

4 Diskussion

Um den Einsatz von gentherapeutischen Optionen für das Nervensystem unter experimentellen Bedingungen zu testen, werden in der vorliegenden Arbeit Ependymzellen, Gliazellen und Neuronen an umschriebenen Stellen im Bereich der Kerngebiete mit einem Gentransfervektor transduziert.

So werden in der vorliegenden Untersuchung verschiedene potentielle Targetzellen (ex-vivo) für einen gentherapeutischen Ansatz hinsichtlich ihrer Transduktionseigenschaften getestet mit dem Ziel, sie für eine mögliche Produktion von neurotrophen Faktoren oder biogener Amine zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen zu charakterisieren.

Hinsichtlich der in-vivo Untersuchungen wird der Vektor direkt mittels stereotaktischer Injektion und unter Verwendung entsprechender Koordinaten in das gewünschte Gehirnareal, also in den Ventrikel bzw. das Corpus callosum und das Striatum, injiziert. Weiterhin kann der Vektor mit Hilfe eines permanenten Katheters, der genau im gewünschten Gehirnareal angebracht worden ist, wiederholt appliziert werden.

4.1 Kritik der Methoden

Verwendung des Vektors

Wie bereits mehrfach erwähnt, beruht die vorliegende Arbeit auf der Verwendung von adenoviralen Vektoren der dritten Generation, die im Gegensatz zu den Vektoren der ersten und der zweiten Generation, die teil-deletiert sind, nur noch die Hüllproteine und die inverted terminal repeats (ITRs) besitzen. Der Vektor bietet damit eine extrem hohe Aufnahmekapazität für Fremd-DNA, sodass die Gene, die für verschiedenste Proteine kodieren, in die Vektorsequenz integriert werden können. Zu diesen Proteinen können einerseits Reportersequenzen, wie beispielsweise GFP, LacZ und andererseits das Markerenzym SEAP gehören. Insgesamt handelt es sich bei den Reportersequenzen um Proteine, die physiologisch nicht im Empfängergewebe exprimiert werden, sodass falsch-positive Daten ausgeschlossen werden können.

Das Markerenzym SEAP bietet darüber hinaus den Vorteil, dass zusätzlich zu einer einfachen Zellmarkierung, entweder über eine histochemische Darstellung der alkalischen Phosphatase oder mittels immunhistochemischer Nachweismethoden mit Hilfe eines luminometrischen Assays auch die tatsächliche Sekretionsleistung der transduzierten Zellen in-vitro und in-vivo ermittelt werden kann.

Zusätzlich zur Integration der Sequenzen von Markerproteinen bietet der Vektor im Hinblick auf eine Entwicklung von therapeutischen Strategien natürlich die Möglichkeit, auch Gene von therapeutisch interessanten Substanzen, wie neurotrophen Faktoren, oder von spezifischen Neurotransmittern, die bei bestimmten Mangelzuständen (Dopamin bei M. Parkinson) substituiert werden müssen, aufzunehmen. Die Deletion der eigentlichen viralen Sequenzen bietet insbesondere beim adenoviralen Vektor der dritten Generation, der demzufolge als „gutless“ Vektor bezeichnet wird, den Vorteil, dass dieser, verglichen mit dem Wildtypvirus sowie mit den Vorgängervektoren, nur noch eine ganz geringe Toxizität aufweist und replikationsdefizient ist. Dies garantiert für einen therapeutischen Einsatz des Vektors eine größtmögliche Sicherheit für den Einsatz am Patienten, sodass schädigende Nebenwirkungen wie Immunreaktionen nahezu ausgeschlossen werden können.

Verwendung der verschiedenen Zellen bzw. Zelllinien

Die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Zellen zur Überprüfung des Einsatzes des adenoviralen Vektors im Rahmen eines ex-vivo gentherapeutischen Einsatzes beruht auf Angaben in der Literatur (BEHRSTOCK und SVENDSEN, 2004). Es werden Zellen oder Zelllinien genutzt, die in vergleichbaren Arbeiten unter Verwendung anderer Vektoren zur Evaluation von gentherapeutischen ex-vivo Verfahren eingesetzt wurden. Außerdem werden in dieser Arbeit Zellen verwendet, die auch als Ausgangsmaterial für Zellersatztherapien in verschiedenen Versuchsansätzen eingesetzt werden.

