Aus der
Neurologischen Klinik / Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Vorstand: Prof. Dr. T. Brandt

und dem
Institut für Molekularbiologie und Tumorgenetik, GSF, München
Vorstand: Prof. Dr. G. Bornkamm

Optimierung eines Lipid-vermittelten Gentransfers für primäre, mesencephale Vorläuferneuronen *in vitro*

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefan Gramlich
aus
Immenstadt im Allgäu

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. T. Gasser
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Griese
	Priv. Doz. Dr. med. A. Eigler
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. M. Ueffing
	Dr. med. M. Bauer
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	17.07.2003

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG **5**

1.1 MORBUS PARKINSON 5
1.1.1 Epidemiologie 5
1.1.2 Pathologie 5
1.1.3 Ätiologie und Neurobiologie 6
1.1.4 Klinische Manifestation 7

1.2 MEDIKAMENTÖSE BEHANDLUNGSMÖGLICHKEITEN 8
1.2.1 L-DOPA 9
1.2.2 Dopamin Agonisten 10
1.2.3 Monoaminooxidase-B (MAO-B) Hemmer 10
1.2.4 Weitere pharmakologische Therapieansätze 11

1.3 NEUROTRANSPLANTATION ALS EXPERIMENTELLER THERAPIEANSATZ 11
1.3.1 Transplantation von fetalem neuronalem Gewebe 12
1.3.2 Transplantation von embryonalen Stamm- und Vorläuferzellen 14

1.4 GENTHERAPIE UND NEUROTRANSPLANTATION 15
1.4.1 Therapiestrategien und Zielgene 15
1.4.2 Viraler Gentransfer 16
1.4.3 Nicht-viraler Gentransfer 16
1.4.4 Genetische Modifikation von nicht-neuronalen Zellen 17
1.4.5 Genetische Modifikation von neuronalen Zellen 17

1.5 WEITERE INTERVENTIONELL-CHIRURGISCHE VERFAHREN 18

1.6 GRUNDLAGEN UND ZIELE DER ARBEIT 18

2 MATERIAL UND METHODEN 20

2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 20
2.1.1 Präparative Plasmid Isolierung mit Qiagen-Säulen (Qiagen) 20
2.1.2 Quantifizierung von DNA 21
2.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 21
2.1.4 Präparative DNA Isolierung mit LMP-Argarose 22
2.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten 22
2.1.6 Ligation 22
2.1.7 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmiden 23
2.1.8 Klonierung von pRep7-GFP (RSV-GFP) 23

2.2 ZELLLINIEN UND GEWEBEKULTUREN 25
2.2.1 Kultivierung von Zelllinien 25
2.2.2 Dissektion und Trituration von ventralem Mesencephalon der Ratte 25
2.2.3 Kultivierung der primären Einzelzellkulturen 27

2.3 NICHT-VIRALE TRANSFEKTION 28
2.3.1 Transfektion von LAN-5 Zellen mit Effectene (Qiagen) 28
2.3.2 Transfektion von ventralen Mesencephalon 28
2.3.2.1 Verwendung von Effectene (Qiagen) 28
2.3.2.2 Verwendung von Versuchslipiden (Qiagen) 29
2.3.3 Nachweis der Transgen-Expression 29

2.4 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG DER KULTUREN 30
2.4.1 Immunhistochemie 30
2.4.2 5-Brom-2´desoxy-Uridin (BrdU) Markierung 31

2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG 32

3 ERGEBNISSE **33**
3.1 PLASMIDVERGLEICH VON CMV-GFP MIT RSV-GFP IN LAN-5 ZELLEN 33
3.1.1 Transfektion differenzierter LAN-5 Zellen mit CMV-GFP und RSV-GFP 33
3.1.2 Transfektion proliferiender LAN-5 Zellen mit CMV-GFP und RSV-GFP 34

3.2 TRANSFEKTION VON VENTRALEM MESENCEPHALON 36
3.2.1 Transfektionsoptimierung mit Effectene (Qiagen) als Gentransfer-Reagenz 36
3.2.2 Transfektionsoptimierung mit Versuchslipiden (Qiagen) als Gentransfer-Reagenz 36

3.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES VENTRALEN MESENCEPHALONS DER RATTE UND DER TRANSFIZIERTEN ZELLEN 39

4 DISKUSSION **43**

4.1 FAKTOREN ZUR OPTIMIERUNG DES NICHT-VIRALEN GENTRANSFERS IN LAN-5 ZELLEN 43
4.1.1 Einfluss der Zellteilung auf die Transfektionseffizienz 44
4.1.2 Einfluss des Vektorkonstrukts auf die Transfektionseffizienz 45

4.2 TRANSFEKTION VON VENTRALEM MESENCEPHALON 46
4.2.1 Transfektion mit Effectene (Qiagen) 47
4.2.2 Transfektion mit Versuchslipiden (Qiagen) 48

4.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES VENTRALEN MESENCEPHALONS DER RATTE UND DER TRANSFIZIERTEN ZELLEN 49

4.4 PERSPEKTIVEN UND AUSBLICKE 49

5 ZUSAMMENFASSUNG **53**

6 LITERATUR **54**

7 ABKÜRZUNGEN **71**

8 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER **72**

9 DANKSAGUNG **73**

10 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG **74**

11 LEBENSLAUF **75**

1 EINLEITUNG

1.1 Morbus Parkinson

Vor über 180 Jahren beschrieb James Parkinson die bis heute nach ihm benannte Erkrankung (Parkinson, 1817). Morbus Parkinson (MP) ist eine neurodegenerative Erkrankung an der 1 bis 2 % der über 65-Jährigen in Europa leiden (de Rijek et al., 2000). Die klassische Trias klinischer Symptome besteht aus Rigor, Tremor und Akinese. Beschreibungen von Erkrankungen mit vergleichbaren Symptomen finden sich aber auch schon in alten indischen Schriften von 4500 - 1000 v. Chr. (Manyam et al., 1990), oder bei Leonardo da Vinci am Ende des 15. Jahrhunderts.

1.1.1 Epidemiologie

MP ist eine weltweit auftretende Erkrankung und gehört mit einer Prävalenz von 65 bis 200 pro 100 000 Personen zu den häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen (Chouza et al., 1996). Die beschriebenen geographischen Variationen der Prävalenz waren möglicherweise bedingt durch die Anwendung unterschiedlicher Diagnosekriterien und Studienbedingungen (Zhang et al., 1993; Anderson et al., 1998). Die Zahl der Parkinson-Patienten nimmt von 0,6 % der 65 bis 69-Jährigen mit fortschreitendem Alter kontinuierlich zu auf 2,6 % der 85 bis 89-Jährigen (de Rijk et al., 2000). Die Prävalenz des MP ist für beide Geschlechter identisch (de Rijk et al., 2000). Zwischen 5 bis 10 % der Patienten zeigen Symptome vor dem 40. Lebensjahr, was als „young-onset“ Parkinson bezeichnet wird.

1.1.2 Pathologie

Die Pathologie des MP ist gekennzeichnet durch einen spezifischen, aber dennoch heterogenen Nervenzelltod. Degenerative Prozesse finden sich in den dopaminergen Neuronen der Substantia Nigra pars compacta (SN), im cholinergen Nucleus basalis Meynert, im noradrenergen Locus coeruleus, im serotinergen Nucleus raphe, im autonomen Nervensystem, im Hypothalamus und im Striatum. Von entscheidender Bedeutung für das Auftreten der Krankheitssymptome ist vor allem die Degeneration der dopaminergen Neurone der SN (Forno, 1996) mit konsekutivem Dopaminmangel im Striatum. Zum Zeitpunkt der Erstmanifestation sind bereits 50 % der dopaminergen Neurone degeneriert (Fearnley et al., 1991), und die Menge an Dopamin ist im Striatum um 70 bis 80 % vermindert (Bernheimer et al., 1973). Der Beginn dieses degenerativen Prozesses wird aufgrund von PET und SPECT

Studien vier bis fünf Jahre vor Krankheitsbeginn vermutet (Brooks et al., 1998). Eine weitere typische, dennoch nicht pathognomonische Pathologie des MP ist der Nachweis von Lewy Körpern ("Lewy bodies"; LB). Diese eosinophilen, intracytoplasmatischen Einschlusskörper können in allen betroffenen Regionen des Cortex und Hirnstammes beobachtet werden, besonders im dorsalen vagalen Nukleus (Gai et al., 1995). Hauptbestandteil der LB ist das Protein α-synuclein (Spillantini et al., 1997), dessen genaue physiologische Funktion noch unbekannt ist.

