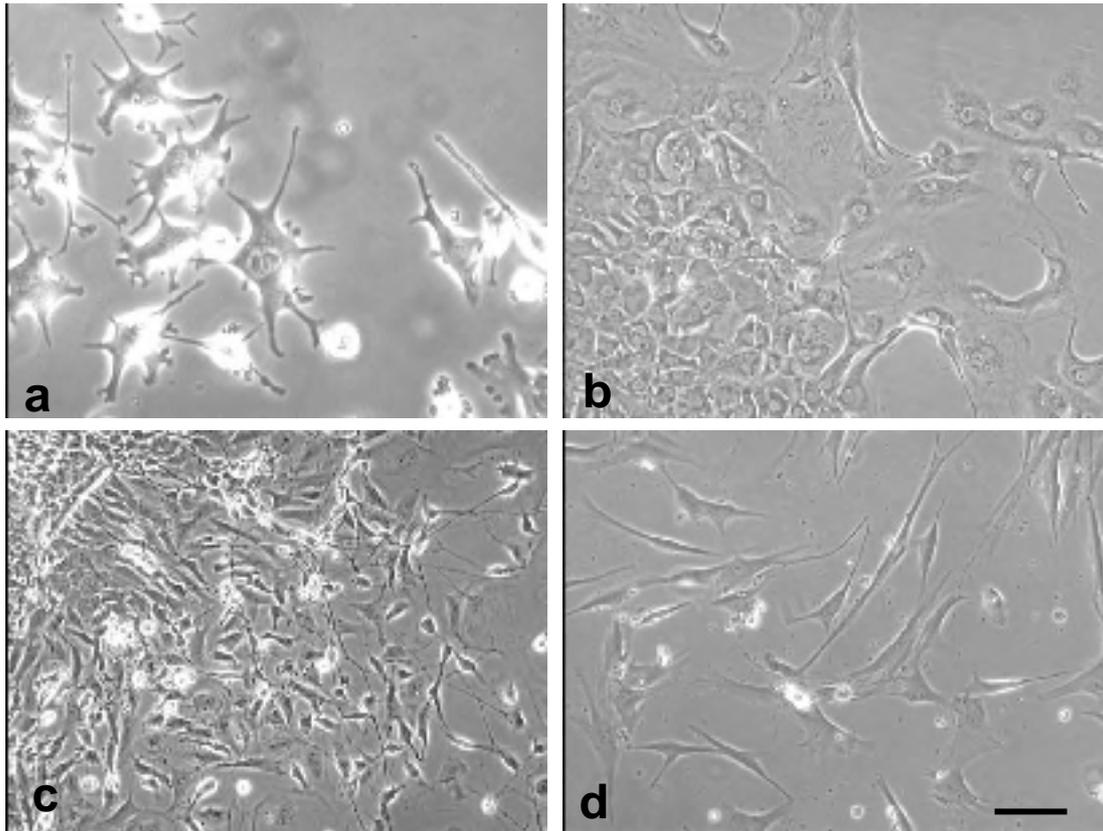


Abb. 7: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der verschiedenen potentiellen Trägerzellen in der Zellkultur, die für die Untersuchung einer adenoviralen Transduktion in-vitro herangezogen wurden; a) gliale Progenitorzellen der Ratte; b) humane astrozytäre Vorläuferzellen; c) neural differenzierte embryonale Stammzellen der Maus; d) humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark. Balken = 15 µm in a, 20 µm in b, 50 µm in c und 20 µm in d.

3.1.1 Ermittlung der Transduktionseffizienz in astrozytären Vorläuferzellen der Ratte und des Menschen

Die Determination der minimalen Vektordosis wurde zunächst an Astrozytenvorläuferzellen der Ratte, die aus dem Striatum der embryonalen Ratte des Entwicklungstages E16 bzw. E19 gewonnen wurden, durchgeführt. Die humanen Astrozytenvorläuferzellen wurden aus Resektatmaterial des juvenilen Hippokampus einer 12-jährigen Patientin im Zuge eines neurochirurgischen Eingriffes gewonnen. Für die Bestimmung der Transduktionseffizienz wurden jeweils

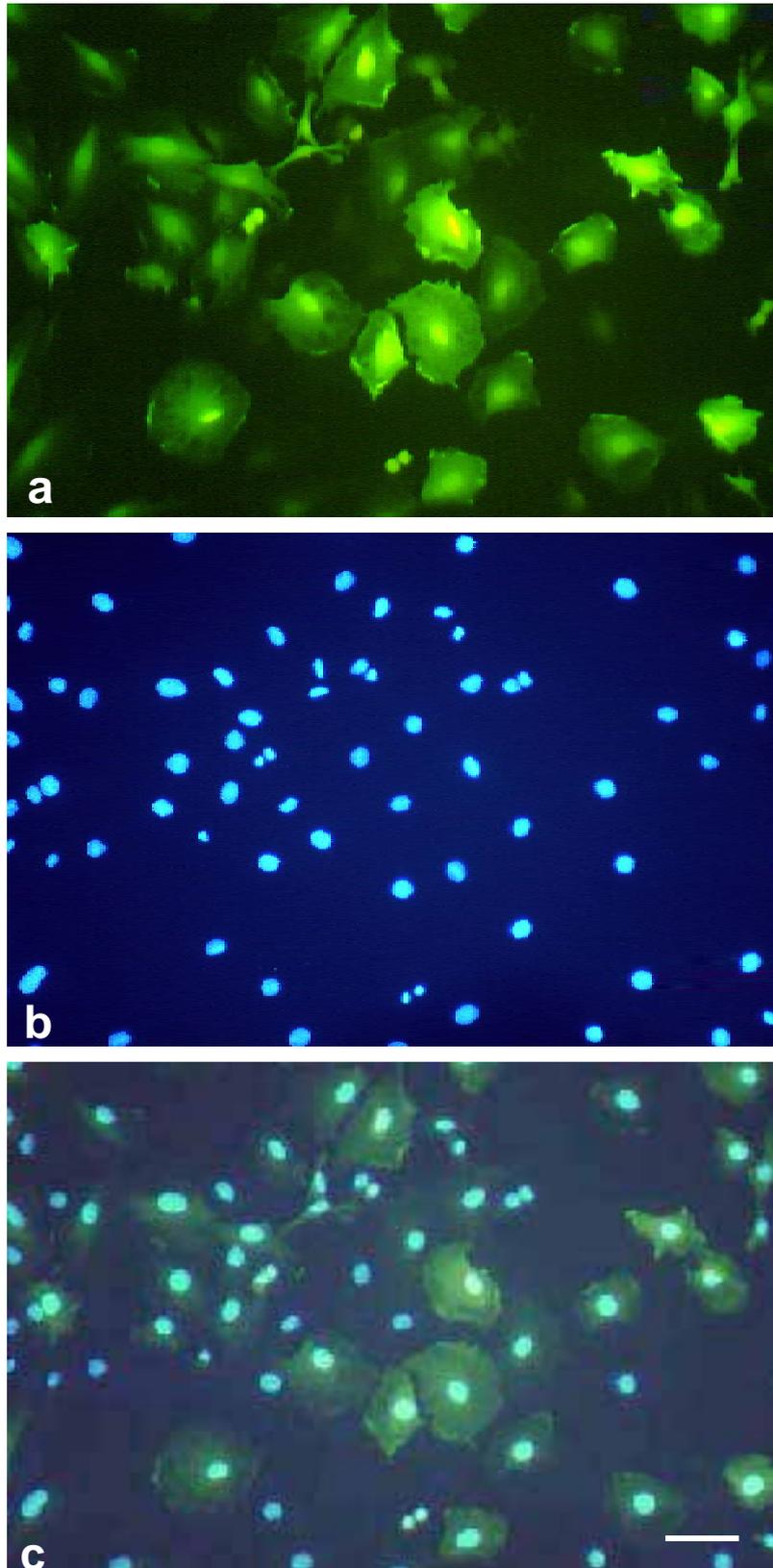


Abb. 8: Untersuchung zur Transduktionseffizienz des adenoviralen Vektors an astrozytären Progenitorzellen der Ratte mit Hilfe der GFP-Expression (a) in Verbindung mit dem Kernmarker Hoechst dye (b) zur Darstellung der Gesamtpopulation und Überlagerung von GFP und Hoechst dye (c). Balken = 15 μm .

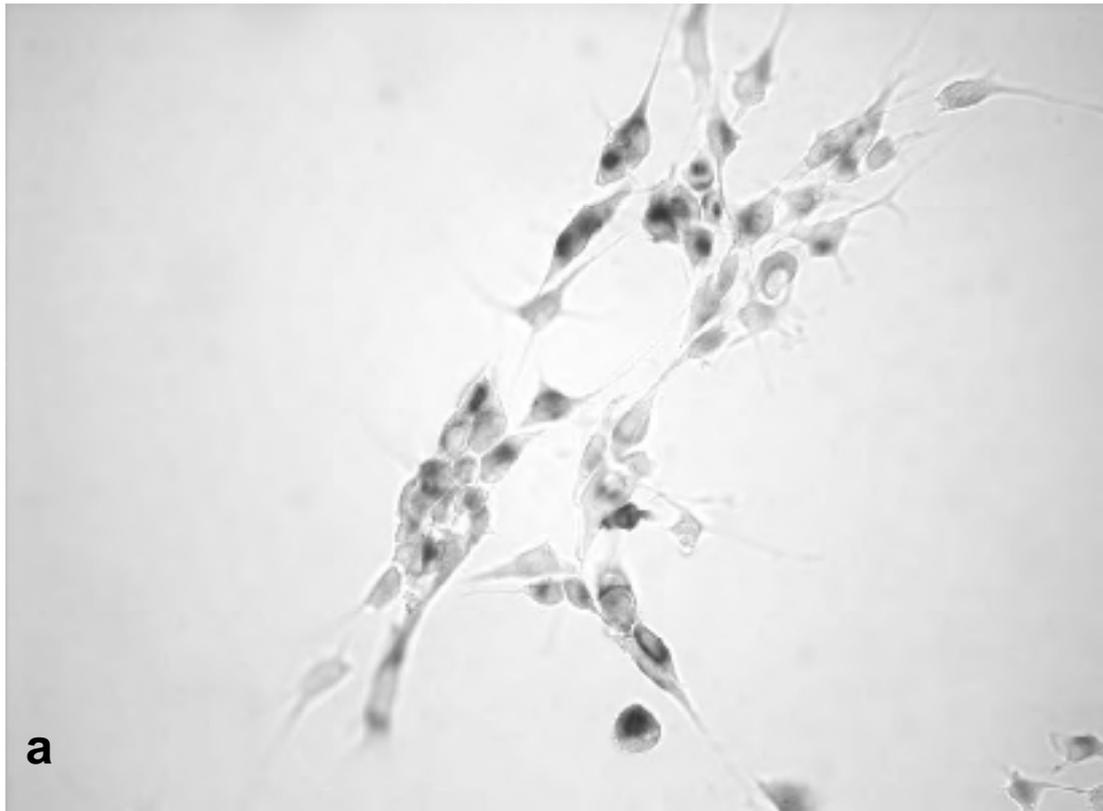


Abb. 9: Darstellung der Expression des Markerenzym SEAP nach Transduktion der a) astrozytären Progenitorzellen der Ratte bzw. b) der humanen astrozytären Vorläuferzellen mittels des adenoviralen Vektors (100 MOI). Balken = 15 μ m.

5×10^4 Astrozyten (human und Ratte) mit verschiedenen Konzentrationen des Hc-Ad CV 32 bzw. 39 Vektors (10 MOI, 50 MOI und 100 MOI), der entweder die Reportersequenz für das grün fluoreszierende Protein, für LacZ (β -Galaktosidase) oder für die sekretierte alkalische Phosphatase der humanen Plazenta (SEAP) und LacZ (β -Galaktosidase) enthielt, transduziert. Als Kontrollgewebe für den immunhistochemischen Nachweis der humanen alkalischen Phosphatase mit Hilfe des SEAP Antikörpers diente humanes Plazentagewebe (siehe Abb. 10).



Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis der PLAP in der humanen Plazenta zum Nachweis der Spezifität des SEAP Antikörpers. Balken = 10 μ m.

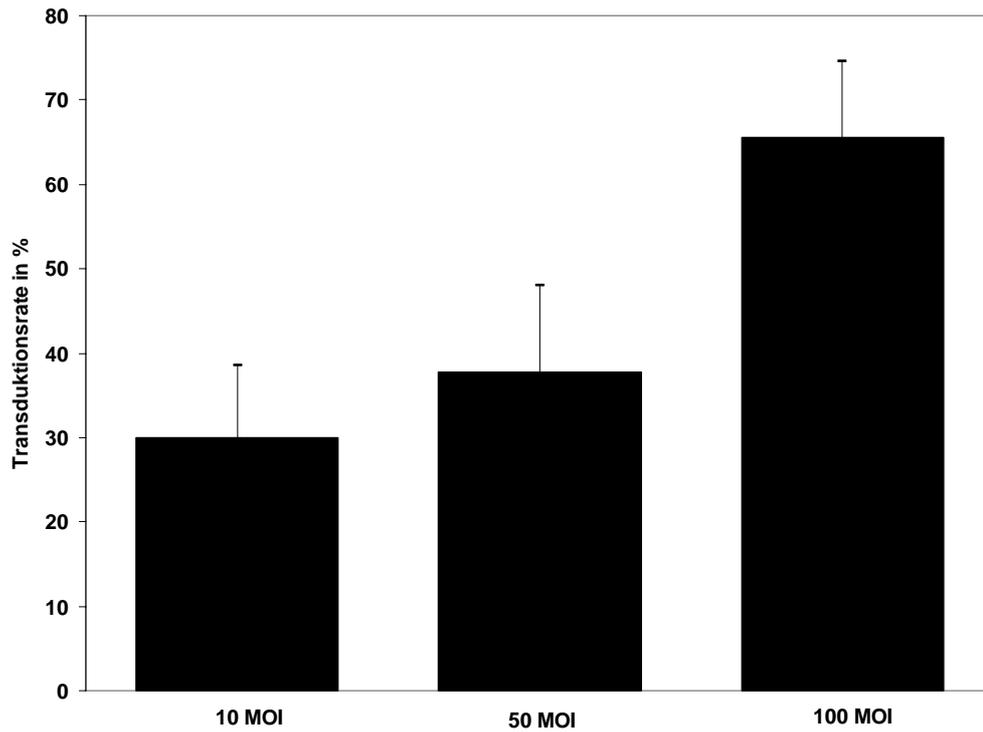
Nach 48 Stunden Inkubationszeit in Gegenwart der verschiedenen Vektoren (GFP, β -Galaktosidase oder SEAP) konnte die Transduktionseffizienz einerseits direkt fluoreszenzmikroskopisch durch den Nachweis der GFP-Expression ermittelt werden. Andererseits erfolgte der histochemische Nachweis der β -Galaktosidase bzw. der alkalischen Phosphatase. Für den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis wurden die Zellen mit dem Kernmarker Hoechst dye gegengefärbt, um so die gesamte Zellpopulation zu markieren (Abb. 8).