Die Verwendung von astrozytären Vorläuferzellen als Trägerzellen für eine ex-vivo Gentherapie beruht auf der Vorstellung, dass Astrozyten bzw. ihre Vorläuferzellen eine größtmögliche Integrationsfähigkeit in dem Empfängersystem ZNS zeigen sollten. Der gezielte Einsatz von glialen Vorläuferzellen soll aufgrund einer größeren Plastizität von noch nicht-terminal differenzierten Zellen die Integration nach Transplantation erleichtern. Die Zellen sollen sich anschließend möglichst entlang der für sie charakteristischen und beschriebenen Differenzierungslinien im

Empfängergewebe weiterentwickeln. Diese Weiterentwicklung kann dann gleichzeitig als Indiz für eine erfolgreiche Integration der Zellen im Empfängergewebe gewertet werden.

Der Einsatz von neural differenzierten embryonalen Stammzellen trägt der aktuell geführten Stammzelledebatte Rechnung. Diese Zellen werden immer wieder als die geeigneten Zellen für einen therapeutischen Gewebeersatz diskutiert. Es konnte unter Verwendung der neural differenzierten ES-Zellen zumindest experimentell eine erfolgreiche Differenzierung zu Neuronen, Gliazellen aber auch zu Oligodendrozyten nach Transplantation demonstriert werden (BRÜSTLE et al., 1999; ARNHOLD et al., 2000). Darüber hinaus werden diese Zellen auch als Trägerzellen für einen ex-vivo therapeutischen Ansatz diskutiert (ARNHOLD et al., 2003).

Als ein Beispiel für eine adulte Stammzelle als eine mögliche Trägerzelle für einen gentherapeutischen Einsatz werden in dieser Arbeit mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark verwendet. Diese Zellen können im Rahmen eines relativ einfachen Eingriffes von einem Patienten gewonnen werden und anschließend, nach entsprechender Anreicherung in der Zellkultur und Vektortransduktion, autolog dem Patienten wieder in die gewünschten Organe zur Unterstützung der Regeneration implantiert werden. Abstoßungsreaktionen können damit gänzlich ausgeschlossen werden (PITTENGER et al., 2002).

Direkte Vektorinjektion in verschiedene Hirnareale

Für die direkte Vektorinjektion in das Cerebrum werden verschiedene Hirnareale wie das Striatum, das Corpus callosum bzw. der Liquorraum des lateralen Ventrikels bestimmt. Für die Auswahl sind zweierlei Kriterien entscheidend. Zum einen sollen die Areale strukturell sehr unterschiedlich gestaltet sein. Dafür wird das Striatum als kompaktes Hirngewebe mit einem gleichmäßigen Anteil neuronaler und glialer Zellen inklusive der entsprechenden Zellfortsätze gewählt. Das Corpus callosum wird aufgrund seiner Struktur als Kommissurenbahn in die Untersuchung miteinbezogen. Hier soll insbesondere die Verteilung des Vektors zwischen den Fasertrakten, die die Hemisphären kreuzen, analysiert werden.

Der Liquorraum wird herangezogen, da der Vektor hier zunächst mit einem flüssigen Milieu konfrontiert wird, bevor die für die Transduktion wichtigen Targetzellen, die Ependymzellen, erreicht werden. Grundlage der Untersuchung ist dabei, wie bereits erwähnt, die Verteilung des Vektors im Liquor cerebrospinalis.

Die Auswahl richtet sich zum anderen nach Arealen, die für die Behandlung von verschiedenen Krankheitsbildern des ZNS von besonderem Interesse sind. Dabei steht beispielsweise das Striatum für eine mögliche Therapie des M. Parkinson.

Die Vektorinjektion in das Corpus callosum könnte dagegen für Erkrankungen eine Rolle spielen, die einem dynamischen Prozess unterliegen. Diese Injektionsmethode könnte möglicherweise bei einer genetisch basierten Behandlung eines tumorösen Geschehens eine Rolle spielen. Da die Wachstumskinetik des Tumors und die Metastasierung nicht immer genau charakterisierbar ist und somit eine gezielte Injektion des Vektors in oder um das Tumorareal schwierig sein könnte, besteht stattdessen die Möglichkeit, dass der Vektor innerhalb des Fasertraktes des Corpus callosum in Richtung des Tumors diffundiert, um dann in unmittelbarer Umgebung des Tumors die Freisetzung antitumoröser Faktoren zu induzieren.

Durch die Vektorinjektion in den Liquor cerebrospinalis könnten verschiedene Hirnareale, die unmittelbar um den Liquorraum angesiedelt sind, erreicht werden.