1.1.3 Ätiologie und Neurobiologie

Für die Mehrzahl der sogenannten idiopathischen MP Erkrankungen ist bis heute keine eindeutige Ursache bekannt. Diskutiert wird unter anderem eine vermehrte Exposition dopaminerger Neurone gegenüber oxidativem Stress. Die Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale ("Reactive oxygen species"; ROS) ist ein normaler Vorgang im Zellmetabolismus, und für deren Detoxifizierung haben Zellen eine Reihe von Abwehrmechanismen entwickelt (Ebadi et al., 1996). In dopaminergen Neuronen findet man höhere Konzentrationen von ROS. Auslöser dafür könnten erhöhte Eisenmengen in der SN (Hirsch et al., 1998), die Entstehung toxischer Nebenprodukte im endogenen Dopaminstoffwechsel oder die Metabolisierung von Exotoxinen sein (Jenner et al., 1998; Schapira, 1997). Erniedrigte Konzentrationen an reduziertem Glutathion deuten aber auch auf eine verminderte Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies bei MP hin (Jenner et al., 1996). Inwieweit es sich dabei allerdings um sekundäre Prozesse handelt ist noch unklar.

Die Entdeckung des Neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP), das als Heroinverunreinigung bei Drogenabhängigen in den USA eine Parkinson-ähnliche Erkrankung verursachte, löste neue Diskussionen über die Ätiologie des MP aus. Da dieses Toxin selektiv dopaminerge Neurone im Menschen zerstört (Lanston et al., 1983), wurde eine durch Umwelttoxine bedingte Genese des MP vermutet. Einen Anhaltspunkt für diese These liefert eine aktuelle Studie, in der bei Ratten nach einer Langzeitexposition gegenüber niedrigen Dosen des Insektizids Rotenon eine Erkrankung festgestellt werden konnte, die klinisch und morphologisch viele Analogien mit MP besitzt (Betarbet et al., 2000). Zudem wird heute eine gestörte Mitochondrienfunktion diskutiert, da sowohl MPTP als auch Rotenon den Komplex I der Atmungskette selektiv hemmen (Mizuno et al., 1997; Betarbet et al., 2000). Die selektive Hemmung dieses Komplexes führt zu einem gestörten Elektronentransport entlang der Atmungskette, was zur Folge hat, dass vermehrt ROS

entstehen und weniger ATP gebildet wird. Experimente mit kultivierten Nervenzellen fanden auch eine durch Hemmung des Komplex I induzierte Apotose (Schapira, 1996). Die Untersuchung von Mitochondrien der SN bei Parkinson-Patienten zeigte ebenfalls eine verminderte Aktivität des Komplexes I der Atmungskette (Schapira et al., 1989). Das Vorkommen dieser Defizienz ist fast pathognomonisch für das idiopathische Parkinson-Syndrom. Allerdings ist die Hemmung des Komplexes nur gering ausgeprägt, so dass neben einer verminderten ATP-Produktion weitere Faktoren, wie z.B. ROS, für den Zelltod mitverantwortlich sein müssen (Mizuno et al., 1997, Betarbet et al., 2000).

Seit der Beschreibung verschiedener Familien mit hereditärem Parkinson-Syndrom, werden mehrere genetische Auslöser des MP diskutiert. Unter anderem konnten Mutationen im Gen für α-Synuclein auf Chromosom 4 (Polymeropoulus et al., 1997), dem Parkin-Gen auf Chromosom 6 (Kitada et al., 1998) oder ein Locus auf Chromosom 2 (Gasser et al., 1998) identifiziert werden. Allerdings ist der Anteil der Patienten mit genetisch bedingten Parkinson-Syndrom insgesamt nur gering. Dennoch könnte die Klärung der Auswirkungen der einzelnen Mutationen viel zum Verständnis der Pathogenese des MP beitragen.

Neurotrophe Faktoren sind von großer Bedeutung für das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen. Faktoren wie der "Glia Cell Line-derived Neurothrophic Factor" (GDNF) oder der "Brain-derived Neurothrophic Factor" (BDNF) haben sowohl protektive als auch regenerative Wirkungen auf dopaminerge Neurone (Beck et al., 1995; Gash et al., 1996). Diese Entdeckung gab Anlass zu Fragen, ob ein Mangel an neurotrophen Substanzen oder Defekte in deren Signaltransduktion relevant für die Entstehung von MP sein könnten. Bisherige Untersuchungen über die Genstruktur von neurotrophen Faktoren bei Patienten mit familiärem Parkinson Syndrom liefern dafür keine Hinweise.

1.1.4 Klinische Manifestation

Erste klinische Symptome sind zu Beginn der Parkinson´schen Erkrankung relativ unspezifisch und ein pathologisches Korrelat ist oft nur schwer nachweisbar. Es bietet sich ein breites Spektrum an Manifestationen wie Dysästhesien, Muskelschwäche oder –steifheit und Störungen der Feinmotorik. Depressive Symptome oder Störungen des Antriebs werden in der Anfangsphase ebenfalls beschrieben. Es kann aber auch zuerst nur ein Gewichtsverlust im Vordergrund stehen. Erst im späteren Krankheitsverlauf ist die klassische Trias mit Rigor, Tremor, Akinese nachweisbar, deren einzelne Ausprägung je nach Dominanztyp in

unterschiedlicher Stärke auftreten kann. Einzelne Kardinalsymptome können z.T. aber auch fehlen, wie z.B. der Ruhetremor in einem Viertel der Fälle (Hughes et al., 1993). Ein wichtiges diagnostisches Kriterium ist daher auch eine Linderung des Krankheitszeichen nach Gabe von L-DOPA (Lang et al., 1998). Im weiteren Therapieverlauf mit L-DOPA treten nach durchschnittlich 4 bis 5 Jahren Dyskinesien und Fluktuationen auf (Marsden, 1994). Nach 10-jähriger Behandlungsdauer weisen schließlich über 80 % der Patienten mindestens eine der beiden Störungen auf (Marsden, 1994). Als ein wichtiger Bestandteil späterer Krankheitsstadien wird auch die Demenz angesehen, die bei MP Patienten fast 7-mal häufiger auftritt als in Kontrollgruppen gleichen Alters (Mayeux et al., 1990). Zeichen dementieller Prozesse finden sich nach einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von 9 Jahren mit einer Prävalenz von 43 % (Hughes et al., 1993). Als weitere Spätsymptome konnten in einzelnen Fällen vegetative Störungen wie Blasen- und Mastdarmstörungen beobachtet werden (Marsden, 1994).

Bis heute wird die Diagnose MP vor allem klinisch gestellt. Da spezifische Krankheitssymptome in der Frühphase der Erkrankung fehlen sind Fehldiagnosen nicht selten. So konnte in Autopsie-Studien gezeigt werden, dass in 24 % der Fälle eine inkorrekte Diagnose vorlag (Hughes et al., 1993). Gleichzeitig bleiben aber auch viele Fälle unerkannt (de Rjik et al., 1997). Der Ausschluss differentialdiagnostischer Erkrankungen wie der Multisystematrophie oder der progressiven supranukleären Ophtalmoplegie kann sich daher als schwierig erweisen und erfordert eine kombinierte Bewertung des klinischen Verlaufs und den Ergebnissen moderner, bildgebender Verfahren wie PET und SPECT. Letztere sind in der Lage mittels Substanzen wie Fluorodopa oder β-CIT die Anzahl an dopaminergen Neuronen bzw. deren Stoffwechselaktivität zu quantifizieren. Diese Untersuchungen konnte auch eine Korrelation zwischen dem Ausprägungsgrad des klinischen Bilds und der Degeneration dopaminerger Neuronen nachweisen (zur Übersicht, Brücke et al. 2000).

1.2 Medikamentöse Behandlungsmöglichkeiten

Bis heute ist die medikamentöse Pharmakotherapie des MP vor allem eine symptomatische. Die Grundlage symptomatischer Behandlungsstrategien ist der Ersatz von Dopamin. Da Dopamin aber nur in geringem Maße die Blut-Hirn Schranke passiert, besteht eine therapeutische Option in der Gabe der Vorläufersubstanz L-DOPA. Am Zielort wird dann L-DOPA durch das Enzym Dopa-Decarboxylase zu Dopamin decarboxyliert. Weitere Therapiemöglichkeiten sind die Gabe von synthetischen, direkten Dopaminagonisten oder die

Gabe von Medikamenten zur Hemmung von Dopamin-abbauenden Enzymen wie der Monoaminooxidase B (MAO-B) oder der Catechol-O-Methyltransferase (COMT).
Die symptomatische Therapie kann eine ausgeprägte Manifestation des MP für mehrere Jahre verhindern. Später treten die Grenzen der Pharmakotherapie in Form von Langzeitkomplikationen in Erscheinung. Untersuchungen haben gezeigt, dass zumindest ein Teil dieser Komplikationen ursächlich mit der Art der medikamentösen Therapie zusammenhängt (Baas et al., 1996).