Hinsichtlich der Transduktionseffizienz konnten zwischen den astrozytären Vorläuferzellen der Ratte und des Menschen keine signifikanten Unterschiede erhoben werden. Die Transduktionseffizienz wurde unter Berücksichtigung der angewendeten Vektorkonzentration in zehn verschiedenen Blickfeldern blind

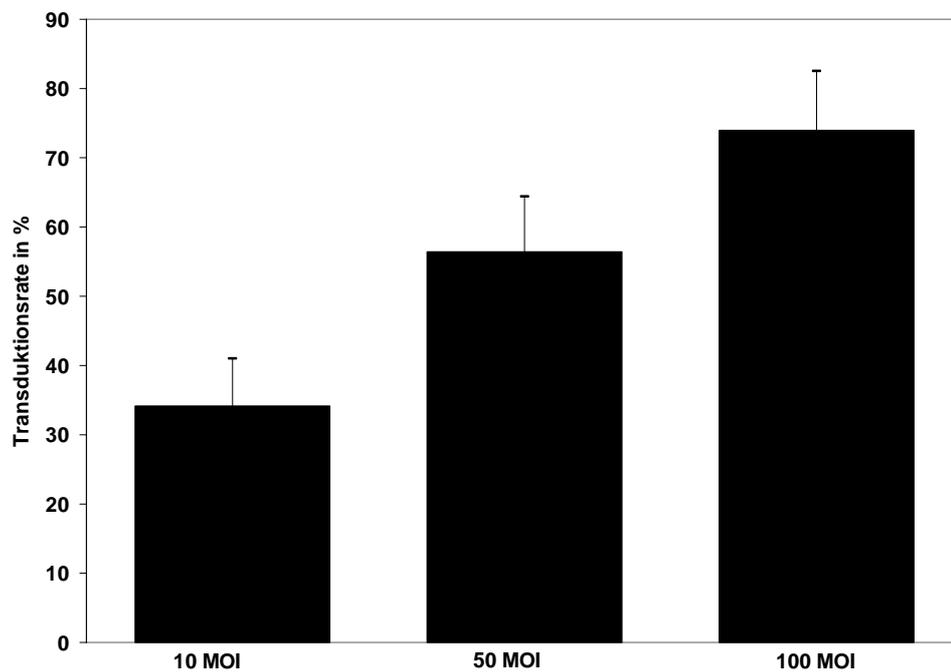
ermittelt und somit quantifiziert. Bei Zellen beider Spezies führte die Transduktion der Zellen mit 10 MOI zu einer Transduktionseffizienz von 40%. Wurde eine Konzentration von 50 MOI eingesetzt, konnten 80% der Zellen als transduziert ermittelt werden. Dagegen führte die Infektion der Zellen mittels 100 MOI zu einer Transduktionseffizienz von 95 % (Abb. 9).

3.1.2 Ermittlung der Transduktionseffizienz in neural differenzierten ES-Zellen

Die beiden hier verwendeten ES-Zellklone, sowohl der D3 Wildtyp-Klon als auch der D3 Nestin-Subklon, bei dem ein GFP-Reportergen unter der Kontrolle des humanen Nestingens steht, wurden nach der Selektionierung von neuronalen Vorläuferzellen in einem serum-freien chemisch definierten Medium in ein Differenzierungsmedium unter Zugabe des B27 Supplementes überführt und dabei auf Poly-L-Lysin beschichteten 24 Multiwellschalen ausplattiert. Nach Adhärenz der Zellen wurde der Vektor in verschiedenen Konzentrationen (10 MOI, 50 MOI und 100 MOI) appliziert. Die ES-Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeitabständen (3, 4, 6 und 8 Tagen) zur histochemischen und immunhistochemischen Analyse von SEAP und β -Galaktosidase herangezogen. Die Zellen wurden fixiert und die Transduktionsrate mit Hilfe des LacZ Nachweises bestimmt. Die Ergebnisse zeigen mäßige Unterschiede zwischen den beiden verwendeten ES-Zellklonen. Die Transduktionsraten wurden jeweils in 4 verschiedenen Experimenten ($n = 4$) ermittelt. Dabei wurden pro Ansatz 10 verschiedene Blickfelder (blind) ausgezählt. Bei Zellen des Wildtyp ES Zellklones D3 wurde mit einer Vektorkonzentration von 10 MOI eine Transduktionsrate von $30 \pm 8,4 \%$, bei 50 MOI von $37,8 \pm 10,2 \%$ und bei einer Vektorkonzentration von 100 MOI eine Transduktionsrate von $65,6 \pm 8,9 \%$ ermittelt. Signifikante Unterschiede sind somit zwischen den Vektorkonzentrationen von 10 MOI und 100 MOI als auch zwischen den Konzentrationen von 50 MOI und 100 MOI festzustellen. Ähnliche Transduktionsraten konnten auch unter Verwendung des D3 Nestin Subklones ermittelt werden. Bei einer Vektorkonzentration von 10 MOI wurde eine Rate von $34,1 \pm 6,8 \%$, bei 50 MOI von $56,3 \pm 8,0\%$ und bei einer Vektorkonzentration von 100 MOI eine Transduktionsrate von $74,8 \pm 8,5 \%$ erzielt. Auch hier ist ein signifikanter Wert zwischen 10 MOI und 100 MOI festzustellen. Insgesamt zeigte sich, dass vorwiegend glial differenzierte Zellen Ziel der Vektortransduktion waren.



a)



b)

Abb. 11: Transduktionsraten in neuronalen Vorläuferzellen aus verschiedenen ES-Zellklonen 48 Stunden nach Vektorapplikation a) D3 Wildtypklon b) Nestinklon.

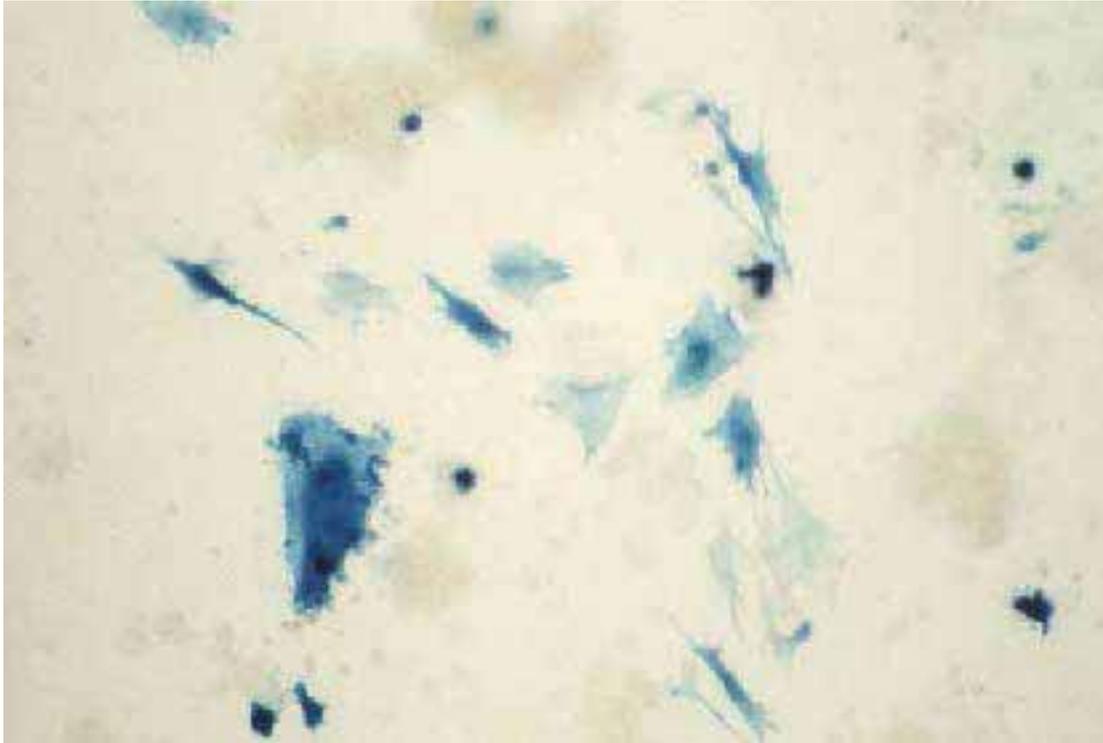


Abb. 12: β -Galaktosidasefärbung nach Transduktion der neural differenzierten ES-Zellen des D3 Wildtyp-Klones mit einer eingesetzten Vektorkonzentration von 100 MOI.

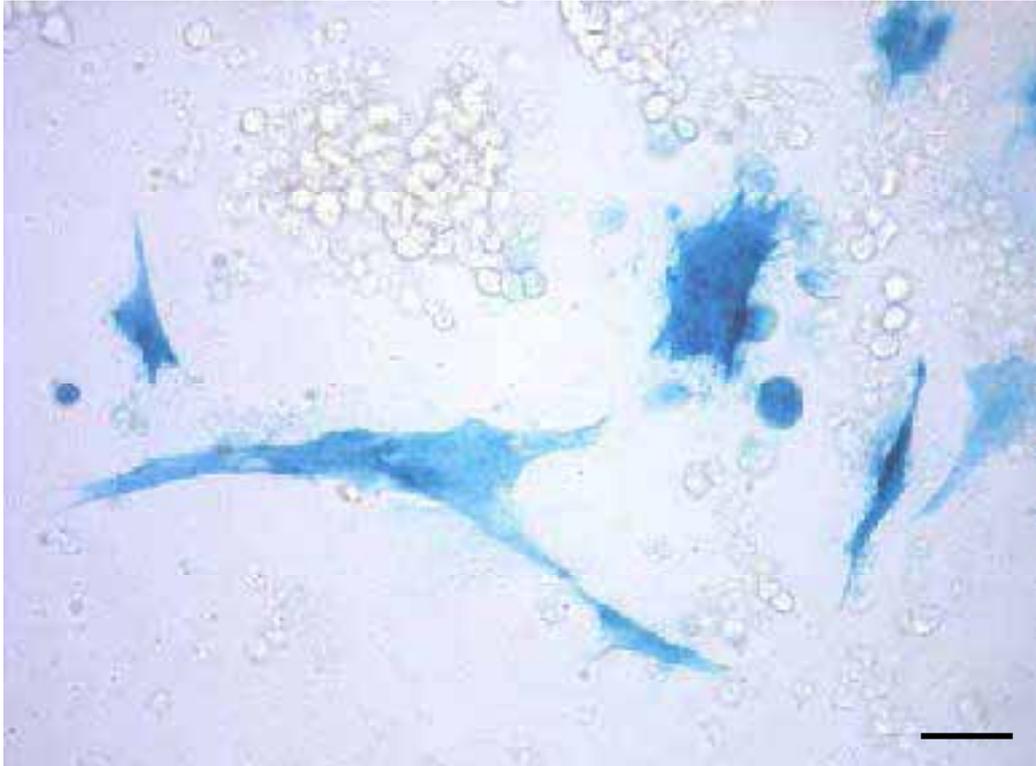


Abb. 13: β -Galaktosidasefärbung nach Transduktion der neural differenzierten ES-Zellen des Nestin-Klones. Die eingesetzte Vektorkonzentration betrug 50 MOI. Balken = 15 μ m.

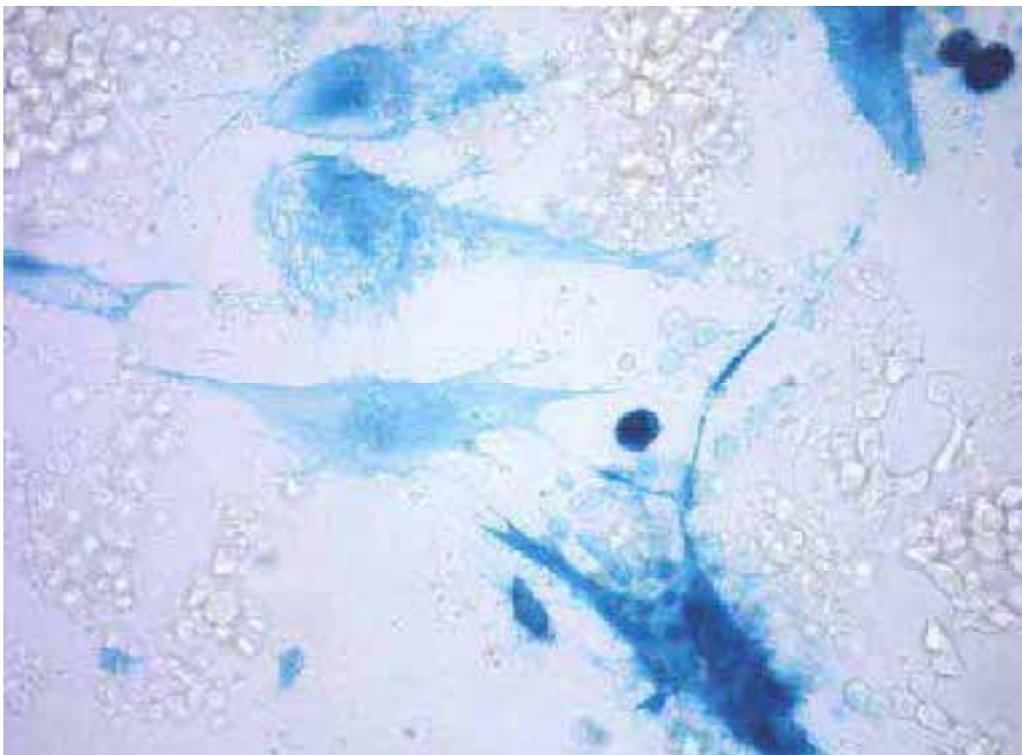


Abb. 14: Darstellung der Transduktionsrate in den ES-Zellen des Nestin-Klones mittels der β -Galaktosidasefärbung nach Infektion mit einer Vektorkonzentration 100 MOI. Balken = 15 μ m.

3.1.3 Ermittlung der Transduktionseffizienz in mesenchymalen Stammzellen aus dem humanen Knochenmark

Zur Darstellung eines möglichen Einsatzes von adulten Stammzellen als Trägerzellen für eine ex-vivo gentherapeutische Behandlungsstrategie wurden humane mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark mit dem adenoviralen Vektor der dritten Generation, der die Sequenz für das grün fluoreszierende Protein trägt, transduziert. Analog zu den neuronalen Stammzellen wurden 10, 50 und 100 MOI eingesetzt. Darüber hinaus wurde bei dieser Zellpopulation zusätzlich noch eine Vektorkonzentration von 200 MOI verwendet, um eine maximale Transduktion zu erzielen.

Während bei einer Vektorkonzentration von 10 und 50 MOI nur geringe Transduktionsraten von $13,6 \pm 6,6\%$ bzw. $17,8 \pm 4,2\%$ erzielt werden konnten, konnte diese Transduktionsausbeute durch Applikation von 100 MOI auf $61,7 \pm 12,5\%$ und von 200 MOI sogar auf $85 \pm 6,2\%$ gesteigert werden (Abb. 15). Die Transduktionsrate ist signifikant erhöht.