Vektorinjektion/Ventrikelsystem mit permanenter Sonde

Der Vorteil einer permanent angebrachten Sonde im Ventrikel liegt in der Möglichkeit einer wiederholbaren Verabreichung einer therapeutischen Substanz in eine bestimmte gewünschte Region. In diesem Fall wird der laterale Ventrikel des Rattenhirns herangezogen, in den gemäß obiger Darlegung eine Sonde integriert wird und über die der Vektor der dritten Generation injiziert wird. Ziel ist es, dass der eingebrachte Vektor die den Ventrikel auskleidenden Ependymzellen infiziert. Das Produkt der Infektion, nämlich die sezernierte alkalische Phosphatase, lässt sich im positiven Fall im Liquor cerebrospinalis nachweisen. Ein weiterer Vorteil der dauerhaft angebrachten Sonde liegt darin, dass über die Entnahme von Liquor cerebrospinalis über die Sonde untersucht werden kann, ob die therapeutische Substanz in den Liquor sezerniert wird und ob sie noch in therapeutisch relevanten Konzentrationen vorliegt.

Nachweisverfahren

Für den Nachweis einer erfolgreichen Transduktion werden verschiedene Detektionssysteme verwendet, die sich von den eingesetzten Reportersequenzen ableiten. Nach Vektortransduktion der Zellen bzw. nach direkter Vektorinjektion in das Gewebe mittels des Hc-Ad GFP Vektors werden fluoreszenzmikroskopische Analysen zur Darstellung der GFP Expression durchgeführt. Für den Nachweis der

Transduktion mittels des LacZ Vektors wird die β -Galaktosidasereaktion angewendet. Aufgrund der Verwendung verschiedener Reportersysteme wird gewährleistet, dass die Transduktion der Zellen sicher beurteilt werden kann. Somit können mögliche falsch-positive oder falsch-negative Befunde ausgeschlossen werden. Der Nachweis der klassischen Reportersequenzen wird in einigen Versuchsabschnitten, des entsprechenden Vektors, zusätzlich noch durch den histochemischen und immunhistochemischen Nachweis des Reporterenzym der sezernierten alkalischen Phosphatase bestätigt. Darüber hinaus erlaubt die Analyse dieses Reporterenzym noch eine Angabe dazu, ob die transduzierten Zellen in-vivo nach Transduktion in der Lage sind, dieses Enzym zu synthetisieren. Diese Information ist im Hinblick der Synthese und Sekretion einer zukünftig verwendeten therapeutischen Substanz von immenser Bedeutung.

Mit Hilfe des luminometrischen Nachweises der SEAP im Liquor cerebrospinalis kann auf die tatsächlich synthetisierte Menge dieses Markerenzym geschlossen werden. Außerdem kann am lebenden Tier, in Verbindung mit dem permanenten Zugang zum Liquorsystem, die Dauer der Sekretion der SEAP durch repetitive Liquorentnahme bestimmt werden.

4.2 Diskussion der Befunde

Im Rahmen dieser Arbeit werden erstmals detailliert die Transduktionseigenschaften von Helfervirus abhängigen high capacity adenoviralen Vektoren für den Einsatz an neuronalen Zellen, neuronalen Progenitorzellen bzw. an mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark untersucht. Dabei kann gezeigt werden, dass die adenoviralen Vektoren der dritten Generation Fremdgene in Form verschiedener Reportersequenzen in unterschiedliche Stammzelltypen einschleusen können. Die Effizienz, genauer die Transduktionseffizienz, ist abhängig von der jeweiligen Vektorkonzentration sowie von den jeweiligen transduzierten Zelltypen.

Die besten Transduktionserfolge, d.h. eine nahezu vollständige Transduktion, wird unter Verwendung von glialen Vorläuferzellen der Ratte bzw. des Menschen bei Vektorkonzentrationen von 100 MOI erzielt. Unter Verwendung eines dem adenoviralen Vektor verwandten Vektors, nämlich dem adeno-assoziierten viralen Vektor, kann in neuronalen humanen Progenitorzellen eine ähnlich hohe Transduktionsrate erzielt werden (WU et al., 2002). Dabei werden die neuronalen Progenitorzellen sowohl unter proliferativen Bedingungen innerhalb der Sphäroide