1.2.1 L-DOPA

Seit den ersten Versuchen vor über 30 Jahren ist die Gabe von L-DOPA bis heute die effektivste Therapie des MP (Cotzias et al., 1969). Zwar ist durch die rein symptomatische Therapie eine Progression der Erkrankung nicht zu verhindern, aber in einem Zeitraum von 5 bis 7 Jahren ist eine Reduktion aller wesentlichen Krankheitssymptome möglich. In der klinischen Anwendung wird L-DOPA üblicherweise mit peripheren Decarboxylasehemmern kombiniert, um das Auftreten peripherer, Dopamin-induzierter Nebenwirkungen zu vermindern. Verbleibende Nebenwirkungen wie Übelkeit oder orthostatische Hypotonie treten meist nur zu Beginn auf und können durch ein langsames Aufdosieren gemildert werden. Erst nach einer Therapiedauer von über 5 Jahren setzten bei mehr als 25 % der Patienten Spätkomplikationen in Form von Fluktuationen und Dyskinesien ein (Marsden, 1994). Die Länge des Zeitraumes bis zur Manifestation wird vor allem durch die applizierte Dosismenge und die Behandlungsdauer bestimmt (Poewe et al., 1986; Roos et al., 1990). Außer den Nebenwirkungen kann gleichzeitig eine reduzierte Wirkdauer des L-DOPAs bei gleichbleibender Dosis beobachtet werden. Therapeutische Probleme bereiten auch die Dyskinesien (Marsden, 1994), deren Ursache bisher nicht geklärt ist. Gegenstand aktueller Diskussionen ist der Zeitpunkt an dem mit einer L-DOPA Substitution begonnen werden sollte. Nach Meinung einiger Autoren könnte die vermehrte Bildung von ROS durch Reaktionen im Stoffwechsel von L-DOPA, die Degeneration dopaminerger Neurone in der SN beschleunigen (Olanow et al., 1992). Klinische und tierexperimentelle Studien konnten außerdem Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen einer L-DOPA-Therapie und dem Auftreten von Dyskinesien liefern (Montastruc et al., 1999; Pearce et al., 1995). Wegen diesen Ergebnissen fordern mehrere Autoren erst so spät wie möglich mit einer L-DOPA-Therapie in möglichst geringen Dosen zu beginnen (Marsden, 1994; Poewe et al., 1986). Andere Autoren hingegen bezweifeln ein toxisches Potential von L-DOPA (Agid et

al., 1998), und sprechen sich augrund der evidenten, klinischen Besserung durch L-DOPA-Gaben gegen einen verzögerten Therapiebeginn aus (Rajput et al., 1997; Lang et al., 1998).

1.2.2 Dopamin-Agonisten

Dopamin-Agonisten werden seit über 25 Jahren eingesetzt, um Krankheitssymptome bei Parkinson-Patienten zu reduzieren (Calne et al., 1974). Die Substanzen wirken über die direkte Stimulation striataler Dopaminrezeptoren. Allerdings ist im Gegensatz zur L-DOPA Therapie eine signifikante Symptomreduktion nur bei ca. 30 % der Patienten nachzuweisen (Lang et al., 1998). Darüber hinaus sind die zu Beginn auftretenden Nebenwirkungen, wie Übelkeit und orthostatische Hypotonie, noch stärker ausgeprägt als bei der Gabe von L-DOPA, was ein noch langsameres Aufdosieren erfordert. Bei bestehender Wirkung ist in den meisten Fällen eine medikamentöse Therapie ohne L-DOPA für 2 bis 5 Jahre möglich. Der Vorteil eines Therapiebeginns mit Dopamin-Agonisten ist die signifikante Reduktion an Fluktuationen und Dyskinesien als Spätkomplikationen (Lang et al., 1998). Selbst wenn nach weiterer Krankheitsprogression eine Kombinationstherapie von Dopamin-Agonisten mit L-DOPA notwendig wird, ist das Auftreten jener Komplikationen noch deutlich niedriger als bei einer L-DOPA Monotherapie (Hely et al., 1994). Als Ursache hierfür wird von manchen Autoren ein neuroprotektiver Effekt vermutet (Jenner, 1995), ähnlich dem des Selegilins (s. u.). Neue Hinweise für einen neuroprotektiven Effekt liefert eine aktuelle Studie, die bei Verwendung von Pramipexol eine verminderte Degeneration dopaminerger Neurone im Vergleich zu einer Levodopa-Therapie nachweisen konnte (The Parkinson Study Group, 2002). In anderen Publikationen wird die Meinung vertreten, dass im Vergleich zu Standard-L-DOPA Präparaten bei Dopamin-Agonisten eine physiologisch-tonische Wirkung vorliegt, mit einem langsameren Wirkungseintritt und einer längeren Wirkungsdauer (Chase et al., 1994). Anhaltspunkte hierfür lieferten klinische Versuche, die durch eine kontinuierliche Gabe dopaminerger Substanzen eine signifikante Reduktion der Fluktuationen und Dyskinesien registrierten (Sage et al., 1990; Horowski et al., 1995).

1.2.3 Monoaminooxidase B (MAO-B) Hemmer

Die Wirkungsweise von Selegilin beruht auf der Hemmung des Dopamin-abbauenden Enzyms Monoaminooxidase B. Da Selegilin im Vergleich zu L-DOPA nur eine Symptomverbesserung von 20 bis 30 % erzielt, wird es klinisch meist im Frühstadium der Parkinsonschen Erkrankung als Monotherapie gegeben oder mit L-DOPA kombiniert. Die Kombination bewirkt allerdings keine Reduktion der oben erwähnten Spätkomplikationen

einer L-DOPA Therapie (The Parkinson Study Group, 1996). Eine frühzeitig einsetzende Monotherapie mit Selegilin kann aber den Einsatz von L-DOPA um 9 bis 14 Monate hinauszögern (The Parkinson Group Study, 1993). Aufgrund dieses Effekts und den Ergebnissen weiterer Untersuchungen wurde die Frage nach einer neuroprotektiven Wirkung von Selegilin gestellt (Hely und Morris, 1996; Olanow et al., 1995). Eine mögliche Wirkungsweise könnte die Hemmung von Stoffwechselschritten im Dopaminabbau sein, die als Nebenprodukte ROS bilden (Fahn, 1992). Gegenstand von Diskussionen ist auch eine Studie in der eine Zunahme der Mortalität durch die Kombinationstherapie von Selegilin mit L-DOPA gefunden wurde (Lees, 1995). Andere Arbeiten konnte diese Beobachtung jedoch nicht bestätigen (Olanow et al., 1996; The Parkinson Study Group, 1998).

1.2.4 Weitere pharmakologische Therapieansätze

Der Einsatz von Amantadin und Anticholinergika beschränkt sich im wesentlichen auf die Anfangsphase atypischer Krankheitsverläufe. Eine Reduktion der Symptome tritt bei 20 % der Patienten ein. Vor allem bei älteren Patienten wird der Einsatz von Anticholinergika aber durch die damit verbundenen Nebenwirkungen limitiert, wie Störungen des Gedächtnisses, der Psyche oder vegetativer Funktionen.

Eine Reduktion von L-DOPA ist möglich durch den Einsatz von Catecholamin-O-Methyl-Transferase (COMT) Hemmern oder Amino-Acid-Decarboxylase (AACD) Hemmern, die beide den peripheren Abbau von L-DOPA hemmen (Waters et al., 1997). Die Reduktion des peripheren Abbaus führt zu gleichmäßigeren Plasmaspiegeln, was über eine gleichmäßigere Verfügbarkeit von L-DOPA im ZNS zu einem vermindertem Auftreten von Dyskinesien führt (Olanow et al., 2001).