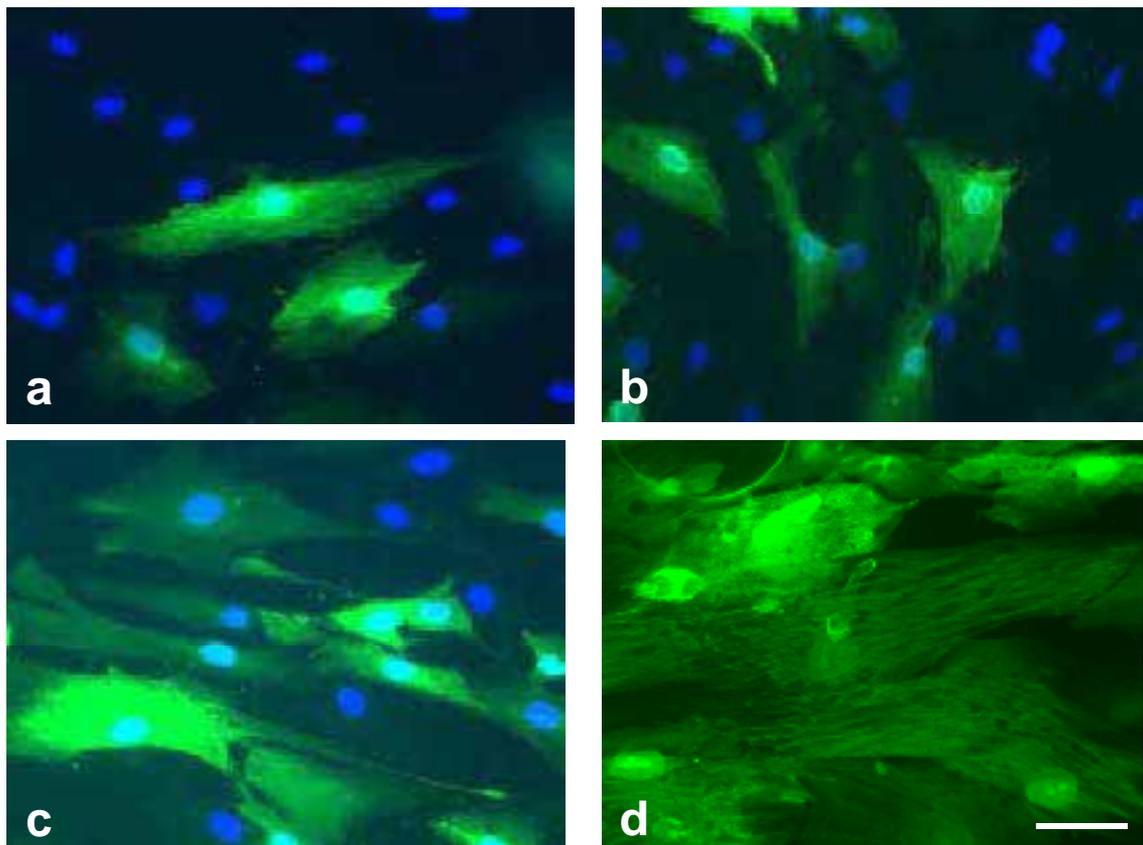


Abb. 15: Transfektion von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark mit verschiedenen Vektorkonzentrationen resultiert in einer konzentrationsabhängigen Transduktionsrate. Die GFP Fluoreszenz und die Kernfärbung mit dem Kernmarker Hoechst dye a) 10 MOI, b) 50 MOI, c) 100 MOI, d) 200 MOI. Balken = 15 μm .

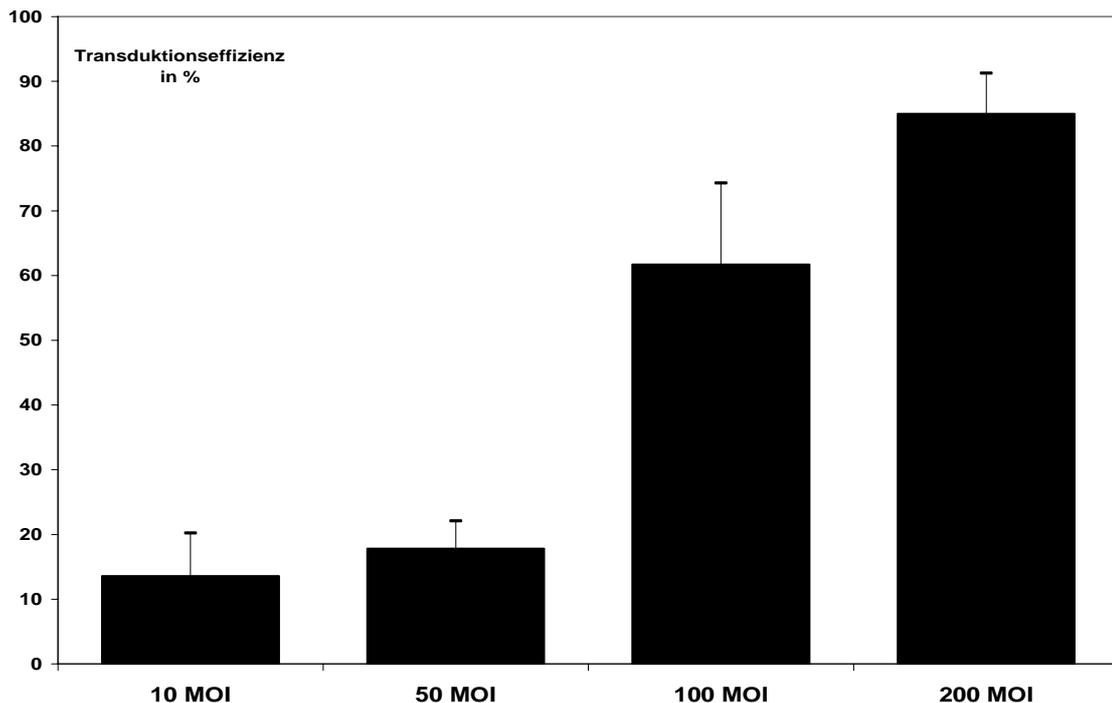


Abb. 16: Graphische Darstellung zur Transduktionseffizienz von humanen mesenchymalen Stammzellen als Vertreter adulter Stammzellen.

3.1.4 Nachweis der Expression des Reporterenzym SEAP und Detektion im Kulturüberstand der potentiellen astrozytären Progenitorzellen

Aufgrund des histochemischen und immunhistochemischen Nachweises der alkalischen Phosphatase wurde deutlich, dass die astrozytären Progenitorzellen dieses Enzym nach Transfektion exprimierten. Mit Hilfe des luminometrischen SEAP Assays sollte in diesem Versuchsabschnitt die Sekretion in den Überständen der kultivierten Astrozyten gezeigt werden.

Anhand des Nachweises der sezernierten alkalischen Phosphatase im Kulturüberstand von transduzierten immortalisierten Astrozyten der Zelllinie S19, die zuvor mit Hilfe des Proliferationsinhibitors Mitomycin in ihrer Aktivität gehemmt wurden, sollten die Dauer und die Menge der SEAP-Produktion dargestellt werden.

Über einen Zeitraum von 24 Tagen wurden die S19 Astrozyten nach der Behandlung mit dem Proliferationsinhibitor Mitomycin und der Infektion mit dem adenoviralen Vektor Ad CV 32 (50 MOI) in Kultur gehalten. Im Abstand von jeweils zwei Tagen wurde das Medium zur Bestimmung von SEAP gesammelt und die abgenommene Menge durch frisches Medium ersetzt. Darüber hinaus wurde alle

zwei Tage ein immunhistochemischer Nachweis von SEAP an fixierten S19 Zellen durchgeführt.

Die in dieser Versuchsreihe durchgeführten immunhistochemischen Färbungen für den Marker SEAP wiesen darauf hin, dass 48 Stunden nach der Transfektion ca. 80% der Astrozyten immunopositiv für SEAP waren. Ab dem 12. Tag nahm die Anzahl der infizierten Zellen allerdings deutlich ab. Zu diesem Zeitpunkt waren nur noch 40% der Zellen immunopositiv für den Marker. Es konnte allerdings eine Expression von SEAP über den gesamten vierwöchigen Versuchszeitraum, wenn auch mit abnehmender Tendenz, gezeigt werden.

Anhand des luminometrischen Nachweises von SEAP im Kulturüberstand der kultivierten Astrozytenvorläuferzellen konnte eine starke Zunahme der SEAP-Konzentration bis zum Tag 6 nach Vektortransfektion mit einem Spitzenwert von 92 ng/ml nachgewiesen werden (siehe Tab. 3). Danach kam es in Korrelation zu den immunhistochemischen Befunden zu einer kontinuierlichen Reduktion der SEAP-Konzentration bis auf Werte um 3,2 ng/ml an Tag 17 post transfectionem.

	Tag 0	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10	Tag 13	Tag 15	Tag 17	Tag 20
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vektorinfizierte Astrozyten	0	4	92	6,4	6	5,2	6,8	3,2	3,2

Tab. 3: Daten zum luminometrischen Nachweis von SEAP (ng/ml) in den Kulturüberständen der kultivierten astrozytären Progenitorzellen der Linie S19.

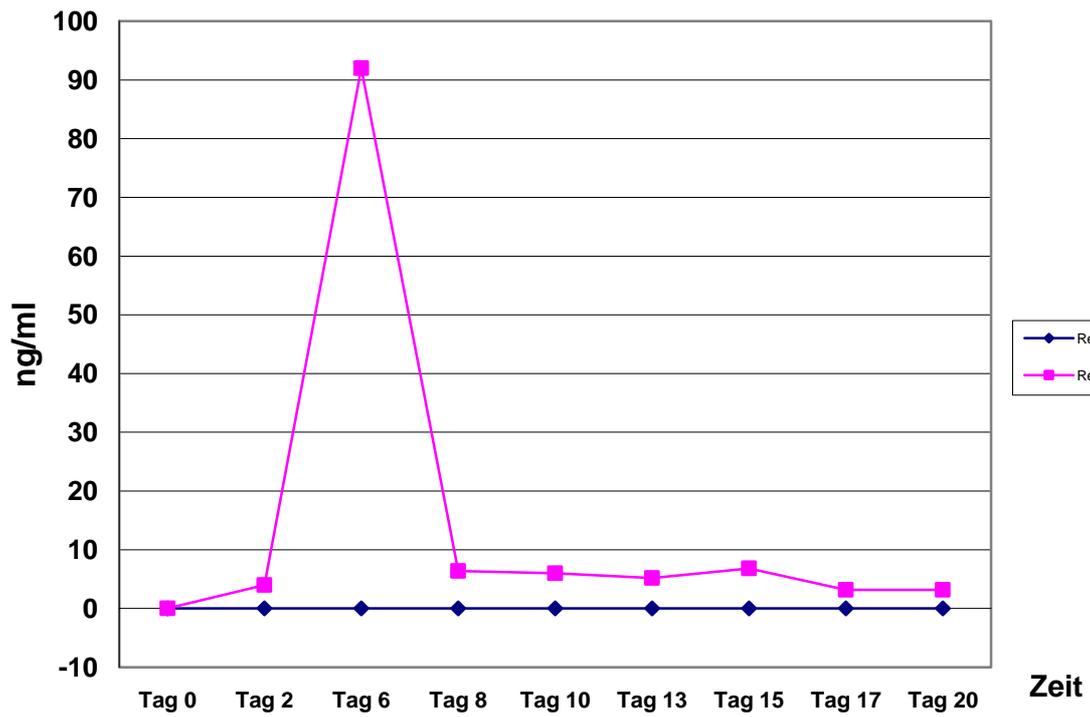


Abb. 17: Graphische Darstellung des luminometrischen SEAP Nachweises in astrozytären Progenitorzellen der Linie S19.

3.2 In-vivo Versuche

3.2.1 Transplantation von vektorinfizierten Trägerzellen in das ZNS

Für die Untersuchung eines experimentellen ex-vivo gentherapeutischen Ansatzes wurden zuvor in der Zellkultur infizierte Astrozyten der Ratte (S19 Zelllinie) in das Striatum adulter Ratten (n = 3) injiziert. Im Rahmen dieser Untersuchung sollte das Potential von Astrozyten als mögliche Trägerzellen für einen gentherapeutischen Einsatz untersucht werden. Dabei sollte als Untersuchungskriterium einerseits ermittelt werden, wie viele der eingebrachten Zellen nach den verschiedenen Verlaufszeiten bzw. Überlebenszeiten im Empfängergewebe nachzuweisen waren. Darüber hinaus sollte untersucht werden, wie sich die Zellen im Empfängergewebe integrieren und über welchen Zeitraum nach Transplantation die Expression des in diesem Versuchsabschnitt verwendeten Reportergens GFP detektiert werden konnte. Außerdem war es Gegenstand der Untersuchung, in welchem Maße die transplantierten Zellen vom Ort der Injektion (Stichkanal) in die Peripherie, d.h. in das umliegende Gewebe, migrierten. Zu diesem Zweck wurden Versuchslaufzeiten von 1, 2, 4 und 6 Wochen gewählt.

Nach stereotaktischer Injektion von circa 60.000 Zellen in das Striatum von adulten Ratten konnten diese nach Transplantation in das Striatum zweifelsfrei aufgrund ihrer GFP Expression detektiert werden. Damit konnte das Überleben der Zellen im Empfängergewebe nachgewiesen werden. Die Integration der vektortransduzierten Astrozytenvorläuferzellen konnte anhand ihrer erhaltenen Fähigkeit, sich in Astrozyten weiterzudifferenzieren, gezeigt werden. Die enge Kontaktaufnahme zu ortständigen Zellen des Empfängergewebes konnte ebenfalls als Hinweis für eine Integration der infizierten Zellen herangezogen werden. Während eine Woche nach Transplantation die meisten Zellen den Marker A₂B₅ exprimierten, hatten einzelne Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits die Expression dieses Zelloberflächenmarkers verloren. Allerdings konnte zeitgleich in einer Subpopulation der injizierten Zellen eine schwache bis mäßige Expression des Gliamarkers GFAP detektiert werden. In den transplantierten Zellen konnte sechs Wochen nach Transplantation nur noch eine schwache A₂B₅ Expression nachgewiesen werden. Allerdings zeigten in diesen Stadien die GFP-positiven Astrozyten ein Co-Immunostaining für GFAP (Abb. 19,

Abb. 20). Dieses Expressionsmuster blieb für mindestens 6 Wochen nach Transplantation bestehen.

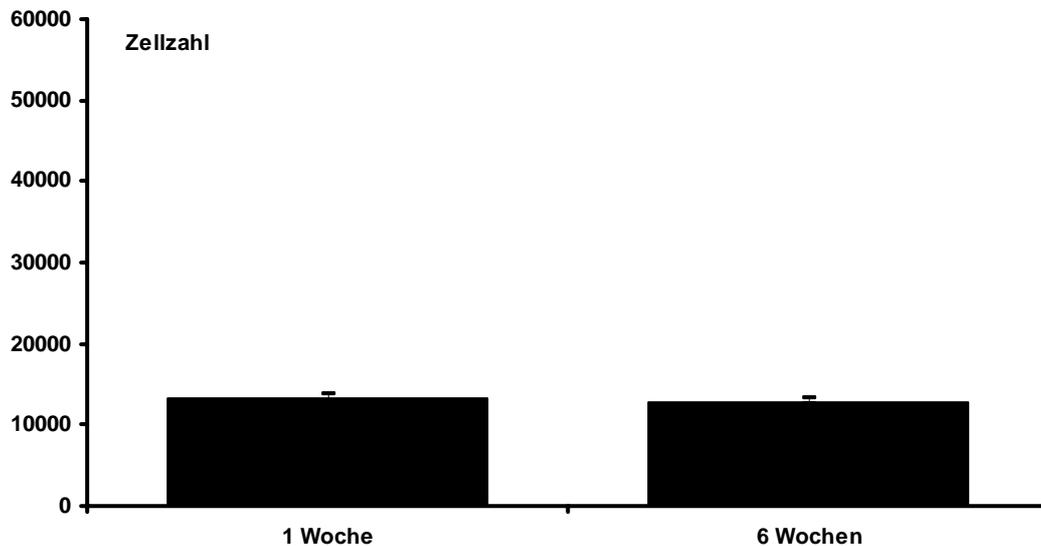


Abb. 18: Graphische Darstellung der Zellzahlen der vektortransduzierten astrozytären Vorläuferzellen 1 und 6 Wochen nach Transplantation in das Striatum (unilateral).

Unter Verwendung von Antikörpern gegen Oligodendrozyten wie O4 und Galactocerebroside konnten keine Hinweise auf eine Oligodendrozytendifferenzierung gefunden werden. Darüber hinaus gab es keine Anhaltspunkte für eine Tumorbildung oder für Inflamationsprozesse, wie mit dem IBA-Antikörper ermittelt werden konnte.