als auch nach Plattierung während der Differenzierung transduziert. Dagegen kann unter Verwendung eines Vektors, der von einem Bakkulovirus abgeleitet ist, in verschiedenen neuronalen humanen Progenitorzelllinien bei mittleren Vektorkonzentrationen nur eine Transduktionsrate von maximal 25% erreicht werden (SARKIS et al., 2000). Allerdings fällt die Transduktionsrate in differenzierten neuronalen Zellen etwa doppelt so hoch aus. Für ausdifferenzierte Astrozyten gibt es verschiedene Untersuchungen, die gezeigt haben, dass auch unter der Verwendung von adenoviralen Vektoren der ersten Generation mäßige Transduktionsraten erzielt werden (LUNDBERG et al., 1996; RIDET et al., 1999). Darüber hinaus kann mit einer ähnlich immortalisierten Astrozytenvorläuferzelllinie, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, unter Einsatz eines adenoviralen Drittgenerationsvektors eine ähnlich hohe Transduktionsrate erzielt werden wie in der hier genutzten glialen Vorläuferzelllinie der Ratte (ARNHOLD et al., 2000). Die hohen Transduktionsraten der glialen Progenitorzellen bestätigen frühere Daten über einen effizienteren Gentransfer in neuronalen Progenitorzellen, die in die gliale Richtung differenzieren als in weitgehend undifferenzierten neuronalen Stammzellen (HUGHES et al., 2002).

Diese Betrachtungsweise steht auch im Einklang mit den hier gezeigten Befunden zur Transduktion von neural differenzierten embryonalen Stammzellen. In diesen Zellen kann ebenfalls eine vorrangige Transduktion von glialen Zellen bzw. glialen Vorläuferzellen gezeigt werden. Bisher wurden eine ganze Reihe viraler Vektorsysteme hinsichtlich ihrer Kapazität, Fremdgene in ES-Zellen einzuschleusen, getestet. Dazu gehören retrovirale und adenovirale Vektoren sowie Herpes Simplex Vektoren (RUST et al., 1997; ASAHARA et al., 2000; STEVENSON et al., 2000; PFEIFER et al., 2002). Allerdings gibt es bisher keine Daten hinsichtlich einer Transduktion in neural differenzierten ES-Zellen mittels eines high capacity adenoviralen Vektors. Bei der Vektortransduktion von ES-Zellen ist die Transduktionseffizienz allerdings abhängig von den ausgewählten ES-Zellklonen. Unter der Verwendung des D3 Klonen mit der Expressionskassette für das GFP, unter der Kontrolle des humanen Nestingens (Nestinklon), können höhere Transduktionsraten erzielt werden als dies mit dem D3 Wildtypklon der Fall ist. Obwohl beide Zelllinien zu einer Differenzierung in die neurale Richtung gelenkt werden können, zeigen die Befunde, dass die Insertion der GFP-Expressionskassette die Eigenschaften der Zellen verändern kann. Die weitere Differenzierung der Zellen in Neurone und Gliazellen ist allerdings nach der Vektortransduktion vergleichbar mit der Kontrollgruppe, d.h. nicht-transduzierten

Zellen. Diese Befunde stehen wiederum im Einklang mit solchen, die an neuronalen Progenitorzellen aus dem ZNS erhoben wurden. Auch diese Zellen zeigen nach Vektortransduktion, allerdings mit einem AAV-Vektor, ein unverändertes Differenzierungsverhalten (WU et al., 2002).

Die Vektortransduktion von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmarkstroma führt selbst unter Verwendung einer hohen Vektorkonzentration von 100 MOI nur zu mittleren Transduktionsraten. Allerdings bieten diese Zellen einerseits den entscheidenden Vorteil, dass sie in großer Zahl zur Verfügung stehen, da sie innerhalb von 10 Wochen 20-50 Populationsverdopplungen durchlaufen (DEVINE, 2002; LEE et al., 2003). Außerdem sind sie autolog verfügbar und können mit minimalem Aufwand (Knochenmarkpunktion) vom Patienten gewonnen werden. Sie können deshalb als autologe Trägerzellen im Rahmen von ex-vivo gentherapeutischen Applikationen eingesetzt werden, wodurch ein eventuelles Risiko einer Transplantatabstoßung entfällt bzw. auf eine Medikation mit Immunsuppressiva verzichtet werden kann. Ein weiterer Vorteil dieser Zellen ist, dass von ihnen eine neurale Differenzierungspotenz in-vitro und in-vivo gezeigt werden konnte (AZIZI et al., 1998; EGLITIS et al., 1999; KOPEN et al., 1999; WOODBURY et al., 2000). Dies bedeutet, dass sie vor Ort, d.h. nach Transplantation in das ZNS, tatsächlich die Potenz besitzen, in Zellen der neuronalen Linie zu differenzieren, wodurch eine Integration der mesenchymalen Stammzellen im Empfängergewebe durchaus wahrscheinlich ist. Bei einer stabilen Expression der in den Vektor eingeführten therapeutischen Sequenzen, wie sie durch den Einsatz eines adenoviralen Vektors der dritten Generation gewährleistet ist, reichen für einen therapeutischen Einsatz mittlere Transduktionsraten völlig aus.