1.3 Neurotransplantation als experimenteller Therapieansatz

Mit der Einführung von L-DOPA am Ende der sechziger Jahre fanden operative Therapieansätze des MP zunächst wenig Beachtung. Zur Wiederentdeckung neurochirurgischer Verfahren führten erst die Erkenntnisse über die Spätkomplikationen einer pharmakologischen Therapie, die Verbesserung operativer und stereotaktischer Techniken, kombiniert mit den Möglichkeiten moderner Bildgebung. Der Grundstein der Neurotransplantation bei MP wurden bereits Ende der siebziger Jahre gelegt: Im Tierversuch wurde fetales, neuronales Gewebe in die Striata von 6-Hydroxydopamin lädierten Ratten transplantiert (Perlow et al., 1979). 1988 wurde erstmals eine Transplantation mit humanem, fetalem Gewebe bei einem Parkinson Patienten erfolgreich durchgeführt (Madrazo et al.,

1988). Zu Beginn der neunziger Jahre wurde tierexperimentell auch die Transplantation nicht-neuronaler Zellen getestet (Fisher et al., 1991). Die Ergebnisse dieser Versuche waren jedoch nicht zufriedenstellend. Erste Xenotransplantationsversuche im Menschen, bei denen fetales, dopaminerges Gewebe des Schweins bei Parkinson Patienten verwenden sind unlängst durchgeführt worden. Untersuchungen an Autopsiematerial eines transplantierten Patienten zeigten wenige morphologisch intakte dopaminerge Neurone (Deacon et al., 1997). Die klinische Evaluation der transplantierten Patienten im Zeitverlauf zeigte jedoch lediglich geringe Effekte (Schumacher et al., 2000). Durch den optimierten Einsatz immunsuppressiver Medikamente, sowie möglicherweise durch den Einsatz von neurotrophen Faktoren, die das Überleben der dopaminergen Neurone in vivo verbessern muss dieses Verfahren noch weiter verbessert werden (Hagell und Brundin, 2001; Dunnett et al., 2001).

1.3.1 Transplantation von fetalem neuralem Gewebe

Die Transplantation von fetalem Gewebe basiert auf der Vorstellung, dass embryonale, dopaminerge Neurone nach einer Transplantation ins Striatum in der Lage sind die Funktion der degenerierten Neurone der SN zu übernehmen. In Transplantationsversuchen an Tieren mit pharmakologisch induziertem Parkinson konnte bestätigt werden, dass fetale, dopaminerge Neurone durch Bildung einer "biologischen Pumpe" eine Symptomreduktion bewirken (zur Übersicht, Lindvall, 1994; Olanow et al., 1996).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen waren Anlass für zahlreiche klinische Studien mit zum Teil unterschiedlichen Versuchbedingungen (zur Übersicht, Olanow et al., 1996). Dabei wurden zahlreiche Variablen ermittelt, die den Erfolg einer Transplantation beeinflussen können. In Bezug auf das zu transplantierende Gewebe sind vor allem dessen Alter bei der Präparation, dessen Lagerung und die zu transplantierende Menge von Bedeutung. Operativ-technische Fragen sind unter anderem der Ort der Implantation und der Einsatz immunsupprimierender Medikamente.

Als ideales Entwicklungsalter zur Gewinnung des Transplantates wird heute mesencephales Gewebe von Föten aus der sechsten bis neunten Schwangerschaftswoche *post conceptionem* angesehen (Olanow et al., 1996). Schätzungen über die zu transplantierende Menge an Gewebe gehen davon aus, dass von den beim gesunden Menschen vorhandenen 250.000 dopaminergen Neuronen ungefähr die Hälfte benötigt wird, um eine signifikante Reduktion der klinischen Beschwerden zu erzielen (Pakkenberg et al., 2001; Hagell und Brundin, 2001).

Da aber ohne weitere protektive Maßnahmen nur 1 bis 20 % der transplantierten Zellen überleben (Hagell und Brundin, 2001), ist Gewebe von ca. vier bis acht Föten pro Striatum notwendig (Brundin et al., 2000). Wegen des Mangels an Spendergewebe ist die Entwicklung von Kultursystemen zur Gewebelagerung von entscheidender Bedeutung, um mehr Flexibilität in Bezug auf den Zeitpunkte der Transplantation zu erhalten (Spenger et al., 1994).

Operativ-technisch wird als optimaler Ort zur Implantation des mesencephalen Gewebes beim Menschen das Putamen angesehen (Olanow et al., 1996). Die Gründe hierfür sind, dass wichtige, motorischen Funktionen des Striatums im Putamen lokalisiert sind (Holthoff-Detto et al., 1997), und dass in diesem Bereich des Striatums der größte Dopaminabfall bei Parkinson Patienten zu messen ist (Kish et al, 1988).
Der Einsatz immunsupprimierender Medikamente ist im Tierversuch bei allogenen Transplantationen nicht nötig, damit dopaminerge Neurone überleben und funktionelle Effekte erzielen (Björklund et al., 1981). Beim Menschen wird eine immunsuppressive Behandlung jedoch in aller Regel durchgeführt, ist jedoch noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion (Olanow et al., 1996).

Ein signifikanter Rückgang der Krankheitssymptomatik kann postoperativ frühestens ab der 11. Woche nachgewiesen werden, was zeitlich mit der funktionellen Integration des Transplantats im Empfängergehirn zusammenfällt (Clarke et al., 1988). Vor allem das Auftreten von Dyskinesien wird vermindert (Hagell et al, 1999). Bei Vergleich von mehreren Studien kann ohne Pharmakotherapie ("off-Phasen") durchschnittlich eine Reduktion der Kardinalsymptome von ca. 30 bis 40 % beobachtet werden. Gleichzeitig ist die Dauer der Symptomreduktion mit Pharmakotherapie ("on-Phasen") verlängert, und der Bedarf an Medikamenten vermindert (zur Übersicht, Hagell und Brundin, 2001). In der Mehrzahl der Fälle ist die Besserung des klinischen Bildes von langer Dauer. Dies wird bestätigt durch moderne, bildgebende Verfahren (Fluorodopa-PET), die noch sechs Jahre nach der Transplantation eine signifikante Steigerung der Dopamin-Aufnahme nachweisen (Wenning et al., 1997). In der ersten Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie über die Transplantation fetaler Neurone konnte eine Reduktion der Krankheitssymptomatik vor allem bei jüngeren Patienten und keine signifikanten Verbesserungen in der Negativ-Kontrollgruppe beobachtet werden (Freed et al., 2001). Anlass für Diskussionen ist das Auftreten von Dyskinesien bei 15 % der Patienten nach ein bis drei Jahren, was nach Freed und Kollegen auf eine zu hohe

Menge an freigesetztem Dopamin zurückzuführen sein könnte (Freed et al., 2001). Da aber die mittels PET gemessene Aufnahme von Fluorodopa im Vergleich zu anderen Studien nicht erhöht ist und in letzteren keine vermehrten Dyskinesien beobachtet werden konnten, werden hierfür Abweichungen von diagnostischen, operativen und zellkulturtechnischen Protokollen verantwortlich gemacht (Olanow et al., 2001; Hagell et al., 2001).

1.3.2 Transplantation von embryonalen Stamm- und Vorläuferzellen

Mit dem zelltherapeutischen Einsatz von embryonalen Stamm- und Vorläuferzellen bietet sich nicht nur die Möglichkeit Spendergewebe in ausreichendem Maße zu generieren, sondern auch den Bedarf an Föten deutlich zu reduzieren.

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind definiert durch ihr Potential sich durch Zellteilung unlimitiert selbst zu erneuern und Zellen aller drei Keimblätter zu bilden. Im Gegensatz dazu sind ZNS-Vorläuferzellen als Abkömmlinge embryonaler Stammzellen nur zu einer begrenzten Selbsterneuerung fähig, bevor sie zu Neuroblasten oder Glioblasten differenzieren (Gage et al., 2000).

In vitro Untersuchungen an Vorläuferzellen haben gezeigt, dass extrazelluläre Signale den Übergang von der undifferenzierten, mitotischen Phase des Zellzyklus in die differenzierte, postmitotische G_0-Phase in hohem Maße beeinflussen (Vicario-Abejón et al., 1995; McKay et al., 1997). In mehreren Untersuchungen konnte beobachtet werden, dass bFGF die undifferenzierte, mitotische Phase verlängert und eine Differenzierung verzögert (Bouvier et al., 1995; Fawcett J-W et al., 1995). In neueren Arbeiten kann die Phase einer undifferenzierten Expansion auf vier Monate ausgedehnt werden (Nishino et al., 2000).