Die Quantifizierung der GFP-exprimierenden Zellen eine bis sechs Wochen nach Transplantation ergab keine deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Zahl der GFP-exprimierenden Zellen zu dem frühen bzw. dem späten Zeitpunkt nach Transplantation. Die Überlebensrate wurde eine und sechs Wochen nach Transplantation bestimmt. Der Vergleich der Zahl der GFP-exprimierenden Zellen zu diesen Zeitpunkten zeigte eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion der GFP-positiven Zellen. Für die immortalisierte Astrozytenvorläuferzelllinie konnte eine Reduktion von durchschnittlich 13256 ± 1160 Zellen nach einer Woche zu 12858 ± 345 ($n=3$) Zellen nach sechs Wochen quantifiziert werden siehe (Abb. 18). Damit blieb die Zahl der GFP-exprimierenden Zellen nach Transplantation mit 25% der ursprünglich eingesetzten Zellzahl im Beobachtungszeitraum annähernd konstant. Während die Zellen nach einer Woche vom Stichkanal maximal $50 \mu\text{m}$ in die Peripherie gewandert waren, konnte nach dem sechswöchigen Beobachtungszeitraum eine Migration von $300 \mu\text{m}$ bis $500 \mu\text{m}$ verzeichnet werden.

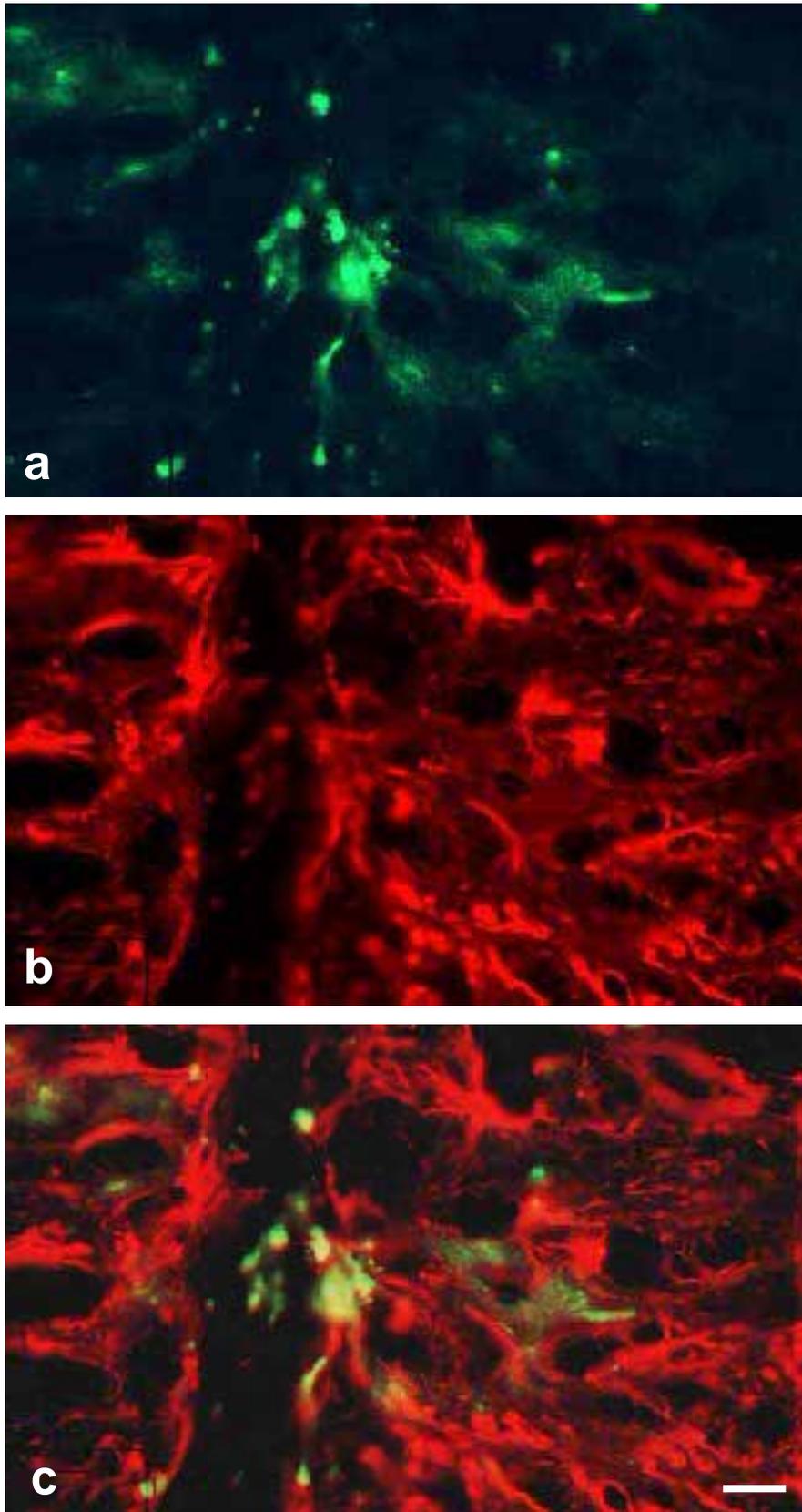


Abb. 19: Darstellung der Migration der vektortransduzierten glialen Vorläuferzellen eine Woche nach Transplantation in das Empfängergewebe (Striatum der adulten Ratte), a) GFP Expression der transplantierten Zellen, b) immunocytochemische Färbung für GFAP, c) Überlagerung. Balken = 20 μm .

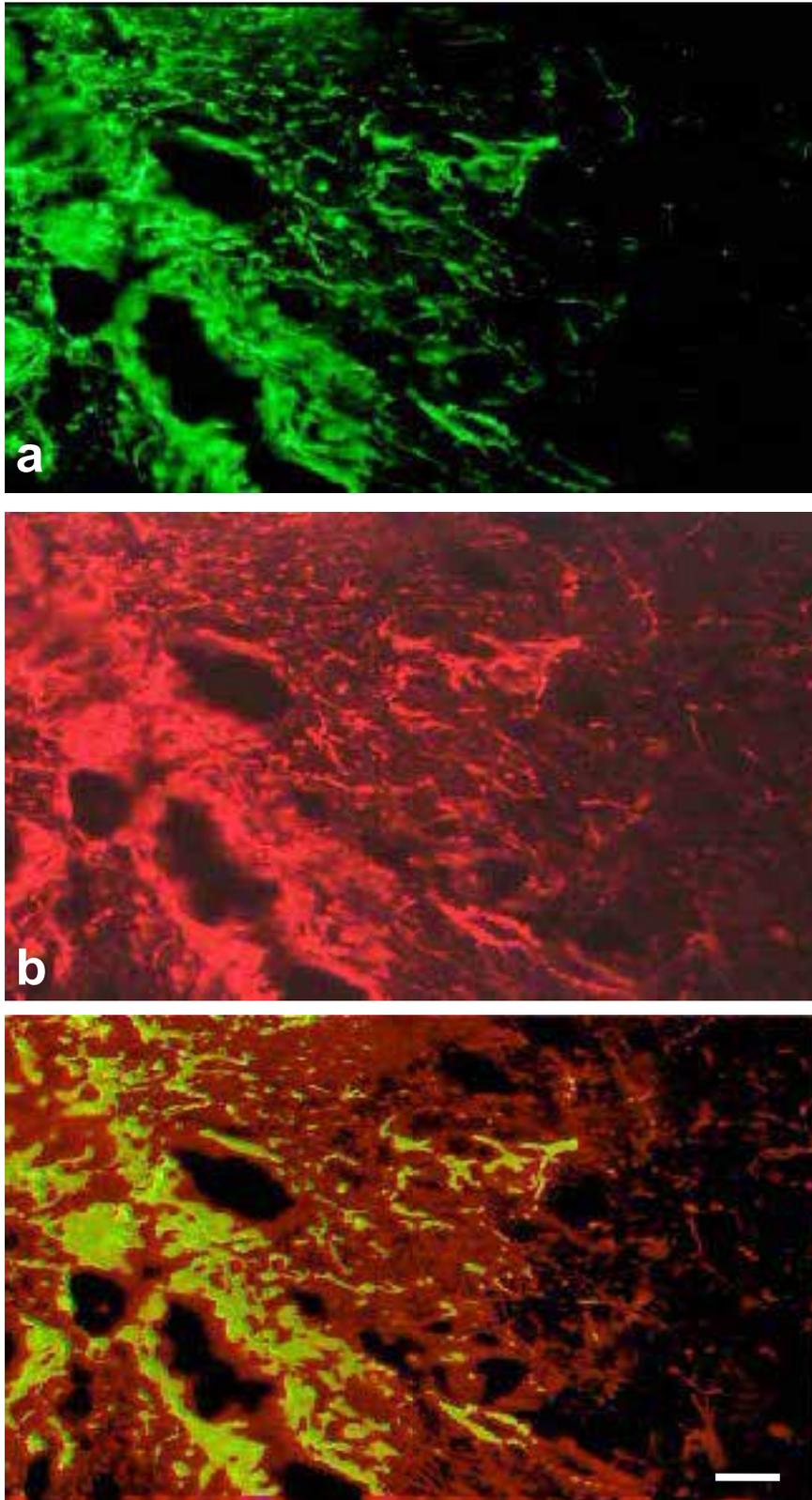


Abb. 20: Darstellung der Migration der vektortransduzierten glialen Vorläuferzellen 6 Wochen nach Transplantation in das Empfängergewebe (Striatum der adulten Ratte), a) GFP Expression der transplantierten Zellen, b) immuncytochemische Färbung für GFAP, c) Überlagerung. Balken = 30 μm .

3.3 Direkte intrazerebrale Vektorinjektion zur Validierung eines in-vivo gentherapeutischen Versuchsansatzes

Aufgrund der Schwierigkeiten, geeignete Zellpopulationen für eine ex-vivo gentherapeutische Option zu erhalten, wie beispielsweise Gliazellen oder neurale Vorläuferzellen, wurde alternativ die Möglichkeit eines in-vivo gentherapeutischen Ansatzes durch direkte Vektorinjektion in das Empfängergewebe untersucht. Zu diesen Schwierigkeiten gehörte nicht nur die Prozedur der Zellisolation, sondern auch mögliche Abstossungsreaktionen oder die Entstehung von Tumoren etc.

Für den Einsatz eines gentherapeutischen Verfahrens ist es wichtig, die Empfänglichkeit der verschiedenen Zelltypen gegenüber der Infektion mit einem Vektor zu charakterisieren. Darüber hinaus muss die Expressionszeit entsprechender Reportergene bzw. Markerproteine bekannt sein, um so die zu erwartende Sekretionszeit und damit die Wirkungszeit einer Substanz in zukünftigen Therapien genau festlegen zu können.

Aus diesem Grund wurde der Vektor in verschiedene Hirnareale injiziert. Dazu zählten, wie bereits oben erwähnt, die Fasertrakte des Corpus callosum, das Striatum und die lateralen Ventrikel mit den dort lokalisierten Ependymzellen (Abb. 21).

Um genauere Aussagen über die Verteilung des Vektors in den Fasertrakten des Corpus callosum machen zu können, wurde der high capacity adenovirale Vektor direkt in die Fasertrakte oberhalb des rechten lateralen Ventrikels injiziert. Dabei stellte sich heraus, dass es bei diesem Verfahren zu einer Verteilung des Vektors über die Fasertrakte in Richtung der gegenüberliegenden Hemisphäre und auch ins angrenzende Parenchym kam (Abb. 22). Bei Anwendung des LacZ-Nachweises hatten die infizierten Zellen überwiegend astrozytäre Morphologie. Weiterhin war der gesamte Fasertrakt in dem Bereich, wo es zu einer Ausbreitung des Vektors kam, entsprechend positiv markiert. Von der Injektionsstelle konnte in der ipsilateralen Hemisphäre eine Transduktion der Zellen im Corpus callosum bis zu 1 mm von der Injektionsstelle nach lateral nachgewiesen werden. Nach medial und in Richtung der contralateralen Hemisphäre konnte die Transduktion bis zu 7 mm vom Injektionsort mittels des β -Galaktosidasenachweises dargestellt werden (Abb. 22).

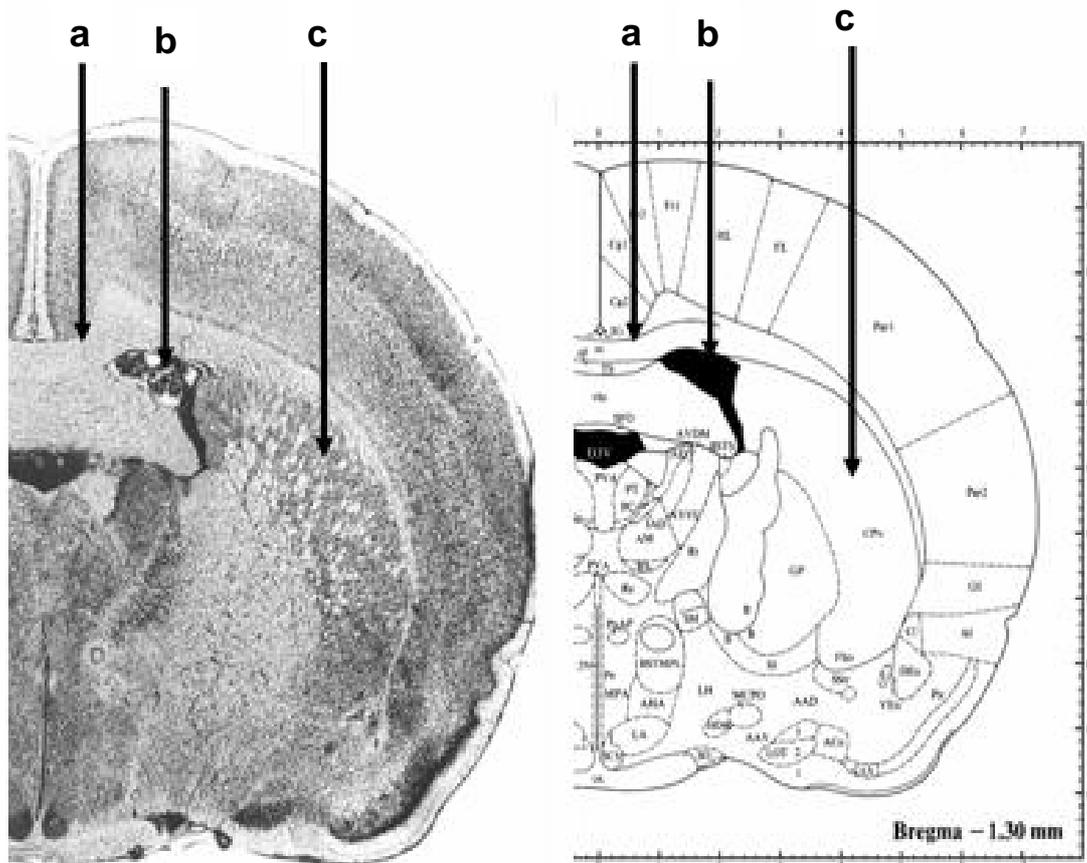


Abb. 21: Auswahl der Injektionsstellen für die direkte Vektorinjektion. Die Injektionsstellen umfassen a) die Fasertrakte des Corpus callosum, b) den rechten Seitenventrikel und c) das Striatum.