Mittlerweile gibt es Untersuchungen, bei denen unter Verwendung verschiedenster viraler Vektorsysteme Fremdgene in mesenchymale Knochenmarkstromazellen eingeschleust werden. Bei diesen Untersuchungen standen zunächst solche mit einer orthopädischen Fragestellung im Vordergrund (MOSCA et al., 2000), bei denen die Sequenz des für die Knochenregeneration wichtigen Faktors bone morphogenic protein (BMP2) in die Trägerzellen transduziert wurde (TSUDA et al., 2003). Unter Verwendung eines retroviralen Vektors kann eine Langzeit-Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) beobachtet werden (MARX et al., 1999). Ähnliche Befunde können auch mittels eines lentiviralen Vektors gezeigt werden (ZHANG et al., 2002). Im Rahmen von ersten experimentellen therapeutischen

Einsätzen von vektortransduzierten mesenchymalen Stammzellen können im Mausmodell für die Niemann-Pick Erkrankung mittels eines retroviralen Vektors pathologische Auffälligkeiten verzögert bzw. vollständig unterdrückt werden (JIN et al., 2002). Mittels genetisch veränderter Stromazellen unter Verwendung eines adenoviralen Vektors kann in einem Rattengliomamodell nach Transplantation ein antitumorigener Effekt ermittelt werden (NAKAMURA et al., 2004). Allerdings ist eine Transduktion von mesenchymalen Stammzellen mittels eines Drittgenerationsvektors bisher noch nicht durchgeführt worden.

Eine mögliche therapeutische Applikation der hier verwendeten astrozytären Vorläuferzellen wird nach der vorliegenden Untersuchung auch durch die in-vivo Befunde nach Transplantation unterstützt. Zusätzlich zur effizienten Transduktion mittels des adenoviralen Vektors der dritten Generation von 80-95% in-vitro zeigen die transplantierten Astrozyten nach der Injektion in die Empfängerhirne eine stabile Transgenexpression für mindestens 6 Wochen. Weiterhin kann von einer physiologischen Reaktion auf lokale Einflüsse aus dem Empfängergewebe ausgegangen werden, da die Zellen entlang der glialen Linie differenzieren, wie sie von Cameron und Rakic beschrieben wurde (CAMERON und RAKIC, 1991). Darüber hinaus gibt es in den vorliegenden Untersuchungen keine Hinweise auf eine Tumorbildung, auf eine Transplantatabstoßung oder auf inflammatorische Prozesse. Die Wanderung der Zellen von der Injektionsstelle in das umliegende Gewebe bleibt in einem begrenzten Rahmen, sodass ein möglicher therapeutischer Effekt bzw. eine durch die Vektortransduktion induzierte Sekretion von therapeutischen Substanzen oder Faktoren in einem umschriebenen Areal um die Injektionsstelle synthetisiert werden.

Damit stellt der hier verwendete gliale Vorläuferzellklon ein viel versprechendes Vehikel dar, um lokal therapeutische Substanzen zu applizieren. Es handelt sich bei den Zellen um endogene Zellen des ZNS, die mit einem effizienten sekretorischen System ausgestattet sind, da sie bereits physiologisch eine ganze Reihe von neurotrophen Faktoren sezernieren (SWANSON et al., 2004). Dies steht im Einklang mit ähnlichen Untersuchungen (ENGLUND et al., 2000; ERICSON et al., 2002).

Im Gegensatz zu primären adulten Astrozyten, die in ähnlichen Versuchsansätzen verwendet wurden (LUNDBERG et al., 1996), haben spontan immortalisierte Astrozyten aus dem embryonalen Rattenhirn den Vorteil, dass sie in der Zellkultur unbegrenzt passagiert werden können, ohne dass sie ihre morphologischen

Eigenschaften oder ihre Differenzierungscharakteristika verlieren. Damit können sie als stabiler Pool von Trägerzellen für eine ex-vivo gentherapeutische Anwendung betrachtet werden.