Für eine Zelltherapie mit Stamm- oder Vorläuferzellen spielt aber, neben der Generierung ausreichender Zellmengen, die Möglichkeit zur gezielten Differenzierung der Zellen eine wichtige Rolle. Durch *in vivo* Transplantation von Stamm- und Vorläuferzellen in heterotope Hirnbereiche konnte im Tiermodel eine dem jeweiligen Implantationsort angepasste Differenzierung belegt werden (Brüstle et al., 1995; Fishell et al., 1995). In späteren Versuchen konnte auch unter kontrollierten *in vitro* Bedingungen eine faktorabhängige Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzellen gezeigt werden (Okabe et al., 1996; Johe et al., 1996). Neuere Protokolle sind in der Lage TH-positive Neurone aus ES-Zellen und Vorläuferzellen zu generieren (Lee et al., 2000; Studer et al., 1998). Im Rattenmodel konnte

durch deren Transplantation funktionelle Effekte erzielt werden (Studer et al., 1998). In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass die im Tiermodel angewendeten Protokolle auch bei humanen Vorläuferzellen zur Bildung TH-positiver Neurone führen, und deren Transplantation in Ratten ebenfalls zur Reduktion des Rotationsverhaltens führt (Sánchez-Pernaute et al., 2001).

Weitere Perspektiven für einen zelltherapeutischen Einsatz von Stammzellen haben sich durch die Entdeckung adulter Stammzellen im ZNS und die Generierung neuronaler Zellen aus nicht-neuronalen Stammzellen ergeben (Gage et al., 1995; Temple, 2001).

1.4 Gentherapie und Neurotransplantation

1.4.1 Therapiestrategien und Zielgene

Die zwei Hauptansatzpunkte bisheriger Versuche zum therapeutischen Gentransfer sind sowohl die symptomatische Besserung der Krankheitssymptome als auch eine verbesserte Neuroprotektion.

Die Grundlage symptomatischer Therapiestrategien ist die vermehrte Bereitstellung von Dopamin. In ersten Versuchen wurde in Zielzellen das Gen für Tyrosinhydroxylase eingebracht, das als Schlüsselenzym die Dopaminproduktion reguliert. In späteren Studien wurde beobachtet, dass für eine optimale Aktivität der Tyrosinhydroxylase die ausreichende Bereitstellung des Kofaktors Tetrahydrobiopterin durch die GTP-Cyclohydroxylase entscheidend ist. Für eine optimale Dopaminproduktion ist daher der Transfer beider Gene notwendig (zur Übersicht, Latchman et al., 2000).

Die Bedeutung oben beschriebener Gentherapieansätze hat mit der Entdeckung neurotropher Faktoren und der Entwicklung neuroprotektiver Therapiestrategien abgenommen. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl neuroprotektiver Faktoren isoliert, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* supportive Effekte für dopaminerge Neurone aufweisen (Lindsay, 1995). Der Einsatz neurotropher Faktoren in der Neurotransplantation verbessert unter anderem das Überleben und die Integration des Transplantats. Ein bedeutender Faktor für die Entwicklung und das Überleben dopaminerger Neurone ist GDNF (Lin et al., 1993). In einer aktuellen Studie wurde in Rhesusaffen mit pharmakologisch induziertem Parkinson ein für GDNF kodierender Vektor auf Lentivirus-Basis intrastriatal injiziert. Im Vergleich zur

Kontrollgruppe konnte dabei eine signifikante Reduktion der motorischen Symptome und eine verminderte Degeneration dopaminerger Neurone beobachtet werden (Kordower et al., 2000). Bei vorherigen Versuchen mit einer intraventrikulären Injektion von GDNF waren keine funktionellen Effekte nachweisbar (Kordower et al., 1999), was die Effektivität der Gentherapie als Applikationsform für neurotrophe Faktoren demonstriert.

1.4.2 Viraler Gentransfer

Eine Möglichkeit zur genetischen Modifikation von Zellen besteht in der Verwendung von viralen Vektoren (Transduktion). Gentransfer in neuronales Gewebe ist möglich durch eine direkte Injektion der Viren in das Empfängergehirn (*in vivo* Gentransfer), oder durch Transduktion von *in vitro* Kulturen, die später transplantiert werden (*ex vivo* Gentransfer). Die am häufigsten eingesetzten Vektoren basieren auf folgenden Viren: (a) HSV1, (b) AAV, (c) Adenoviren und (d) Retroviren. Jedes dieser Vektorsysteme besitzt spezifische Vor- und Nachteile (zur Übersicht, Bauer et al., 1999). In zahlreichen Versuchen zeigten virale Vektoren einen effizienten Gentransfer in neuronale Zellen und eine stabile Transgen-Expression (Choi-Lundberg et al., 1997; Naldini et al., 1996). Der klinische Einsatz viraler Gentransfersysteme wird aber eingeschränkt durch das Auftreten von Reaktionen der Immunabwehr auf virale Antigene und Bedenken über die Möglichkeit von Rückmutationen der eingesetzten Vektoren zu einem aberranten Virus mit erhöhtem pathogenen Potential (zur Übersicht, Bauer et al., 1999).

1.4.3 Nicht-viraler Gentransfer

Die Vorteile des nicht-viralen Gentransfers (Transfektion) bestehen in der leichteren Generierung und Anwendung von Plasmid-Konstrukten und dem Vermeiden der oben genannten Risiken viraler Vektorsysteme. Etablierte Verfahren der nicht-viralen Modifikation von Zellen sind die Elektroporation, die Kalzium-Phosphat-Methode und synthetische Transfektionsreagenzien auf der Basis von kationischen Lipiden und Proteinen (Felgner und Rhodes, 1991). Auf die letzte der oben genannten Methoden soll hier eingehender beschrieben werden. Gemeinsam ist allen Verfahren die im Vergleich zu viralen Vektorsystemen kürzere Dauer der Transgen-Expression und die niedrigere Transfektionseffizienz. Bei der Transfektion von primärem Gewebe wird die niedrige Transfektionsrate nicht-viraler Verfahren mit Effizienzen von unter einem Prozent der exponierten Zellen besonders deutlich. Erst mit der Entwicklungen neuer Lipidkomplexe werden auch in diesem Bereich zunehmend bessere Ergebnisse erzielt.

Die Transfektionsreagenzien auf Lipidbasis lassen sich in die Gruppe der liposomalen und der nicht-liposomalen Vehikel unterteilen. Die kationischen Lipide der liposomalen Vehikel sind im allgemeinen aus drei Strukturen aufgebaut: (a) einem hydrophoben Anteil, (b) einem polaren Anteil und (c) einem Verbindungselement, das zwischen der hydrophoben und der polaren Gruppe geschaltet ist (zur Übersicht, Chesnoy et al., 2000). Als hydrophober Anteil werden am häufigsten neutrale Lipide wie DOPE {dioleoyl phosphatidylethanolamin} oder Cholesterin eingesetzt, und die polykationischen Lipide DOPSA {2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoacetat} oder DOTMA {N[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium} als polarer Anteil. Die einzelnen Komponenten liegen bei kommerziellen Transfektionsreagenzien, wie z.B. Lipofectamine (GibcoBRL, Karlsruhe), in definierten Mischungsverhältnissen vor. Hingegen ist die Zusammensetzung der neu entwickelten nicht-liposomalen Reagenzien, wie Effectene (Qiagen, Hilden), meist nur der Herstellerfirma bekannt.

1.4.4 Genetische Modifikation von nicht-neuronalen Zellen

Zellen nicht-neuronalen Ursprungs müssen genetisch modifiziert werden, um von therapeutischen Nutzen in der Behandlung des MP zu sein. Funktionelle Transgene wurden in immortalisierte Zell-Linien durch virale und nicht-virale Verfahren eingebracht, und anschließend wurden die modifizierten Zellen im Tiermodel transplantiert (Fred et al., 1990; Horellou et al., 1989). Dabei wurden meistens Gene der oben genannten symptomatischen Therapiestrategien eingesetzt. Der anfängliche Erfolg in der symptomatischen Reduktion des Rotationsverhaltens wurde jedoch relativiert durch das Auftreten von Tumoren und immunologischer Abwehrreaktionen. Als Alternative wurde daher primäres Gewebe, wie Fibroblasten oder Myoblasten, genetisch manipuliert (Ray et al., 1992; Partridge et al., 1995). Da diese Zellen jedoch nicht in der Lage sind zur funktionellen, synaptischen Integration in das Empfängergehirn, und Dopamin nicht reguliert freisetzen können, wird deren Bedeutung für zukünftige Zelltherapien heute als gering angesehen (McKay, 1997).