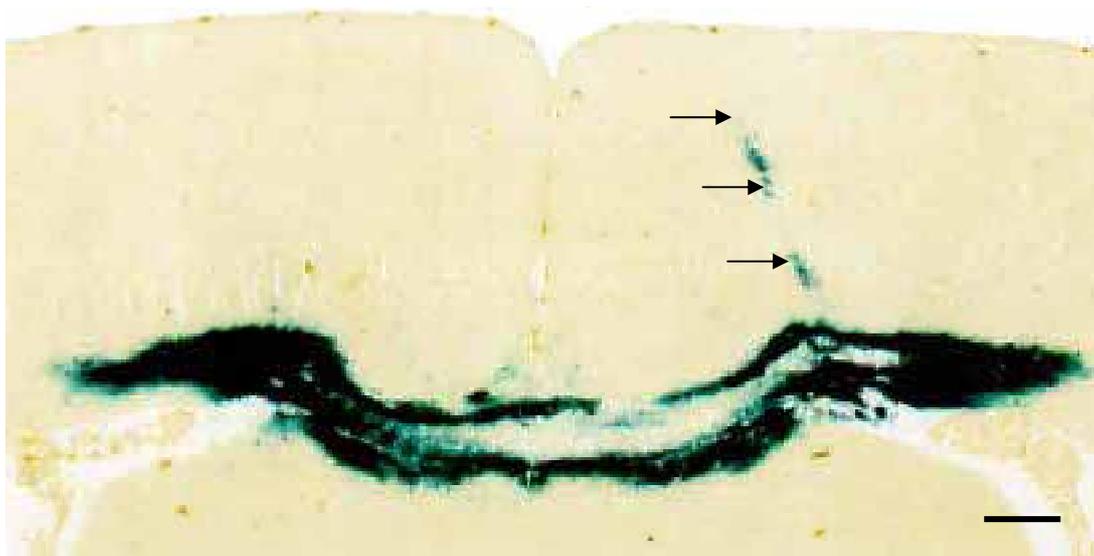


Abb. 22: Darstellung der Verteilung des adenoviralen Vektors eine Woche nach Injektion in den Fasertrakt des Corpus callosum mit Hilfe des β -Galaktosidasenachweises, Stichkanal (Pfeile). Balken = 3 mm.

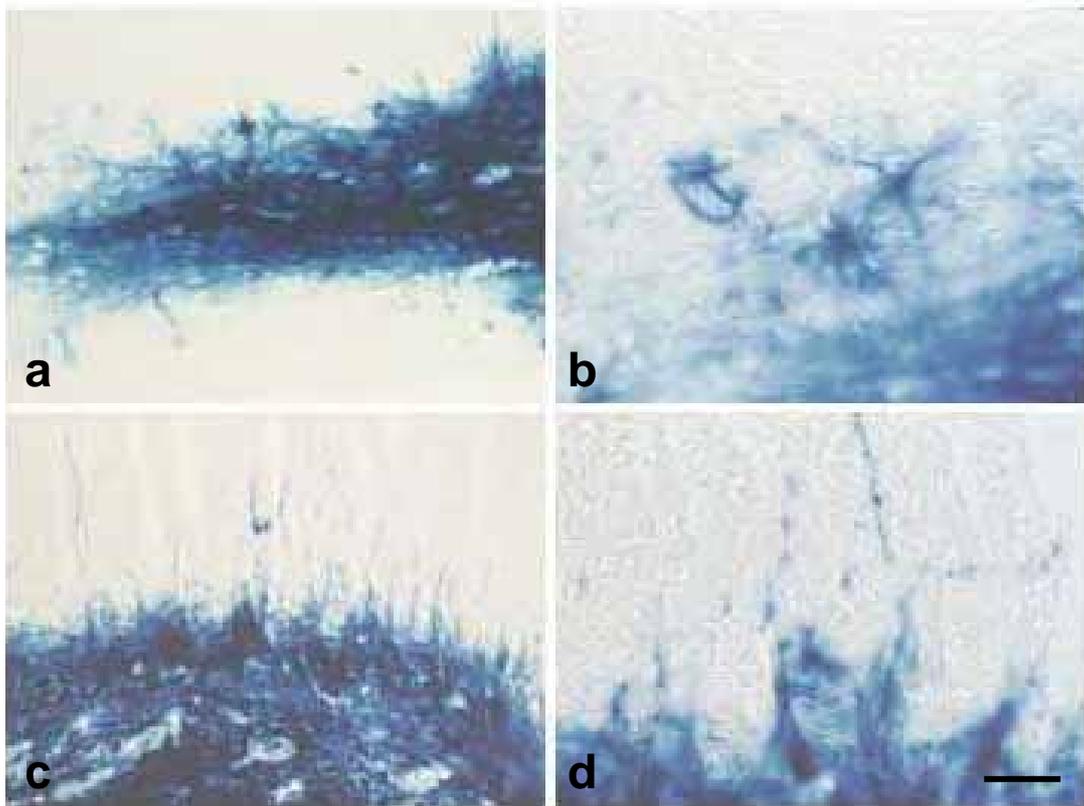


Abb. 23: β -Galaktosidasenachweis zur Darstellung der vektorvermittelten Transduktion im Bereich des Corpus callosum. a) Darstellung der Ausbreitung des Vektors im Bereich des Corpus callosum von der Injektionsstelle in angrenzende Areale, b) Transduktion von Gliazellen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Corpus callosum, c-d) β -Galaktosidasefärbung in Zellfortsätzen der angrenzenden Areale zum Corpus callosum. Balken in a = 50 μ m, in b-d = 25 μ m.

Das Striatum stellt eine wichtige Zielstruktur für einen therapeutischen Eingriff bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen dar. Es ist als Zielstruktur, insbesondere bei der Behandlung von M. Parkinson, von großer Bedeutung. Vor diesem Hintergrund wurde der adenovirale Vektor mit der Reportersequenz für das GFP in das Striatum adulter Ratten injiziert. Nach entsprechender Inkubationszeit und weiterer Bearbeitung und Behandlung der Rattengehirne wurden von den umschriebenen Gehirnbereichen Kryostatschnitte angefertigt und mittels Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten eine Transduktion sowohl von Astrozyten als auch von Neuronen, die über ihre grüne Fluoreszenz, d.h. ihrer GFP-Expression, identifiziert werden konnten (Abb. 24, Abb. 25). Eine semiquantitative Analyse unter Verwendung der Antikörper NeuN als spezifischen Marker für neuronale Zellen und GFAP als Marker für Astrozyten (Abb. 26, Abb. 27) wies darauf hin, dass von den transduzierten Zellen bevorzugt Astrozyten mit ca. 90% gegenüber den neuronalen Zellen mit 10%

infiziert wurden. Das GFP-Signal konnte in den transduzierten Zellen bis zu 2 Monate nach einer Vektorinjektion nachgewiesen werden. Eine Infektion von Oligodendrozyten bzw. von Mikrogliazellen konnte in Verbindung mit den Markern Galactocerebroside bzw. O4 nicht gezeigt werden. Nach der Vektorinjektion in das Striatum konnte eine Ausbreitung des Vektors in die Peripherie der Injektionsstelle festgestellt werden. Dabei wurden 2 Wochen nach der Vektorinjektion transduzierte Zellen in einer Entfernung von bis zu 1000 µm vom Injektionsort, in der Nähe der subventrikulären Zone, gefunden.

Für die Überprüfung einer generellen Vektorausbreitung im Organismus wurden zusätzlich Proben aus den Organen Leber, Niere und Lunge in die Untersuchung miteinbezogen und hinsichtlich einer Expression der Reportersysteme untersucht. Es konnte allerdings in keinem der genannten Organe eine positive Expression von GFP, β -Galaktosidase oder SEAP detektiert werden.

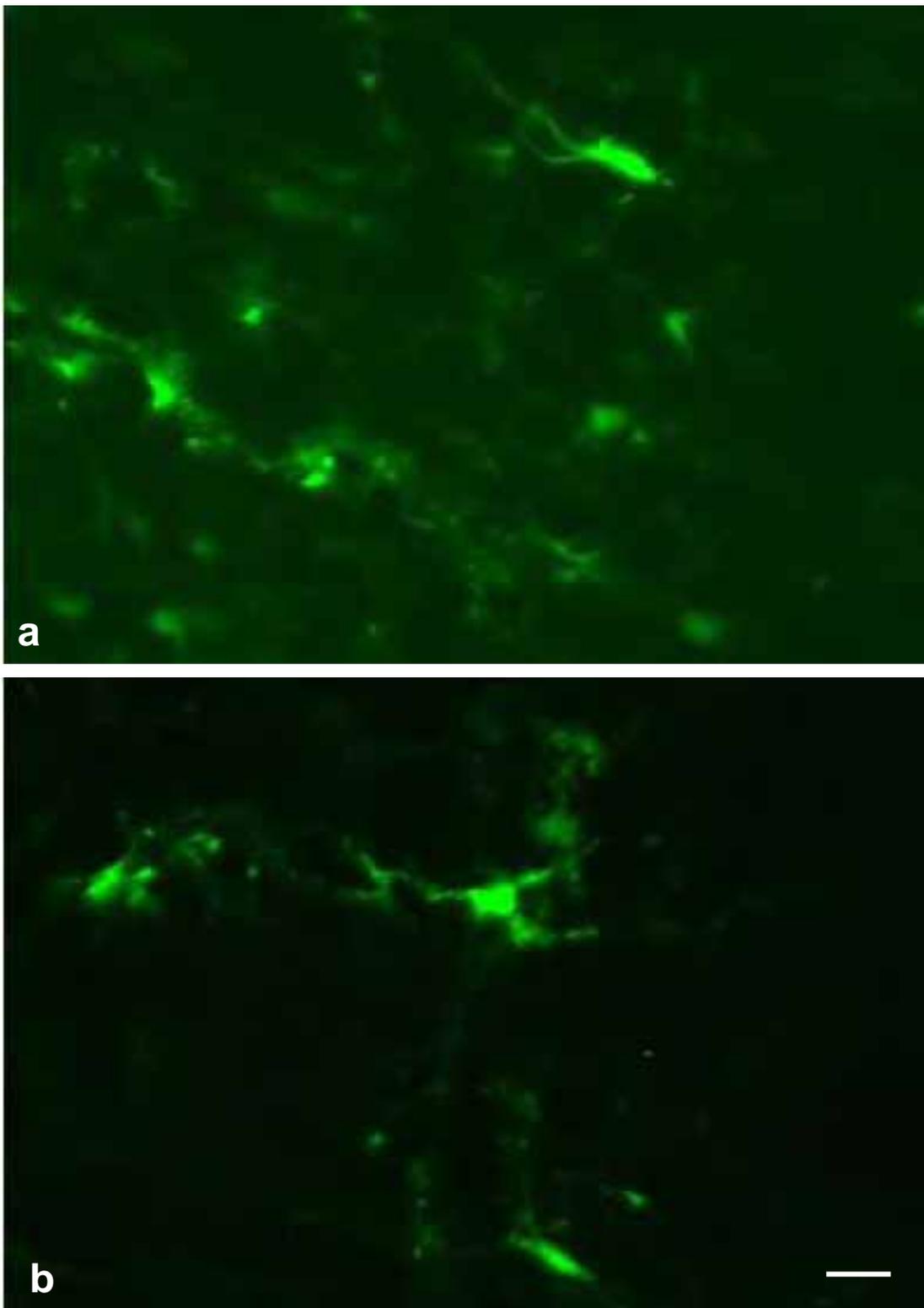


Abb. 24: GFP-Expression neuraler Zellen im Striatum nach direkter Vektorinjektion. Die morphologische Beurteilung der Zellen lässt auf eine präferentielle Transduktion der Astroglia schließen. Balken = 20 μm .

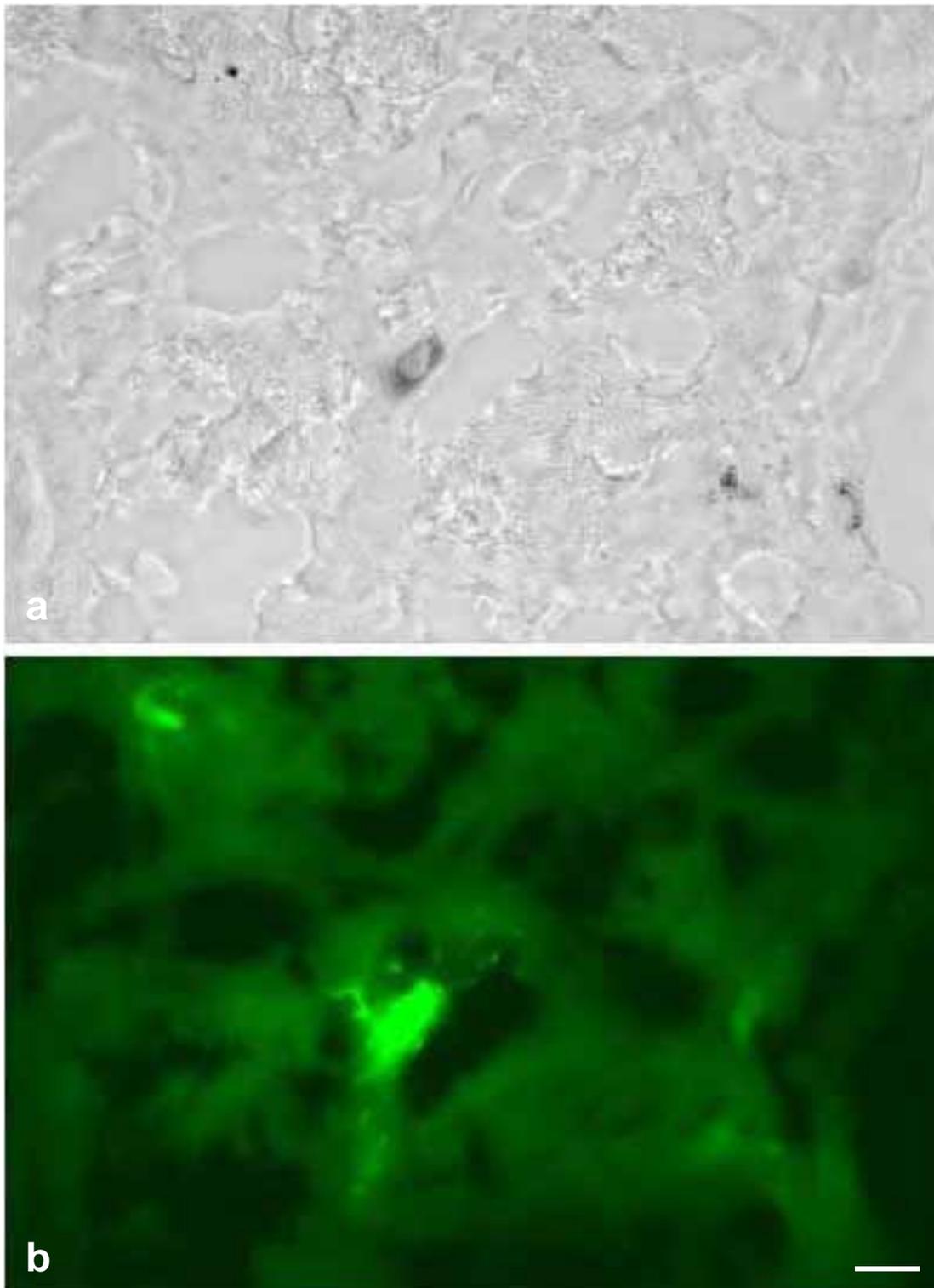


Abb. 25: Gegenüberstellung der Darstellung transduzierter Zellen nach direkter Vektorinjektion (Markierung) mit dem adenoviralen Vektor, der sowohl die Reportersequenz für a) LacZ als auch die für b) GFP trägt. Mit Hilfe der GFP-Expression kann die Zellmorphologie deutlich besser beurteilt werden. Balken = 15 μm .

