

## 5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit werden unter Verwendung eines adenoviralen Vektors der dritten Generation, eines sogenannten gutless Vektors, zunächst die Transduktionseigenschaften sowie die Transduktionseffizienz verschiedener Stammzellpopulationen untersucht. Zu diesen Zellen gehören sowohl glial restringierte Vorläuferzellen der Ratte und des Menschen sowie embryonale Stammzellen der Maus. Stellvertretend für eine adulte Stammzelle wird die Möglichkeit einer Transduktion der autolog verfügbaren mesenchymalen Stammzellen aus dem humanen Knochenmarkstroma untersucht. Für die Transduktion werden Vektoren mit verschiedenen Reportersequenzen eingesetzt, sodass nach der Infektion der Transduktionserfolg anhand der Transgenexpression ermittelt werden kann. Zu den Reportergenen gehört einerseits das grün fluoreszierende Protein (GFP), das LacZ ( $\beta$ -Galaktosidase) sowie als Markerenzym zur Darstellung der Syntheserate der transduzierten Zellen, die sezernierte alkalische Phosphatase des Menschen (SEAP). Unter Verwendung steigender infektiöser Partikel (10, 50 und 100 MOI) kann in den untersuchten Zellpopulationen eine dosisabhängige Transduktionsrate ermittelt werden. Dabei werden die höchsten Transduktionsraten in den glial restringierten neuralen Vorläuferzellen erzielt. Nach Infektion der neural differenzierten embryonalen Stammzellen zeigt sich ebenfalls die Tendenz einer bevorzugten Transduktion von glial differenzierten Zellen. Die Verwendung von adulten Stammzellen resultiert ebenfalls in Transduktionsraten von bis zu 85%. In einem weiteren Versuchsabschnitt werden glial restringierte neurale Vorläuferzellen nach Infektion mit dem adenoviralen Vektor in das Striatum adulter Ratten injiziert. Dieses Vorgehen soll die Möglichkeit eines ex-vivo gentherapeutischen Einsatzes in Verbindung mit astrozytären Zellen als mögliche Trägerzellen näher beleuchten. Die Befunde dieses Teilabschnittes zeigen, dass sich die transduzierten Zellen im Empfängergewebe integrieren und innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 6 Wochen nur in begrenztem Maße in das umliegende Gewebe migrieren. Dabei zeigen die Zellen die normalen Differenzierungscharakteristika entlang der glialen Zelllinie, wie das für Astrozyten in-vivo beschrieben wurde.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Möglichkeit der direkten Vektorinjektion in das zentrale Nervensystem. Dabei wird der adenovirale

Drittgenerationsvektor in verschiedene Hirnareale injiziert. Mittels immunhistochemischen Färbungen für NeuN und GFAP kann gezeigt werden, dass nach Injektion in das Striatum analog zur Situation in-vitro eine präferentielle Transduktion von Astrozyten erzielt wird. Innerhalb dieses Hirnkompartmentes kann eine Diffusion des Vektors bis zu einer Distanz von 1000 µm von der Injektionsstelle ermittelt werden. Nach Injektion der Vektorpartikel in das Corpus callosum kommt es zu einer Verteilung des Vektors innerhalb des gesamten Fasertraktes der weißen Substanz, einschließlich des kontralateralen Abschnittes. Mit diesen Befunden wird deutlich, dass die Verteilung des Vektors abhängig von der Struktur und Beschaffenheit des Empfängergewebes ist.

Wird der Vektor in den Liquorraum des Seitenventrikels injiziert, kann anschließend eine Transgenexpression (GFP oder LacZ) in den Ependymzellen des gesamten Ventrikels dargestellt werden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass sich der Vektor innerhalb des Liquor cerebrospinalis verteilt und als Folge eine generalisierte Transduktion der Ventrikelependymzellen erfolgt. Nach Anlegen einer permanenten Sonde in den Seitenventrikel kann kontinuierlich Liquor zur Analyse des Markerenzym SEAP entnommen werden. Mittels des luminometrischen Nachweisverfahrens kann nach Vektorinjektion über einen Zeitraum von bis zu 42 Tagen das Enzym SEAP im Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigen die Befunde, dass die Verwendung des adenoviralen Vektors zumindest unter experimentellen Bedingungen eine zukunftssträchtige Therapieoption für Erkrankungen des zentralen Nervensystems darstellt.