1.4.5 Genetische Modifikation von neuronalen Zellen

Bis jetzt sind für den Gentransfer in neuronales Gewebe vor allem virale Gentransfermethoden entwickelt und erfolgreich angewendet worden. (Choi-Lundberg et al., 1997; Kordower et al., 2000). Aufgrund der oben beschrieben Sicherheitsbedenken gegenüber viralen Vektorsystemen wäre die Anwendung des nicht-viralen Gentransfers zu favorisieren. In ersten Versuchen wurde embryonales neuronales Gewebe von Xenopus und Ratte unter

Verwendung liposomaler Transfektionsreagenzien modifiziert (Holt et al., 1990; Jiao et al., 1992). Durch den Einsatz der neueren nicht-liposomalen Substanzen scheinen sich noch bessere Ergebnisse erzielen zu lassen. In aktuellen Versuchen konnten Neurosphären aus Vorläuferzellen der Ratte mit einem für GDNF kodierenden Plasmid unter Verwendung von Effectene transfiziert werden (Bauer et al., 2000). Nach deren Transplantation wurde im Vergleich zu nicht-transfizierten Kontrollen sowohl ein verbessertes Überleben des Transplantates, als auch eine schnellere Reduktion des Rotationsverhaltens der Tiere beobachtet (Bauer et al., 2000). Neueste Studien berichten auch über eine erfolgreiche Transfektion von Neurosphären aus humanen Vorläuferzellen (Bauer et al., 2001)

1.5 Weitere interventionell-chirurgische Verfahren

Funktionell-neurochirurgische Techniken werden in den letzten Jahren wieder vermehrt eingesetzt, aufgrund der verbesserten Erkenntnisse über die funktionellen Auswirkungen der pathophysiologischen Prozesse des MP und der technischen Weiterentwickelung bildgebender Verfahren und stereotaktischer Methoden. Ziel dieser Verfahren ist die Wiederherstellung der physiologischen Erregungsmuster in den Basalganglien durch Läsionssetzung oder Hochfrequenzstimulation („Deep Brain Stimulation") (DBS). Als potentielle Zielorte hierfür werden folgende Hirnnervenkerne angesehen: (a) der „ventral intermediate nucleus of thalamus“ (VIM), (b) der Globus pallidus internus (Gpi) oder (c) der Nucleus subthalamicus (STN). Die Wahl der Zielstruktur wird von der jeweiligen klinischen Symptomatik bestimmt. Die Läsion oder Stimulation des VIM führt in erster Linie zu einer Reduktion der Tremor-induzierten Beschwerden, während durch Ausschaltung des Gpi oder STN hauptsächlich eine Verminderung der Bradykinese und der Dyskinesien beobachtet werden kann (zur Übersicht, Olanow et al., 2001). Heute wird die DBS gegenüber den ablativen Verfahren bevorzugt, da bei mindestens gleicher, therapeutischer Effektivität das Risiko für bleibende, neurologische Ausfälle bei der DBS deutlich geringer ist.

1.6 Grundlagen und Ziele der Arbeit

Die vorgestellte Arbeit entstand im Rahmen der Kooperation zwischen den Labors von PD Dr. med. Gasser (Leiter des Neurogenetischen Labors der Neurologischen Klinik, Klinikum Großhadern) und Dr. rer. nat. M. Ueffing (Laborleiter und stellv. Leiter des Instituts für Klinische Molekularbiologie, GSF München). Ein Schwerpunkt dieser Kooperation war in den letzten Jahren die Etablierung und Optimierung des nicht-viraler Gentransfers in mesencephales Gewebe und der Einsatz neurotropher Faktoren zur Verbesserung der

Neurotransplantation bei Parkinson Patienten. So konnte durch Verfahren des nicht-viralen Gentransfers die Wirksamkeit von zelltherapeutischen Verfahren im Tierversuch verbessert werden (Bauer et al., 2000). Die Kultivierung des primären Gewebes als Neurosphären war die technische Grundlage dieser Versuche. Da die Zellen innerhalb der Neurosphäre einer Transfektion kaum zugänglich sind, sollte ein Kultursystem mit dissoziierten, neuronalen Vorläuferzellen der Ratte etabliert werden, basierend auf der Arbeit von Studer und Kollegen (Studer et al., 1998). Des weiteren sollten Protokolle zur nicht-virale Transfektion dieser Zellen erstellt werden.

Die Arbeit setzte sich aus folgenden Abschnitten zusammen: (a) Klonierung eines für GFP kodierenden eukaryotischen Expressionsvektors (pRep7-GFP), (b) Testung des Vektors durch Transfektion von LAN-5 Neuroblastomzellen und durch Vergleich mit bekannten Vektoren, (c) Etablierung einer *in vitro* Kultur dissoziierter, neuronaler Vorläuferzellen der Ratte, (d) Optimierung des nicht-viralen Gentransfers für primäres VM-Gewebe, (e) immunhistochemische Charakterisierung des VM-Gewebes und der transfizierten Zellen.

2 MATERIAL UND METHODEN

Für die Durchführung der Tierversuche, die Verwendung von fetalem Gewebe der Ratte und dessen genetische Modifikation, lagen die Genehmigungen der Tierschutzkommission und der Ethikkommission der LMU München vor. Alle Versuche mit primärem Gewebe wurden am Institut für Klinische Molekularbiologie, GSF München, durchgeführt. Bezugsquellen sind in Klammern angegeben. Bei fehlender Angabe, handelt es sich um ein Produkt der Firma Sigma Aldrich Chemie GMBH, Deisenhofen, mit Reinheitsgrad p. A..

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Präparative Plasmid Isolierung mit Qiagen-Säulen (Qiagen)

Mit 3 ml einer Suspension eines Klones von *E. coli* Bakterien (DH 10B, GibcoBRL, Karlsruhe), die mit dem gewünschten Plasmid transformiert waren, wurden 200 ml LB-Medium unter Zusatz von Ampicillin (100 µg / ml) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (225 rpm). Die Bakteriensuspension wurde dann mit 6000 g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand sofort verworfen und das Sediment in 10 ml P1-Puffer (Qiagen, Hilden) resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2-Puffer (Qiagen, Hilden) und vorsichtigem Mischen, folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurden 10 ml von kaltem P3-Puffer (Qiagen, Hilden) zu der Suspension gegeben, sofort vorsichtig geschüttelt, und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Denaturierte Proteine und chromosomale Bakterien-DNA wurden durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 20 000 g (4 °C) von der im Überstand gelösten Plasmid-DNA abgetrennt. Nach Überführung des Überstandes in saubere Zentrifugenröhrchen wurde die Zentrifugation wiederholt (15 min., 20 000 g, 4 °C). Währenddessen wurde eine "Qiagen-tip 500"-Säule (Qiagen, Hilden) mit 10 ml QBT-Puffer (Qiagen, Hilden) äquilibriert. Dann wurde der klare Überstand auf die Säule gegeben. Als die Flüssigkeit durch die Säule geflossen war, wurde letztere zweimal mit je 30 ml QC-Puffer (Qiagen, Hilden) gewaschen. Die superhelikale Plasmid-DNA wurde mit 15 ml QF-Puffer (Qiagen, Hilden) eluiert und mit 0,7-fachem Volumen (10,5 ml) Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Das Präzipitat wurde mit über 10.000 g (10 min., 4 °C) abzentrifugiert und mit 5 ml eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen, für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in 300 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die Ausbeute an hochreiner DNA/Liter Medium lag bei dieser Methode bei über 2,5 mg

2.1.2 Quantifizierung von DNA

Die DNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde mit einem Spektralphotometer (Kontron) über die UV-Absorption der Nukleinsäuren bestimmt. Die Extinktion von 1 ml Lösung wurde in einer 2 mm Quarzküvette über einen Bereich der Wellenlänge von 320 - 220 nm gemessen. Die Verdünnung der DNA-Lösung wurde dabei so gewählt, dass die Werte im Bereich der größten Messgenauigkeit (zwischen 0,1 und 1) lagen (Verdünnung von 1 : 50). Nach dem Lambert Beer'schen Gesetz entspricht eine bei 260 nm gemessenen Extinktion von l einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml. Anhand des Quotienten der bei 260 nm und bei 280 nm gemessenen Extinktion konnte der Reinheitsgrad der DNA in Bezug auf Proteinverunreinigungen bestimmt werden. Der E260/E280 Wert sollte für reine DNA zwischen 1,8 und 2 liegen. Für die Ligationen wurden die relativen DNA-Mengen von Fragment und Vektor über den Vergleich der Bandenstärke bzw. Farbintensität der Banden im mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel abgeschätzt. Außerdem konnte die Bandenintensität der DNA-Probe auch mit der Intensität der Banden eines DNA-Markers verglichen werden. Aus der bekannten DNA-Konzentration des Markers lässt sich die DNA-Menge jeder Markerbande berechnen und durch Intensitätsvergleich die aufgetragene DNA-Menge der DNA-Probe und damit deren Konzentration bestimmen.