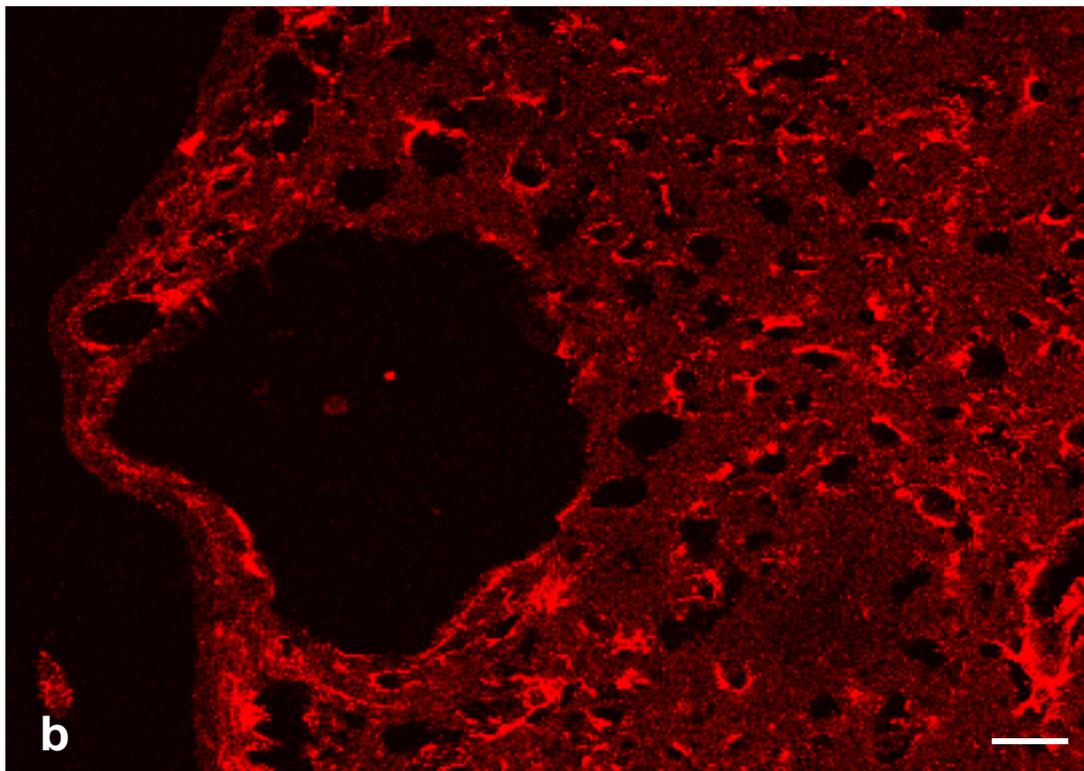
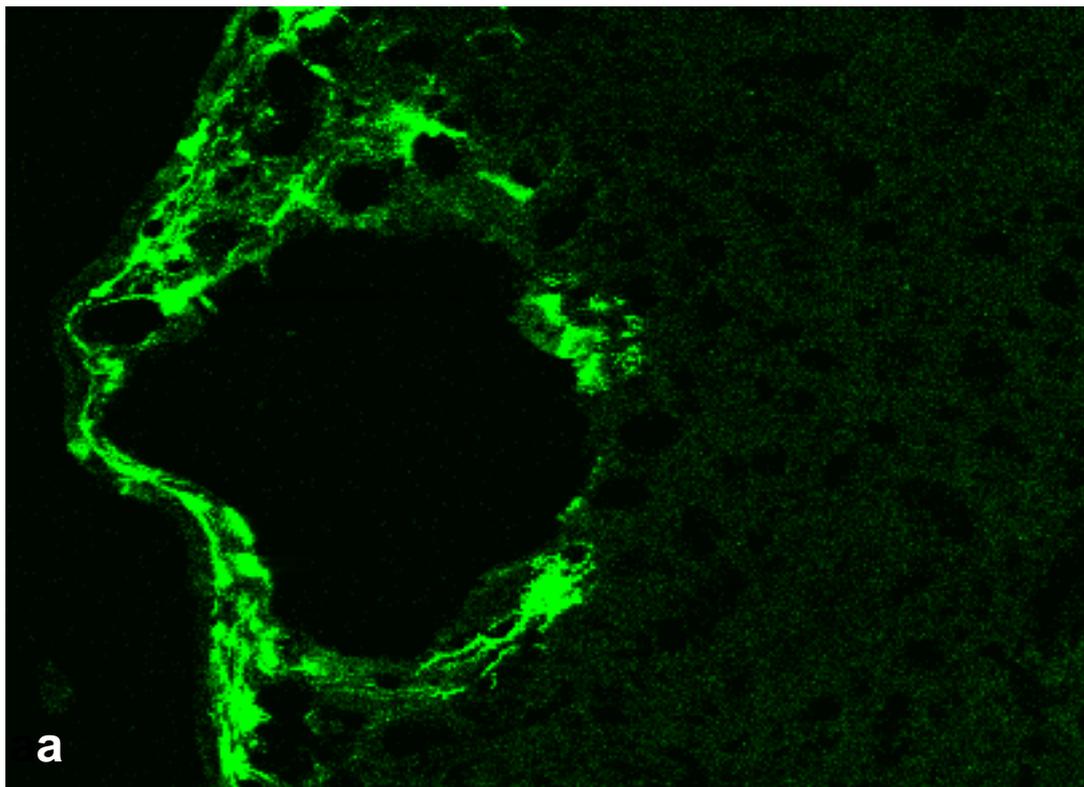


Abb. 26: Gegenüberstellung der vektorinduzierten GFP Expression und dem immunhistochemischen Nachweis für den Gliamarker GFAP nach Injektion in das Striatum adulter Ratten zwei Wochen post transfectionem a) GFP Expression, b) immunhistochemischer Nachweis für GFAP. Balken = 30 μ m.

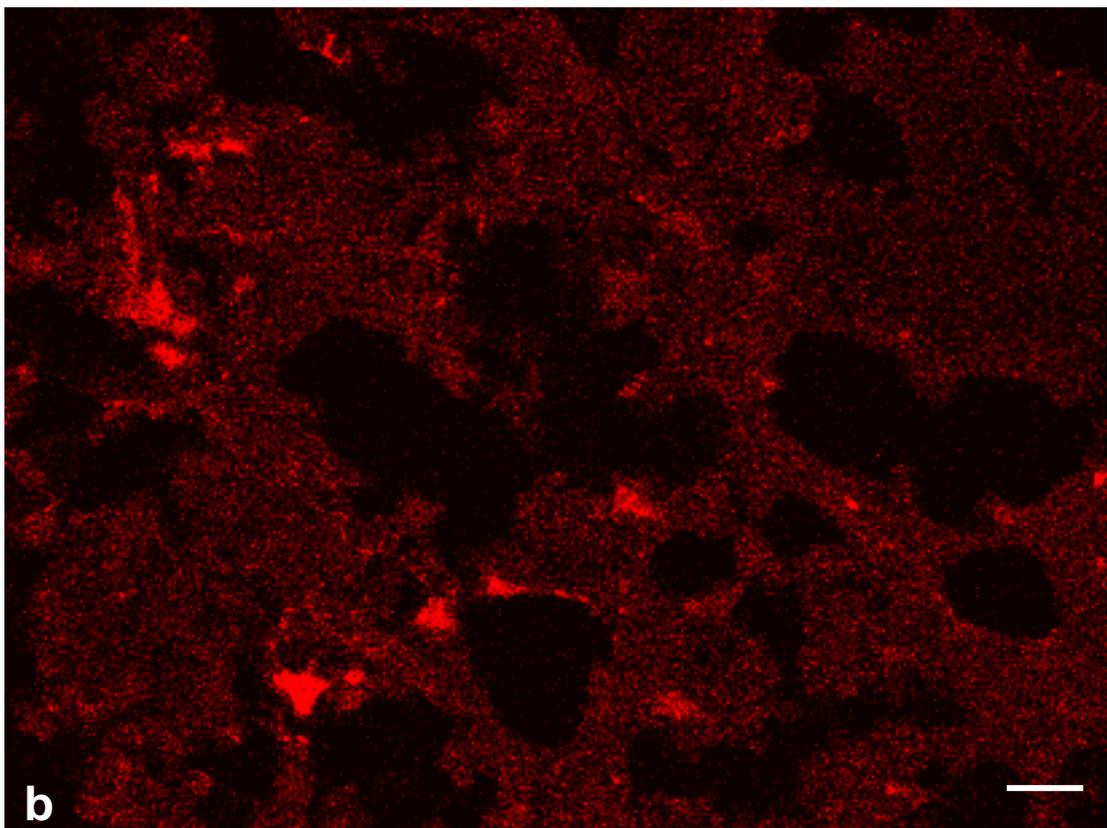
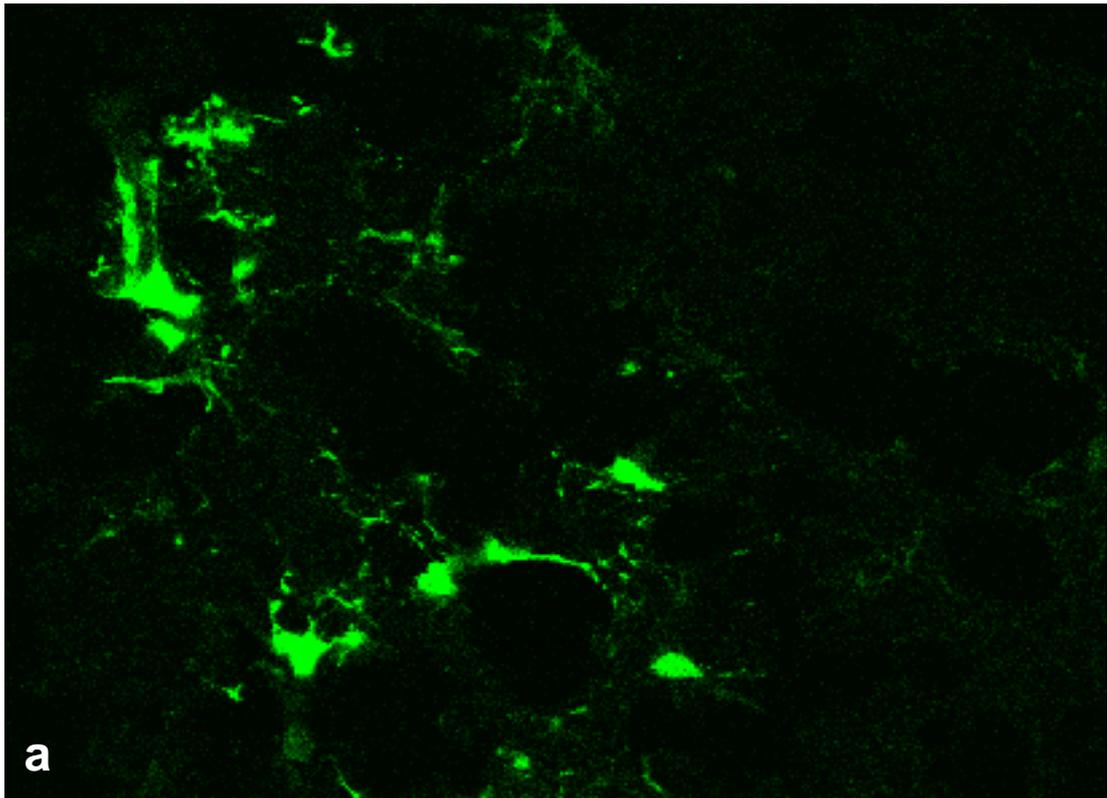


Abb. 27: Gegenüberstellung der vektorinduzierten GFP-Expression und dem immunhistochemischen Nachweis für den neuronalen Marker NeuN zwei Wochen nach der Infektion a) GFP-Expression, b) immunhistochemischer Nachweis für NeuN. Balken = 30 μ m.

3.3.1 Vektorinjektion in das Ventrikelsystem

Um die Expressionszeit eines therapeutischen Gens detailliert zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit gezielt die Transduktion von Ventrikependymzellen über den Liquor cerebrospinalis durchgeführt. Der Liquor bzw. die Ependymzellen waren deshalb als Zielstruktur von großer Bedeutung, da die Nervenzellen einer ganzen Reihe von an das Liquorsystem angrenzenden Hirnarealen im Zuge von neurodegenerativen Erkrankungen zu Grunde gehen. Um das Liquorsystem als mögliche Zielstruktur zu validieren, ist es das Ziel dieses Versuchsabschnittes gewesen, die Frage zu klären, ob der Vektor über den Liquor „ausschließlich“ Ependymzellen infiziert, also eine lokale Verteilung des Vektors stattfindet, oder ob es darüber hinaus auch zu einer Verteilung des Vektors in den subependymalen Bereich kommt.

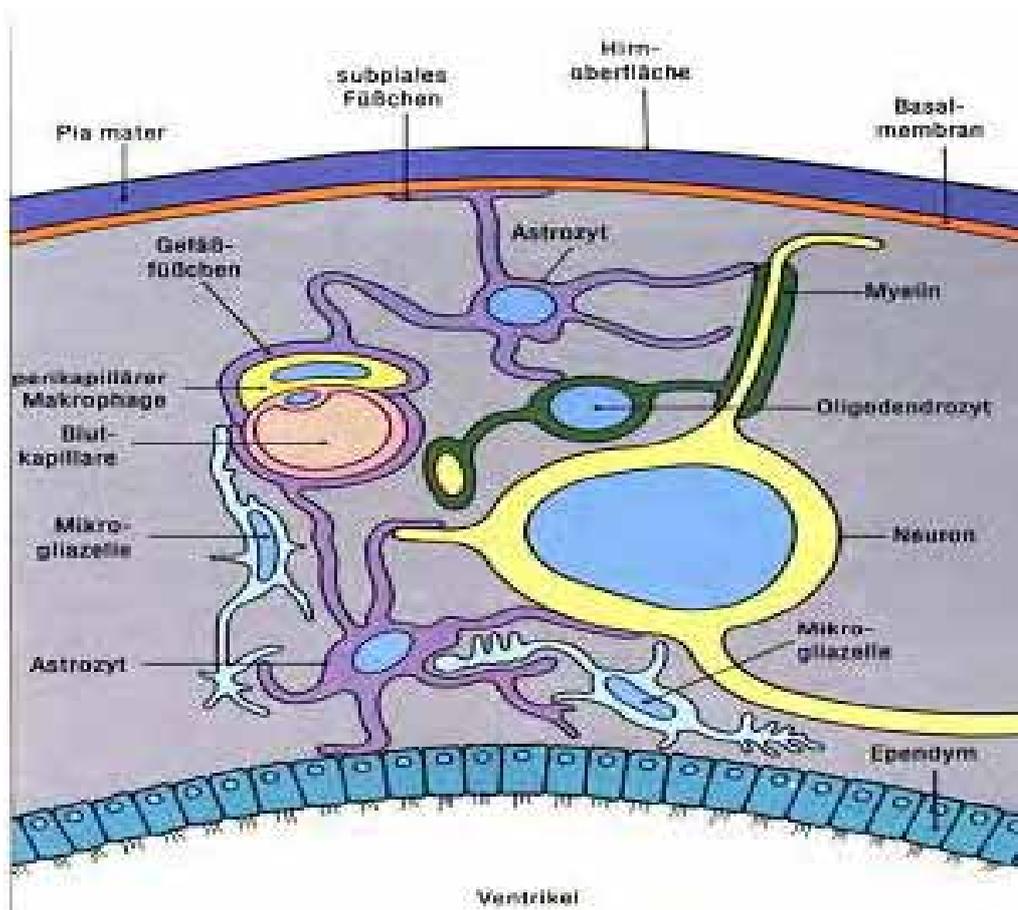


Abb. 28: Schema zur Darstellung der Morphologie des Ventrikependyms und des subventrikulären Kompartiments (aus Stephens Lowe).