Wie bereits erwähnt ist einer der bedeutenden Vorteile der adenoviralen Vektoren der dritten Generation gegenüber nicht Helfer-Virus-abhängigen Systemen und auch gegenüber Vektoren anderer Genese, dass der Vektor keine viral-kodierenden Sequenzen enthält, sodass Immunreaktionen weitestgehend ausgeschlossen sind. Darüber hinaus kann so eine stabile Transgenexpression garantiert werden. Dies wird auch durch die Beobachtungen in dieser Studie bezüglich einer persistierenden Zahl von GFP-exprimierenden Zellen im Empfängergewebe, über den sechswöchigen Beobachtungszeitraum hinweg, unterstützt. Diese Befunde stellen damit eine klare Verbesserung gegenüber Daten dar, die durch lentivirale Vektoren erzielt wurden (ERICSON et al., 2002). Im Gegensatz zu den Befunden von Ericson et al., 2002 exprimieren nach der vorliegenden Untersuchung auch solche Zellen GFP, die von der Injektionsstelle in die Peripherie migriert sind.

Ebenso wie die anderen hier beschriebenen möglichen Trägerzellen für eine ex-vivo Gentherapie, könnten die hier verwendeten astrozytären Vorläuferzellen durch Transduktion mit dem high capacity adenoviralen Vektor (KOCHANNEK, 1999) genetisch so modifiziert werden, dass sie in die Lage versetzt werden, gleichzeitig mehrere therapeutisch relevante Substanzen zu synthetisieren. Dieser Umstand könnte für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, bei denen nur eine symptomatische Therapie über die Verabreichung von neurotrophen Faktoren erfolgen kann, äußerst bedeutsam sein.

Um nun tatsächlich humane Astrozyten für einen therapeutischen Einsatz am Menschen zu bekommen, die auch in großer Zahl als Vehikel für einen gentherapeutischen Einsatz zur Verfügung stehen, könnten diese beispielsweise autolog vom jeweiligen Patienten im Rahmen eines neurochirurgischen Eingriffes aus dem humanen cerebralen Cortex isoliert werden und anschließend in der Zellkultur angereichert werden. Anschließend könnten sie mittels des rekombinanten adenoviralen Vektors mit hoher Effizienz transduziert werden, wie dies bereits für Erstgenerationsvektoren gezeigt werden konnte (RIDET et al., 1999; SERGUERA et al., 2001). Darüber hinaus besteht natürlich die Möglichkeit, wie das in den eigenen Befunden dargestellt wird, geeignete Zellen aus Resektatmaterial von jungen Patienten im Zuge von chirurgischen Eingriffen (Epilepsiechirurgie) zu gewinnen. Diese Zellen zeigen ähnlich gute Transduktionseigenschaften wie die Rattenzellen. Eine weitere Quelle für humane Astrozyten bzw. die Möglichkeit,

deren Vorläuferzellen zu erhalten, wäre die Isolation von neuronalen Vorläuferzellen aus dem Gehirn humaner Aborte. Solche neuronalen Vorläuferzellen sind mittlerweile auch kommerziell als Zelllinien erhältlich und können unter den geeigneten Kulturbedingungen in Neurone und Gliazellen differenziert werden (PIPER et al., 2000). Da Zellen dieser kommerziell erhältlichen Zelllinien nur als allogenes Zellmaterial vorliegen würden, müsste zur optimalen Anpassung des geeigneten Spendermaterials an das Empfängergewebe zunächst eine HLA-Typisierung erfolgen.

Als Alternative zum ex-vivo Gentransfer wird in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit der direkten Vektorinjektion in verschiedene Hirnareale untersucht. Dazu werden, wie bereits oben erwähnt, Hirnareale gewählt, die im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen als Zielstrukturen geeignet wären. Die direkte Vektorinjektion in das Striatum als mögliche Targetstruktur bei M. Parkinson und die anschließende immunhistochemische Charakterisierung der transduzierten Zellen zeigt, dass präferentiell Zellen der glialen Linie transduziert werden. Damit unterstützen diese Daten die Befunde aus den Transduktionsexperimenten in-vitro, bei denen ebenfalls gute Transduktionsergebnisse mit glialen Zellen gezeigt werden konnten (s.o.). Bei der Infektion von neural differenzierten ES-Zellen wurden ebenfalls vorrangig Astrozyten infiziert. Allerdings stehen die Befunde einer präferentiellen Transduktion von astroglialen Zellen nach Vektorinjektion im Kontrast zu Daten einer ähnlichen in-vivo Studie. Nach Injektion eines Helfervirus abhängigen adenoviralen Vektors in den Hippokampus 20 Monate alter Ratten werden sowohl Astrozyten als auch Neurone gleichermaßen transduziert (ZOU et al., 2001). Die Transgenexpression kann hier allerdings über einen Zeitraum von 183 Tagen beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Expression unter der Verwendung von adenoviralen Vektoren der dritten Generation sehr stabil ist. Eine ebenfalls stabile Expression im ZNS konnte in einer weiteren Studie auch in jüngeren Tieren mit einem high capacity adenoviralen Vektor erzielt werden (THOMAS et al., 2000). Eine stabile Langzeit-Expression der Transgene ist allerdings aus therapeutischer Sicht die Grundvoraussetzung für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen des ZNS (COSTANTINI et al., 2000).