2.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II sequenzspezifisch gespalten. Der Restriktionsverdau wurde unter den jeweils vom Hersteller (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen durchgeführt. Falls eine DNA-Probe mit mehreren Enzymen verdaut werden sollte, wurde nach Möglichkeit ein Puffer gewählt, in dem alle Enzyme eine gemäß der Herstellerangaben möglichst hohe Aktivität besaßen. War dies nicht möglich, so wurden die Reaktionsbedingungen für die einzelnen Enzyme der aufeinander folgenden Spaltungsreaktionen angepasst. Dabei wurde so verfahren, dass die Pufferbedingungen durch Zugabe von NaCl und $MgCl_2$ von niedrigen zu hohen Salzkonzentrationen aufsteigend verändert wurden. Pro µg zu schneidender DNA wurden l bis 3 Einheiten Enzym in 20 bis 30 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Eine Enzymeinheit ist als jene Menge an Enzym definiert, die l µg λ-DNA in einer Stunde vollständig verdaut. Die Inkubation erfolgte meistens für 2 Stunden oder über Nacht. Die Vollständigkeit des enzymatischen Verdaus wurde jeweils anhand einer gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente kontrolliert.

2.1.4 Präparative DNA Isolierung mit LMP-Agarose

Die DNA-Fragmente wurden in 0,8 % LMP-Agarose (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) in 1x TAE Puffer bei 80 V aufgetrennt und die zu isolierenden Banden mit einem scharfen Skalpell aus dem Gel herausgetrennt. In der Regel wurden 50 µl Lösung A (1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0) zu dem Gelstück zugegeben und mit H_2O auf ein Endvolumen von 500 µl aufgefüllt. Das Gel wurde bei 68°C für etwa 10 min geschmolzen und anschließend zweimal mit 0,7 Volumen Phenol extrahiert (vortexen, 3 min bei mehr als 10,000 g zentrifugieren, die obere wässrige Phase nochmals phenolisieren). Anschließend wurde die wässrige Phase mit zweieinhalbfachem Volumen 1-Butanol zwei- bis dreimal nachextrahiert, um Phenol- und Ethidiumbromidreste zu entfernen und das Endvolumen für die anschließende Ethanol-Fällung auf das eingangs zugegebene Volumen der Lösung A einstellen zu können. Nach Zugabe von zweieinhalbfachem Volumen 100 % EtOH wurde nochmals für 10 min bei mehr als 10,000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das weiße, zerbrechliche Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE gelöst.

2.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei einer Ligation eine Religierung des Vektors ohne Einbau des gewünschten DNA-Fragments zu verhindern, wurde die durch restriktionsendonukleolytischen Verdau linearisierte Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) behandelt. Die aus Kälberdarm isolierte alkalische Phosphatase (CIP, "calf intestine phosphatase") entfernt hydrolytisch die Phosphatgruppen der 5'-DNA-Enden. Die DNA wurde in einem Endvolumen von 50 µl in CIP-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim) mit 2 Enzymeinheiten für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM EDTA und 10 minütiger Inkubation bei 70 °C beendet. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden mit präparativer Gelelektrophorese isoliert.

2.1.6 Ligation

Bei der Ligation wurden ein linearisierter Vektor mit einem Passagier-DNA-Fragment verknüpft. Das molare Verhältnis von Passagier-DNA ("insert") zu Vektor-DNA betrug 3 : l. Die Menge der insgesamt eingesetzten DNA lag bei Ligationen mit stumpfendiger DNA ("blunt end") bei 0,1 - l µg, bei Ligationen mit DNA mit kohäsiven Enden bei 0,01 - 0,1 µg. Die Reaktion fand in 20 µl Gesamtvolumen in DNA-Ligase-Puffer (New England Biolabs GmbH, Schwalbach) nach Zugabe von Vektor- und Insert-DNA und l Einheit T4 DNA-Ligase (New England Biolabs GmbH, Schwalbach) während einer 2 stündigen Inkubation bei

16 °C statt. Um die Rate der Rückligationen des Vektors zu bestimmen, wurde in einem Kontrollansatz der linearisierte, dephosphorylierte Vektor in Abwesenheit der Passagier-DNA ligiert. Der Ligationsansatz wurde danach direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien benutzt.

2.1.7 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmiden

Vektor-DNA wurde in kompetente *E. coli* (DH 10b) Bakterien eingeschleust und in ihnen vermehrt. Dafür wurden die kompetenten Bakterien nach einem modifizierten Protokoll nach Hanahan (1985) transformiert. Es wurden jeweils 100 µl Bakterien und 7 µl Ligationsansatz oder l-50 ng Plasmid-DNA in einem vorgekühlten Polypropylen-Reagenzröhrchen gemischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert und für 60 Sekunden bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurden 900 µl SOC-Medium zu den Bakterien gegeben und diese, wie oben beschrieben, bei 37 °C für l Stunde inkubiert und anschließend auf LB/ Ampicillin-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Effizienz der Transformation wurde anhand eines Transformationsansatzes mit ungeschnittener DNA des Vektors pUC19 und Auszählung der gewachsenen Bakterienkolonien bestimmt. In einem zweiten Kontrollansatz wurde endonukleolytisch geschnittene, dephosphorylierte, aber nicht ligierte Vektor-DNA transformiert, um anhand der Zahl antibiotikaresistenter Bakterienkolonien die Menge an restlicher, eventuell nicht gespaltener DNA zu erkennen.

2.1.8 Klonierung von pRep7-GFP (RSV-GFP)

Die Ausgangsvektoren der Klonierung waren pBluescriptII+ (pBSKII+) (Stratagene, La Jolla, USA), ein konstitutionell GFP-exprimierender Vektor und pRep7 (Invitrogen, Karlsruhe). pRep7 enthält einen Rous-Sarcoma-Virus-Promotor (RSV-Promotor) und kodiert zusätzlich für den Replikationsursprung von EBV (oriP), sowie für Sequenzen eines 3' trunkierten „EBV Nuclear Antigen 1" (EBNA1) **(Abb.1)**. EBNA1 ist ein multifunktionales virales Protein des Epstein Barr Virus, das unter noch nicht vollständig geklärten Bedingungen und im Zusammenspiel mit anderen zellulären Faktoren für eine Zell-Zyklus-unabhängige Replikation des Plasmids als Episom und für dessen Persistenz im Zellnukleus sorgt (Ambinder et al., 1991; Yates et al., 1985).

Das Ziel der Klonierung war die Umklonierung des für GFP kodierenden Genes aus pBSKII+ in pRep7. Zuerst wurde der Vektor pRep7 mit dem Restriktionsenzym Hind III (MBI

Fermentas, St. Leon-Rot) und dem R+ Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) linearisiert und im Anschluss daran dephosphoriliert, um die Chance einer Religierung des Vektors ohne die Passagier-DNA zu minimieren. Zur Gewinnung des GFP-Gens wurde pBSKII+ ebenfalls mit Hind III und dem R+ Puffer inkubiert. Nach Auftrennung im LMP-Agarosegel wurden pRep7 und GFP unter UV-Licht isoliert und danach die gewonnene DNA gereinigt. Unter Verwendung von T4 Ligase wurden Vektor und Passagier-DNA für 2 Stunden ligiert. Als nächstes wurden die Bakterien mit den Ligationsprodukten transformiert und die Bakterien auf LB/ Ampicillin Platten selektioniert. Abstriche der gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag in Kulturröhrchen mit 4 ml LB/Ampicillin Medium angesetzt und nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die DNA isoliert. Zur Überprüfung der korrekten Orientierung der Passagier-DNA wurde ein Probeverdau mit Xho I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) und R+ Puffer durchgeführt.