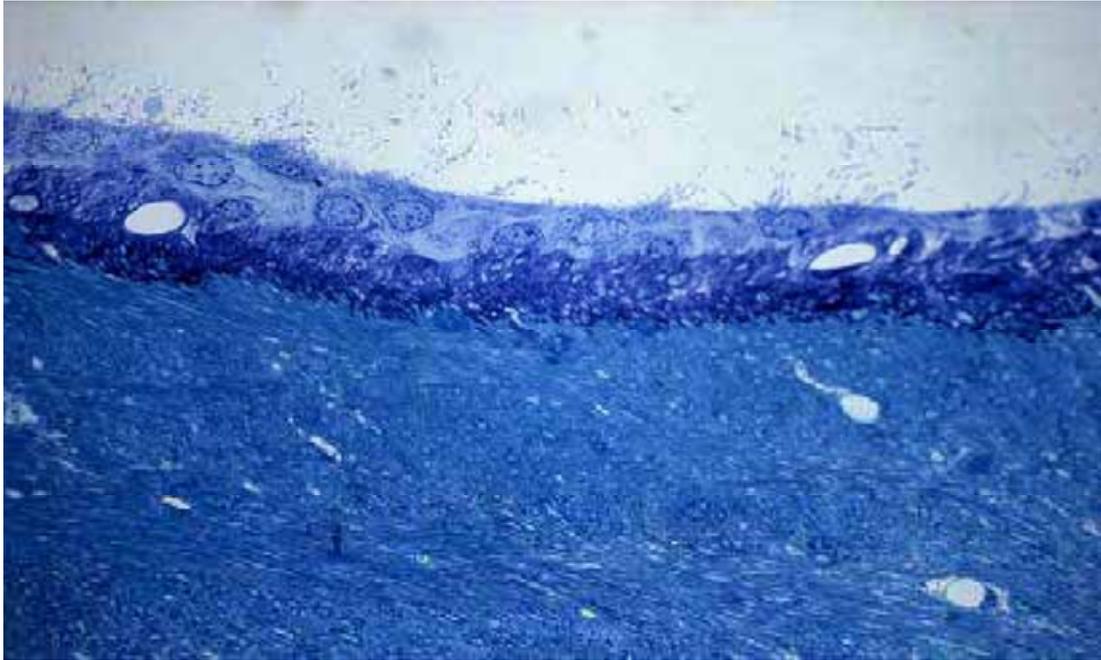


Abb. 29: Histologische Darstellung der Ependymozyten im Semidünnschnitt.

Für diese Experimente wurde der Vektor, der entweder das Reportergen GFP bzw. LacZ oder das Markerprotein SEAP enthielt, direkt in das Ventrikelsystem injiziert (n=3). Nach den üblichen Inkubationszeiten von 1 Woche, 2 Wochen etc. wurden die Tiere getötet, die Gehirne isoliert und nach Anfertigung von Kryostatschnitten zur Analyse herangezogen (Abb. 24).

Bereits bei der Untersuchung des Ventrikelependyms nach einer Überlebenszeit von einer Woche konnte in den Ependymzellen des für die Injektion herangezogenen rechten Ventrikels die Expression der Reportersequenzen dargestellt werden. Die Zellen der gesamten ependymalen Barriere wiesen sowohl eine Grünfluoreszenz durch GFP (Abb. 30) als auch eine LacZ-Expression, dargestellt mit der β -Galaktosidasefärbung, auf (Abb. 31, Abb. 32, Abb. 33). Darüber hinaus konnte immunhistochemisch auch der Nachweis der SEAP mit dem PLAP-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 36). Neben dem Ventrikelependym waren auch die Epithelzellen des Plexus choroideus betroffen (Abb. 34), außerdem Neurone und Gliazellen im subependymalen Bereich (Striatum) (Abb. 35). Mit entsprechenden Antikörpern konnten 65% Astrozyten (GFAP) und 45% Neurone (NeuN) semiquantitativ ermittelt werden; zusätzlich erfolgte die Anfärbung der Zellen mit Hoechst dye zur Darstellung der Gesamtzellzahl. Der Nachweis einer positiven Infektion des Ventrikelependyms konnte über einen Zeitraum von 10 Wochen ermittelt werden.

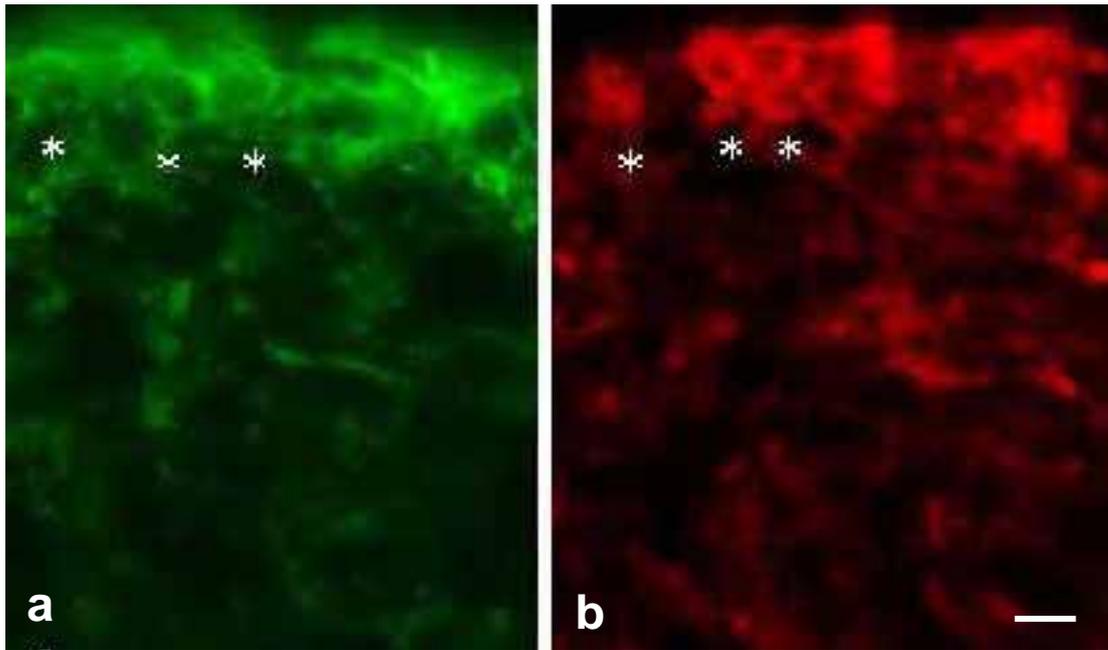


Abb. 30: Ventrikelependymzellen nach Transduktion mittels des high capacity adenoviralen Vektors zwei Wochen nach Injektion. a) GFP Expression, b) immunohistochemische Gegenfärbung mit dem Antikörper gegen das Intermediärfilament Vimentin. Balken = 20 μm .

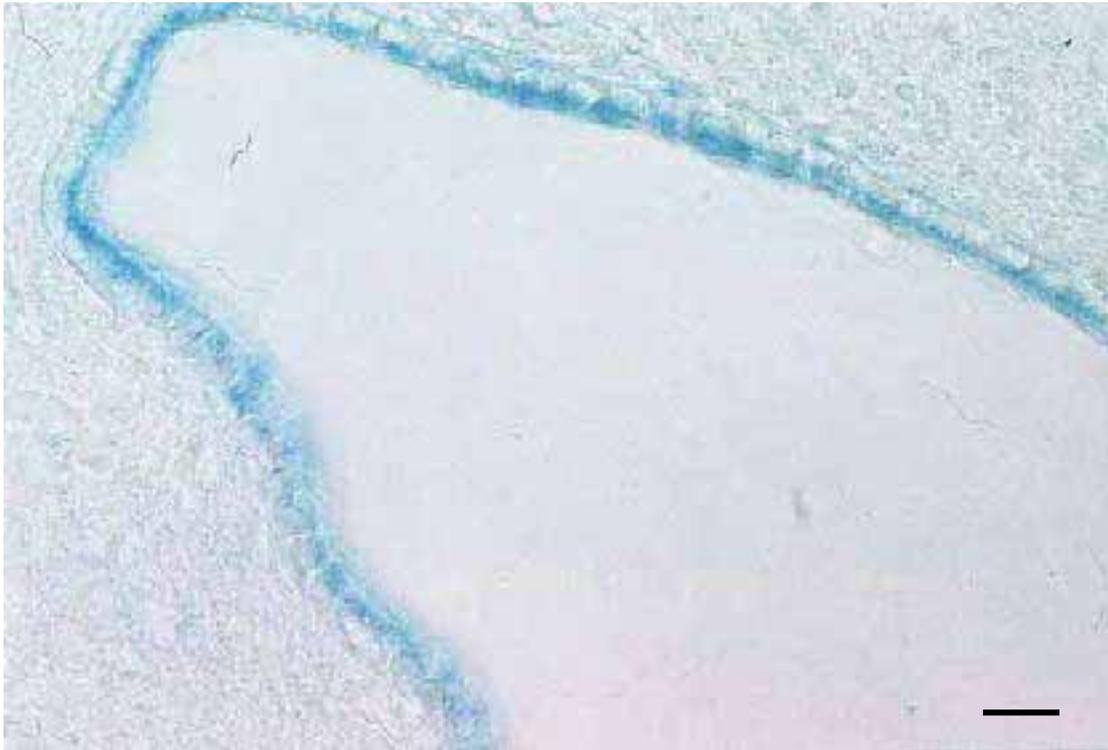


Abb. 31: Nachweis der Transduktion der Ventrikelpendymzellen mittels der β -Galaktosidasehistochemie. Es kann eine positive β -Galfärbung im gesamten Ventrikel detektiert werden. Balken = 35 μ m.

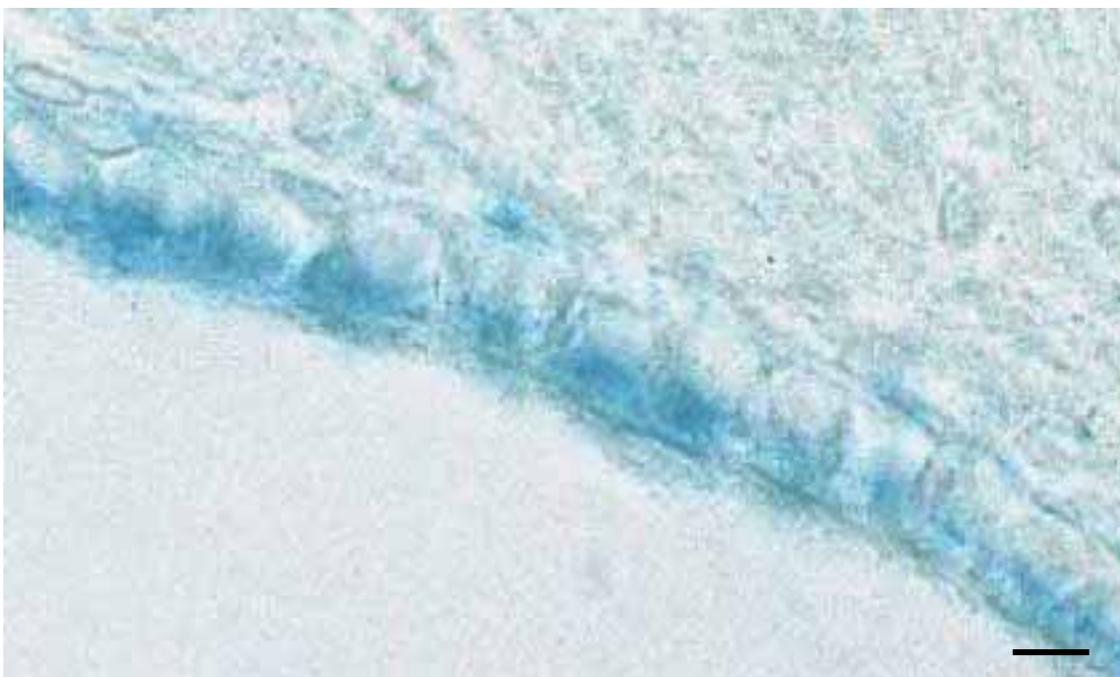


Abb. 32: Höhere Vergrößerung von Abb. 31 zur Darstellung der Transduktion des gesamten Ventrikelpendyms des rechten Seitenventrikels nach intraventrikulärer Vektorinjektion in diesen Ventrikel. Balken = 12 μ m.



Abb. 33: Nachweis der Transduktion der Ventrikelependymzellen mittels der β -Galaktosidasehistochemie. Es kann eine positive β -Galfärbung im gesamten Ventrikel detektiert werden. Balken = 25 μ m.

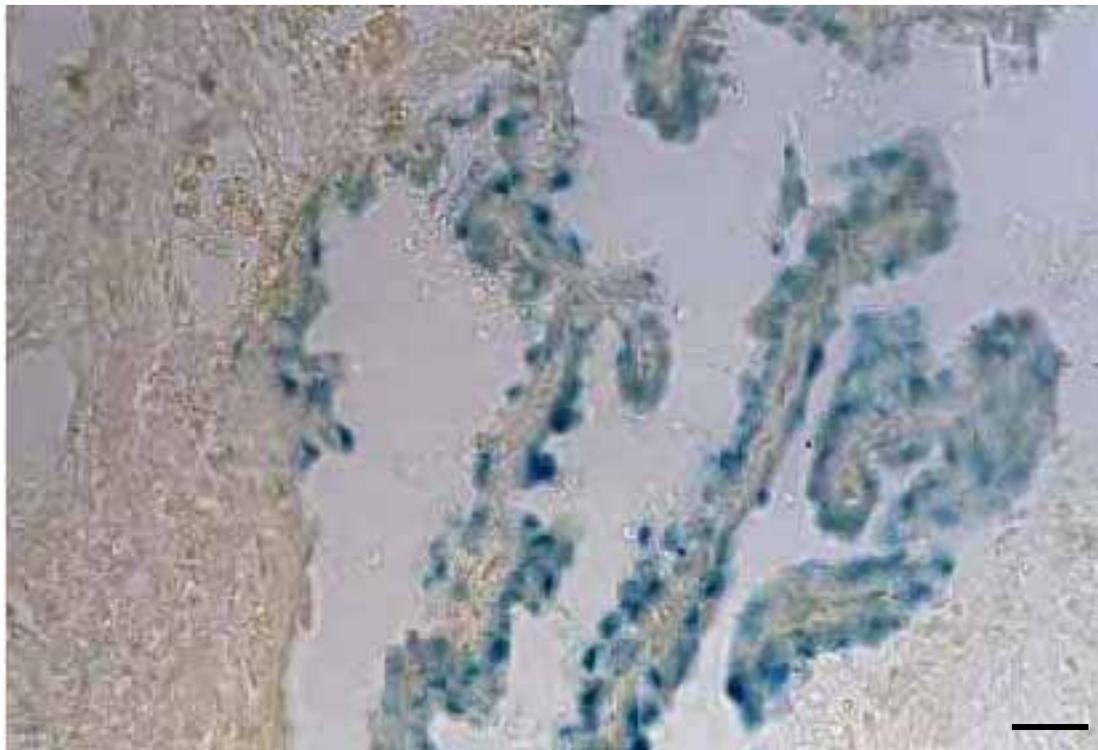


Abb. 34: Nachweis der Transduktion der Epithelzellen des Plexus choroideus mittels der β -Galaktosidasehistochemie. Balken = 25 μ m.