Insbesondere die Unterdrückung von Verhaltensauffälligkeiten bei Tieren mit einer Parkinson- oder Alzheimersymptomatik setzen eine extrem lange Transgenexpression voraus (MANDEL et al., 1999). Dabei ist es in erster Linie unerheblich, ob vorrangig Neurone oder Gliazellen Zielzellen der Vektortransduktion sind. In jedem Fall muss eine der kritischsten Nebenwirkungen eines adenoviralen

Genstransfers ausgeschlossen werden; dies ist eine mögliche immunologische Antwort innerhalb des Empfängergewebes, das als Folge nicht nur die Zellen des Empfängergewebes, sondern auch die transduzierten Zellen schädigen würde und damit einen eventuellen Benefit einer solchen Therapie zunichte machen würde (KAJIWARA et al., 1997). Eine verstärkte immunologische Antwort kann allerdings in den eigenen Untersuchungen anhand der immunhistologischen Daten zur moderaten Expression von Mikroglia- bzw. Makrophagenmarkern nach direkter Vektorinjektion nahezu ausgeschlossen werden. Dies unterstreicht noch einmal den Vorteil des adenoviralen Vektors der dritten Generation gegenüber Erst- oder Zweitgenerationsvektoren hinsichtlich einer deutlich abgeschwächten Immunantwort nach Applikation in verschiedene Organsysteme, einschließlich des Nervensystems (JOOSS und CHIRMULE, 2003).

Die Verteilung eines injizierten Vektors in einem Empfängergewebe ist in erster Linie von der Struktur des Gewebes abhängig. Dies unterstreichen die hier gezeigten Befunde zur Vektorinjektion in die Fasertrakte des Corpus callosum. Da der Vektor zwischen den Nervenfasern sehr gut diffundieren kann, ist eine Verteilung nahezu im gesamten Fasertrakt bis hinüber auf die kontralaterale Seite zu beobachten. Die ausgezeichneten Diffusionsbedingungen innerhalb des Corpus callosum sind auf die anatomischen Besonderheiten in diesem Hirnkompartiment zurückzuführen, das im Wesentlichen aus Nervenfasern und Oligodendrozyten besteht (SCHIFFER und BORSOTTI, 1997). Die gute Transduktion der weißen Substanz innerhalb des Corpus callosum konnte bereits nach Injektion eines adeno-assoziierten Vektors demonstriert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass vor allem Oligodendrozyten die Zielzellen der Infektion waren (CHEN et al., 1999). Die guten Diffusionsbedingungen für die Vektorpartikel innerhalb des Fasertraktes überraschen allerdings nicht, angesichts der Tatsache, dass die weiße Substanz des Corpus callosum hervorragende Migrationsbedingungen für diverse Zelltypen bietet. So ist nicht nur die Migration von embryonalen Stammzellen in Richtung einer fokalen cerebralen Ischämie gezeigt worden (HOEHN et al., 2002), sondern auch von glialen Vorläuferzellen (ARNHOLD et al., 2003) sowie von mesenchymalen Stammzellen (NAKAMURA et al., 2004) in Richtung eines induzierten Tumors.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass die direkte Vektorinjektion in das Corpus callosum therapeutisch bei demyelinisierenden Erkrankungen (CHEN et al., 1999), aber möglicherweise auch bei tumorösen oder

degenerativen Erkrankungen eine Funktionsverbesserung liefert bzw. für eine Tumorremission sorgen könnte.

Die weitere in dieser Arbeit beschriebene mögliche Zielstruktur für eine Vektortransduktion ist das Ventrikelsystem, bzw. sind die ventrikelauskleidenden Ependymzellen. Die hier gezeigten Befunde einer Transduktion des Ventrikelependyms, einschließlich des Plexus choroideus einer Hemisphäre, lassen den Schluss zu, dass sich der Vektor nach Injektion im gesamten Ventrikelependym verteilt. Ähnliche Befunde konnten bereits in früheren Arbeiten, allerdings unter Verwendung anderer Vektorsysteme, gezeigt werden (KUMAI et al., 2003). Diese Studien wurden allerdings beide mit einem Erstgenerationsvektor durchgeführt. Während in unseren Untersuchungen die Expression des Reporterenzym bis zu 10 Wochen nach Infektion detektiert werden kann, ist in den zuvor zitierten Arbeiten die Expression des Reportergens LacZ nur bis zu sieben Tage nach Injektion in den Ependymzellen der Seitenventrikel nachweisbar. Allerdings ist nach dem Gentransfer für Interleukin-10 eine dreifach höhere Konzentration von Interleukin-10 im Liquor cerebrospinalis mittels ELISA nachweisbar als dies in der vorliegenden Arbeit für SEAP mittels Chemolumineszenz-Assay gezeigt werden kann. Vermutlich werden diese hohen Werte durch die höheren Vektorkonzentrationen, die in der Interleukin Studie eingesetzt werden, erzielt. Für einen therapeutischen Einsatz muss es allerdings das Ziel sein, möglichst niedrige Konzentrationen des viralen Vektors einzusetzen, um entsprechende Nebenwirkungen (Immunreaktionen) zu vermeiden.

Über eine permanente Sonde, die bis an das Ventrikelependym vorgeschoben wird, kann mittels einer Kanüle nach Vektorinjektion regelmäßig Liquor cerebrospinalis entnommen und die Konzentration des Reporterenzym SEAP im Zeitverlauf luminometrisch bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit ist diese Vorgehensweise die Grundlage für den Nachweis des Reporterenzym SEAP über einen Zeitraum von mehr als 42 Tagen. Diese ständige Kontrolle der Transgenexpression könnte für einen klinischen Einsatz bedeutsam werden, um ständig die Konzentration einer therapeutisch eingesetzten Substanz verfolgen zu können. Zeigt sich ein Konzentrationsabfall, könnte der Vektor erneut appliziert werden, sodass die Transgenexpression wieder induziert wird, um den erforderlichen Wirkspiegel stets aufrechtzuerhalten. Dieses Verfahren orientiert sich an der Implantation von Kathetern mit angeschlossenen Mikropumpen, die in Form eines Ommaya Reservoirs in den Liquorraum eingeführt werden; über diese

Zugänge können dann kontinuierlich therapeutische Substanzen appliziert werden (OMMAYA, 1984). Dies ist ein Verfahren, das ursprünglich aus der Onkologie stammt.

Mit Hilfe des direkten Gentransfers in die ventrikelauskleidenden Ependymzellen könnten beispielsweise die synthetisierenden Enzyme von biogenen Aminen wie Serotonin zur Therapie von Depressionen oder chronischen Schmerzsyndromen oder von Dopamin zur systemischen Behandlung von M. Parkinson appliziert werden. Andererseits könnten auch die Sequenzen für die Glutamat-Decarboxylase für die Synthese des Neurotransmitters GABA transduziert werden. Dieses Vorgehen könnte eine viel versprechende Alternative für die Behandlung von Epilepsien darstellen.

Die Weiterentwicklung der viralen Vektoren könnte dazu führen, dass den therapeutischen Sequenzen entsprechende Promotersequenzen vorgeschaltet sind, die mittels extern zuzuführenden Substanzen wie Tetrazyklin, Mifepreston oder Ecdysone aktiviert werden können. So könnten die Transgenexpression damit auch die Synthese und Freisetzung von therapeutischen Substanzen optimal und den Bedürfnissen entsprechend gesteuert werden. Somit wären diese noch sicherer in der Anwendung.

4.3 Schlussfolgerungen

Mit Hilfe des ex-vivo Gentransfers, unter der Verwendung diverser Stammzell- oder neuraler Vorläuferpopulationen sowie der autolog verfügbaren mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark oder des direkten Gentransfers in verschiedene Bereiche des zentralen Nervensystems, können völlig neuartige Therapieansätze etabliert werden. Diese therapeutischen Verfahren könnten eines Tages dazu dienen, diverse Erkrankungen des zentralen Nervensystems zu therapieren, für die bis dato noch kein befriedigendes Therapiekonzept zur Verfügung steht. Bei den verwendeten Zellen für den ex-vivo Ansatz muss allerdings höchste Aufmerksamkeit darauf verwendet werden, dass die Trägerzellen keiner zusätzlichen Schädigung durch das Auslösen einer Immunreaktion oder einer tumorigenen Entartung im Empfängergewebe ausgesetzt werden. Für die indirekte Vektorinjektion muss gewährleistet sein, dass der Vektor keine immunologische Reaktion hervorruft und die Transgenexpression möglichst exakt und den Bedürfnissen entsprechend gesteuert werden kann. Wenn diese Kriterien für beide Therapieformen erfüllt werden können, dann stellt die Gentherapie tatsächlich eine zukunftsweisende Behandlungsstrategie dar.