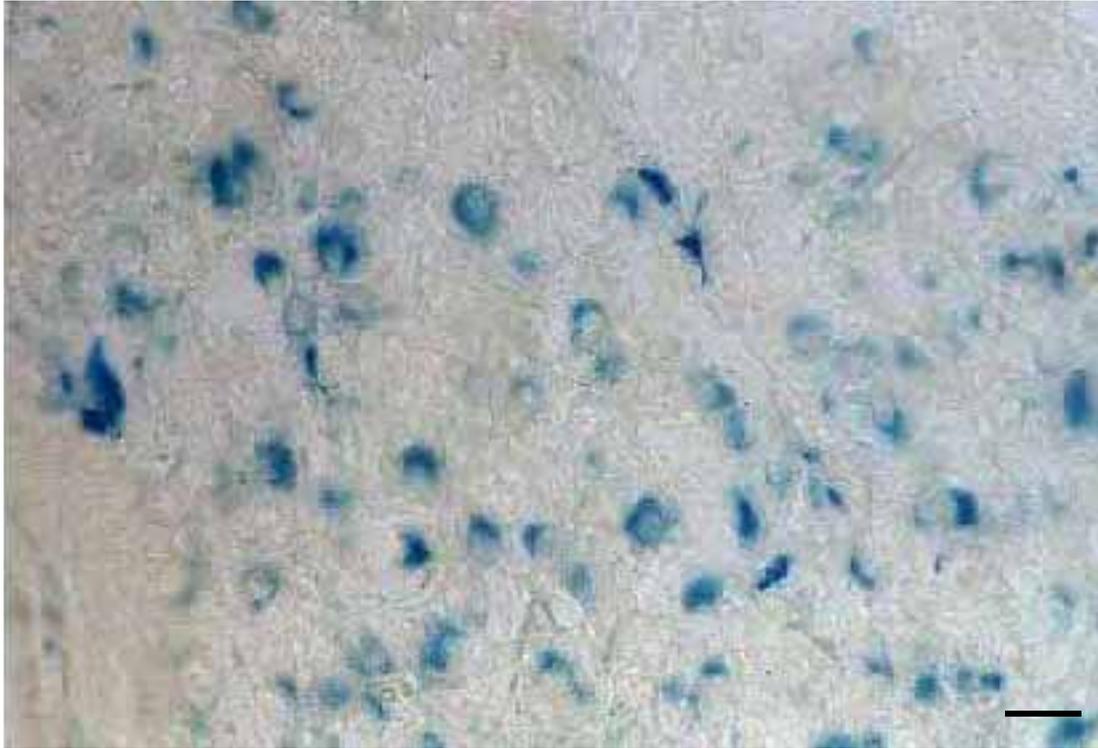


Abb. 35: Mit Hilfe der β -Galaktosidasefärbung kann ebenfalls die Transduktion von Neuronen und Gliazellen im ventrikelnahen Bereich dargestellt werden. Balken = 25 μ m.

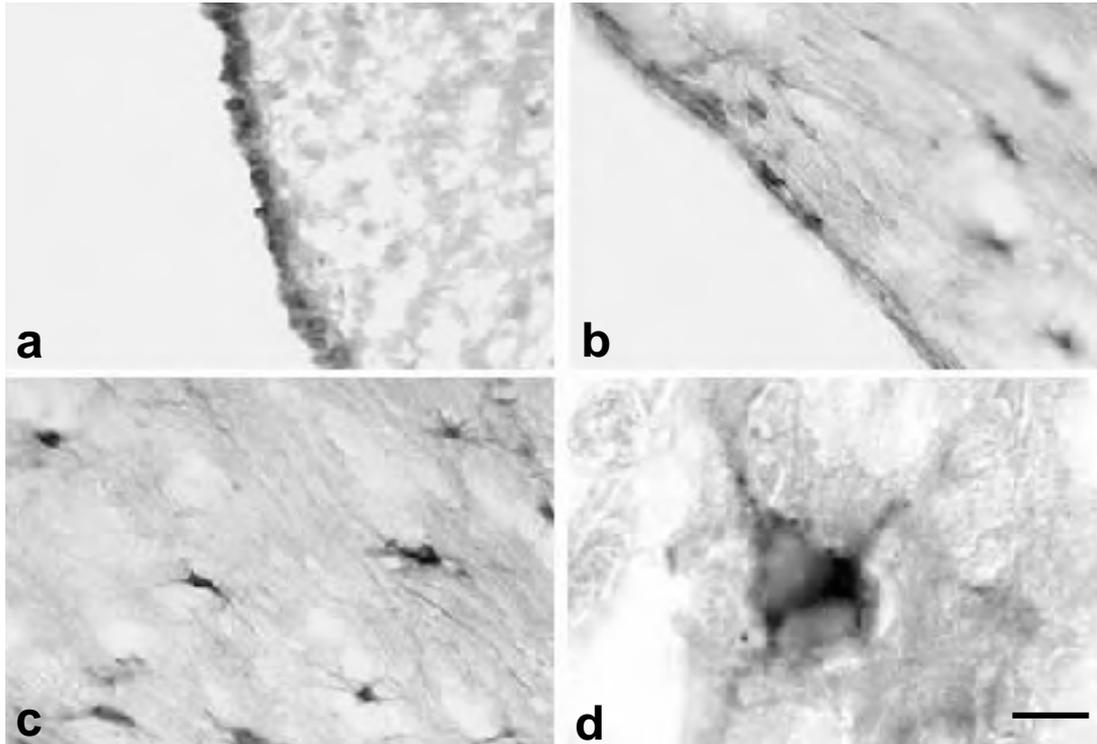


Abb. 36: Immunhistochemische Darstellung der SEAP-Expression nach Vektorinjektion in den rechten Seitenventrikel. a) Nach Vektorinjektion kann die SEAP Expression im gesamten rechten Ventrikelependym dargestellt werden, b) zusätzlich zur Expression in den Ependymzellen kann eine Expression in subependymalen Hirnarealen (Striatum) gezeigt werden, c) in den ventrikelnahen Bereichen sind neuronale und gliale Zellen positiv für SEAP, d) neuronale Zelle nach Transduktion bei hoher Vergrößerung (40x). Balken in a-c = 30 μ m, in d = 10 μ m.

3.4 Direkte Vektorapplikation in den lateralen Ventrikel über einen permanenten Zugang

In einem weiteren Versuchsansatz zur Klärung der Frage, ob eine erfolgreiche Transfektion der Ependymzellen stattfand bzw. eine damit verbundene Expression des Vektors über definierte Zeiträume registriert werden konnte, wurde Ratten operativ eine permanente Sonde in den lateralen Ventrikelbereich eingefügt. Zusätzlich bot die Anlegung einer permanenten Sonde in den Seitenventrikel der Tiere den Vorteil der Möglichkeit einer wiederholbaren Verabreichung des Vektors über das mit Dentalzement fixierte Implantat. Für einen prospektiven therapeutischen Einsatz wäre dadurch die Möglichkeit gegeben, eine therapeutische Substanz nach Wirkungsrückgang mehrfach zu verabreichen, ohne einen wiederholten operativen Eingriff durchführen zu müssen.

Analog zu der herkömmlichen Vektorinjektion mittels einer Hamiltonspritze konnte auch nach einer Vektorinjektion über die permanent angelegte Sonde die Transduktion des gesamten Ventrikelependyms bereits nach einer Woche gezeigt werden. Darüber hinaus konnte das Markerprotein SEAP in subventrikulären Arealen und im Plexus choroideus nachgewiesen werden. Das bedeutete, dass sich der Vektor über den Liquor cerebrospinalis im lateralen Ventrikel verteilte und über die ependymale Barriere hinaus in den subventrikulären Bereich diffundiert war. Es konnte damit von einer Verteilung des Vektors vom Injektions- bzw. Applikationsbereich aus in die angrenzenden Hirnareale ausgegangen werden.

Es konnten auch neuronale und gliale Zellen in den an die Ventrikel angrenzenden Arealen als positiv markiert detektiert werden.

Für die Analyse des sezernierten SEAP im Liquor cerebrospinalis wurden jeweils 5 µl Liquor mit Hilfe eines luminometrischen Assays über einen Zeitraum von 8 Wochen nach intraventrikulärer Vektorinjektion untersucht. Der Vektor wurde repetitiv über die permanente Sonde unter leichter Sedation entnommen.

Die Ergebnisse zur Analyse des Markerenzym SEAP im Liquor cerebrospinalis mit Hilfe eines luminometrischen Assays sind in Tab. 4 zusammengefasst und in Abb. 37 graphisch dargestellt. Die aus den mittels des luminometrischen Assays gemessenen relative light units (RLU) wurden mit Hilfe eines mitlaufenden Standards auf die tatsächlichen Konzentrationen in ng/ml umgerechnet und entsprechend aufgetragen. In dem Liquor des Kontrolltieres der Kontrollgruppe, bei dem kein Vektor in den Liquor injiziert wurde, konnte kein SEAP nachgewiesen werden. Außerdem konnte kein SEAP nach reiner PBS-Injektion in den lateralen Ventrikel detektiert werden. Bei den Tieren, bei denen eine Vektorinjektion durchgeführt wurde (n=4), kam es nach einem Anstieg zwischen Tag 0 und Tag 5 bzw. 21 zu einer deutlichen Reduktion der SEAP-Konzentration. Zwischen Tag 42 und 56 konnte in dem Liquor der für die Untersuchung herangezogenen Tiere kein SEAP mehr detektiert werden.

	Tag 0	Tag 4	Tag 6	Tag 13	Tag 21	Tag 29	Tag 33	Tag 42	Tag 56
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tier 1	0	20	62	43	6	2	0	0	0
Tier 2	0	6	7	35	68	10	8	0	0
Tier 3	26	35	48	54	44	38	34	1	0
Tier 5	16	12	24	19	7,5	0	0	0	0

Tab. 4: Nachweis über die Konzentrationen des mittels des luminometrischen Assays bestimmten SEAP im Zeitverlauf im Liquor cerebrospinalis adulter Ratten (in ng/ml). Gegenüberstellung von 4 Versuchstieren und einer unbehandelten Kontrollgruppe (n=2). Eingesetztes Volumen für die Bestimmung von jeweils 5 µl Liquor.

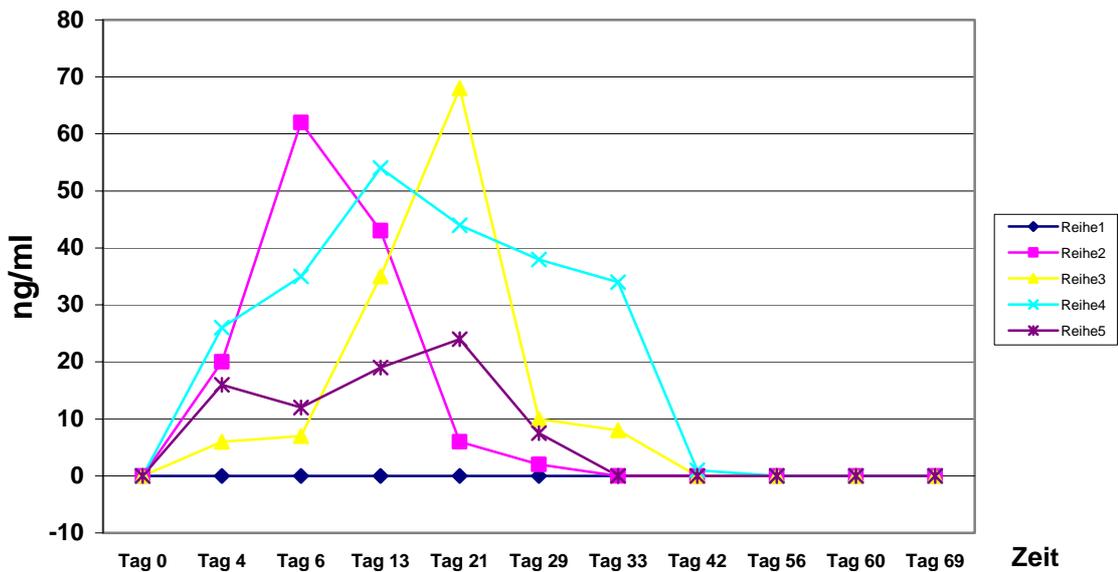


Abb. 37: Graphische Darstellung der Konzentrationen von SEAP im Liquor cerebrospinalis im Zeitverlauf. Reihe 1 entspricht der unbehandelten Kontrollgruppe. Reihen 2-5 zeigen die Daten der luminometrischen Analyse des Liquor cerebrospinalis nach Transduktion verschiedener Versuchstiere.

Zum Nachweis einer Immunreaktion in Folge einer direkten Vektorinjektion wurden immunhistochemische Analysen unter Verwendung des Mikroglia- und Makrophagenmarkers ED-1/IBA durchgeführt. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen für ED-1 zeigte jedoch, dass es nach der Vektorinjektion zu keiner verstärkten Invasion von Makrophagen bzw.

Mikrogliazellen in dem Bereich des Injektionsareals kam (Abb. 38). Als Kontrollschnitte dienten Präparate von Tieren, bei denen statt der Vektorinjektion lediglich eine Injektion des Trägermediums durchgeführt wurde.

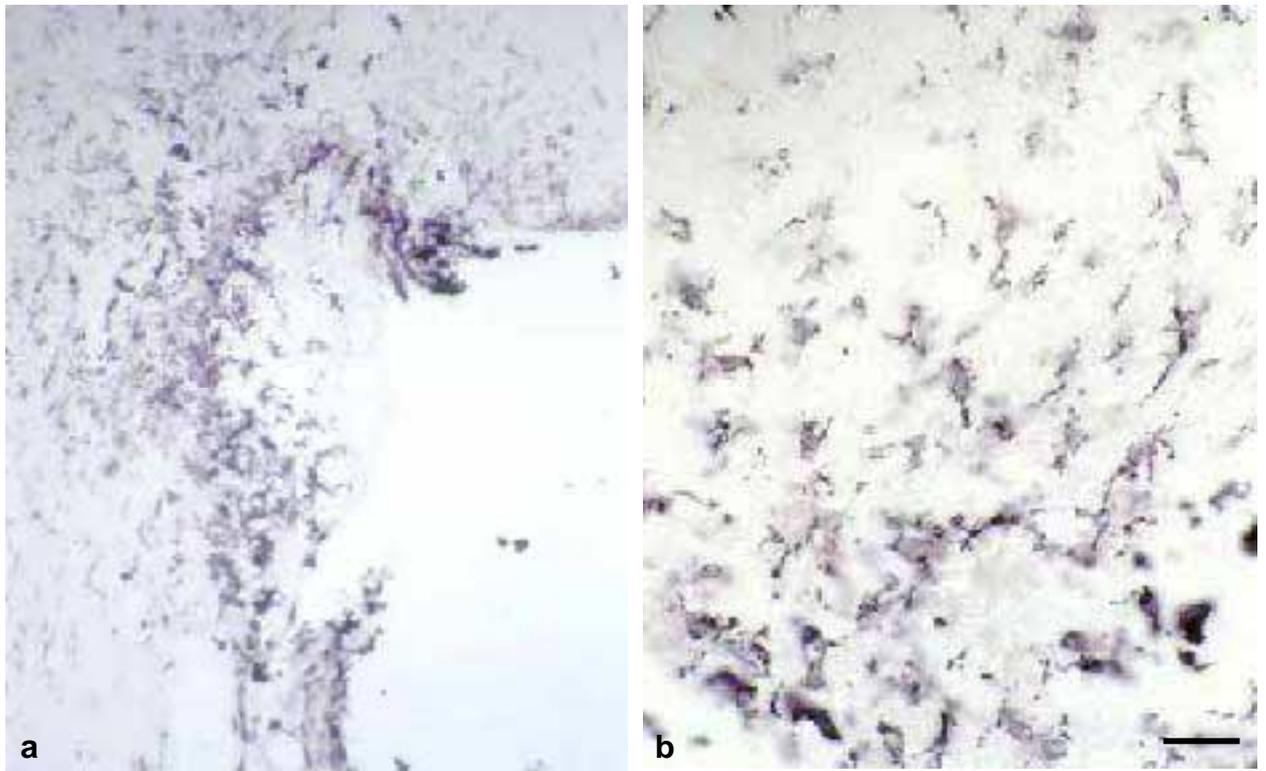


Abb. 38: Expression des Mikroglia markers IBA im Bereich der angelegten Sonde. a) Nach Injektion des adenoviralen Vektors konnte keine im Sondenbereich vermehrte Mikroglia invasion beobachtet werden b) höhere Vergrößerung von a). Balken = 100 μm in a) 30 μm in b).