Abbildung 1

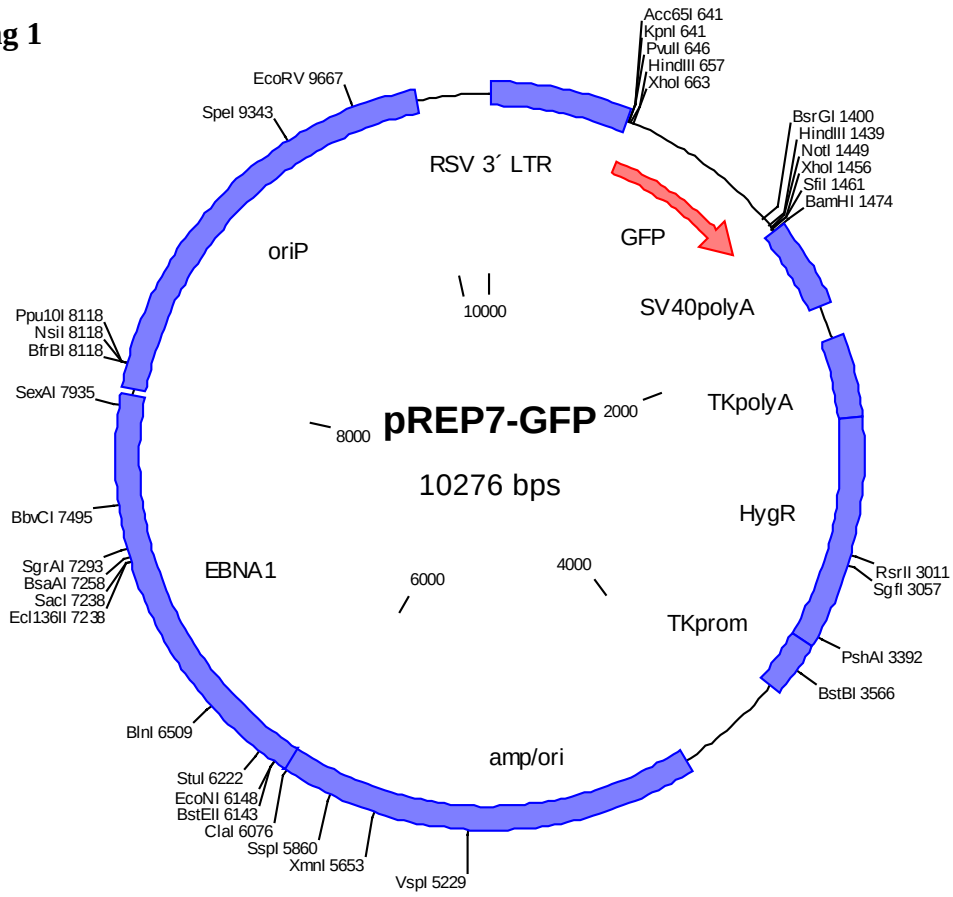


Abb. 1. pRep7-GFP (RSV-GFP) Vektorkonstrukt. Das für GFP kodierende Gen (rot) wurde über die Hind III-Schnittsequenz der Insertionsstelle von pRep7 (Invitrogen) in den Vektor integriert.

Erläuterung der Abkürzungen der Vektorkarte:

RSV 3´ LTR : Rous sarcoma Virus Promotor

SV 40 Poly A: Simian virus 40 Poly-Adenylierungs Signal

TK 40 Poly A: Thymidinkinase 40 Poly-Adenylierungs Signal

HygR:	Hygromycin Resistenz
TKprom:	TK Promotor
Amp/Ori:	Ampicillin / *origin of replication*
EBNA1:	Epstein Barr Virus Nuclear Antigen 1 trunkiert
OriP:	Replikationsursprung von EBV

2.2 Zelllinien und Gewebekulturen

Die transformierte, humane Neuroblastomzelllinie LAN-5 (Sidell et. al, 1984) wurde zur *in vitro* Testung aller Vektorkonstrukte verwendet. Ventrales Mesencephalon (VM) wurde aus Embryonen der Ratte (Sprague-Dawley, Biotechnology & Animal Breeding Division, Sulzfeld) am Embryonaltag 13 (E13) dissektiert und anschließend kultiviert. Alle Arbeiten mit der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung von sterilen Materialien, Geräten, Lösungen und Medien. Die Zellen wurden im Brutschrank (Heraeus) bei 37 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und unter Anreicherung der Raumluft mit 5 % CO_2 kultiviert.

2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die adhärenten LAN-5 Zellen wurden in 10 cm Zellkulturschalen (Nunc, Rochester, USA) mit 10 ml Medium bei 70-prozentiger Konfluenz kultiviert. Als Medium wurde DMEM-Medium (GibcoBRL, Karlsruhe) supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) (GibcoBRL, Karlsruhe) verwendet. Alle drei bis vier Tage wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt oder die Zellen bei etwa 70 % Konfluenz wie folgt vereinzelt. Aus der Brutschale wurde das Kulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette und einer Pumpe abgesaugt und 5 ml PBS-Puffer hineingegeben. Der Puffer wurde durch horizontales Verschieben der Schale gleichmäßig verteilt und wieder abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/ EDTA-Lösung (GibcoBRL, Karlsruhe) benetzt. Nach ca. drei Minuten lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturschale ab. Noch festsitzende Zellen wurden durch vorsichtiges Klopfen des Kulturgefäßes gegen die Werkbank vom Boden der Schale gelöst. Anschließend wurden 2 ml Kulturmedium hinzugegeben. Nach wiederholtem auf und ab pipettieren erhielt man eine gleichmäßige Zellsuspension, von der jeweils zwei bis drei Tropfen in eine neue Zellkulturschale gegeben wurden.

2.2.2 Dissektion und Trituration von ventralem Mesencephalon der Ratte

Trächtige Ratten wurden 13 Tage nach Konzeption (E13) mit 40 mg Nembutal (Roche, Mannheim) pro kg Körpergewicht anästhesiert und anschließend durch zervikale Dislokation

getötet. Das Peritoneum des Muttertiers wurde durch einen Medianschnitt eröffnet und die Embryonen aus den Uterushörnern entfernt und in steriles GBSS (GibcoBRL, Karlsruhe) mit 10% Glucose gegeben. Die Embryonen wurden bis zur Dissektion bei 4°C in der GBSS-Glucose Lösung gelagert. Zur weiteren Präparation wurden die Embryo in eine mit DMEM (GibcoBRL, Karlsruhe) gefüllte Petrischale überführt. Die Präparation erfolgte anschließend unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-flow Zellkultureinrichtung und unter Verwendung eines binokularen Mikroskops (Wild/Leitz M32).

Zwei Drittel des Gehirns wurden von frontal aus knapp über den Augen mit der Pinzette abgetrennt. Die abstehenden Gehirnhäute wurden dann von kaudal nach rostral hin abgezogen. Anschließend erfolgt die Abtrennung des Hirnstammes möglichst weit rostral. Die Gehirnhäute wurden vom Gehirnstamm vorsichtig entfernt. Zur Isolierung des VMs wurden zuerst die kaudalen Anteile des Mesencephalons abgetrennt und anschließend die dorsalen Anteile entfernt. Das VM wurde dann rostral durch einen sektorförmigen Schnitt von dem restlichen Gehirn entfernt (Dunnett und Björklund, 1992). Das gesamte VM eines Ratten-Embryos wurde anschließend in vier VM-Stücke geteilt und in 15 ml Kulturröhrchen (Falcon, Bedford, USA) überführt. Der Zeitraum zwischen Entnahme der Feten und Kultivierung der einzelnen VM-Stücke nahm im Schnitt 3 Stunden in Anspruch.

Vor der Trituration der VM-Stücke wurde das Kulturröhrchen zweimal mit 15 ml DMEM-Medium (GibcoBRL, Karlsruhe) gefüllt, welches nach Absetzen der Stücke abgesaugt wurde. Beim dritten Mal wurde es nur noch mit 1 ml DMEM-Medium aufgefüllt. Danach wurde das VM-Gewebe 10-mal vorsichtig mit einer feuerpolierten Pasteur-Pipette mit 80 % Lumen trituriert und anschließend dem Kulturöhrchen 5 ml DMEM-Medium hinzugegeben. Nach Absetzten der restlichen, größeren VM-Stücke wurden 5 ml Überstand in ein zweites Kulturröhrchen überführt. Das verbliebene Medium (1 ml) wurde dann nochmals mit einer feuerpolierten Pasteur-Pipette mit 50 % Lumen 10-mal trituriert, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Nach Zugabe von 4 ml DMEM-Medium in das letzte Röhrchen, wurden die beiden Kulturröhrchen für 5 Minuten mit 200 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die abzentrifugierten Zellen in jeweils 0,5 ml DMEM-Medium resuspendiert und in ein gemeinsames Kulturröhrchen überführt **(Abb. 2)**.

Abbildung 2

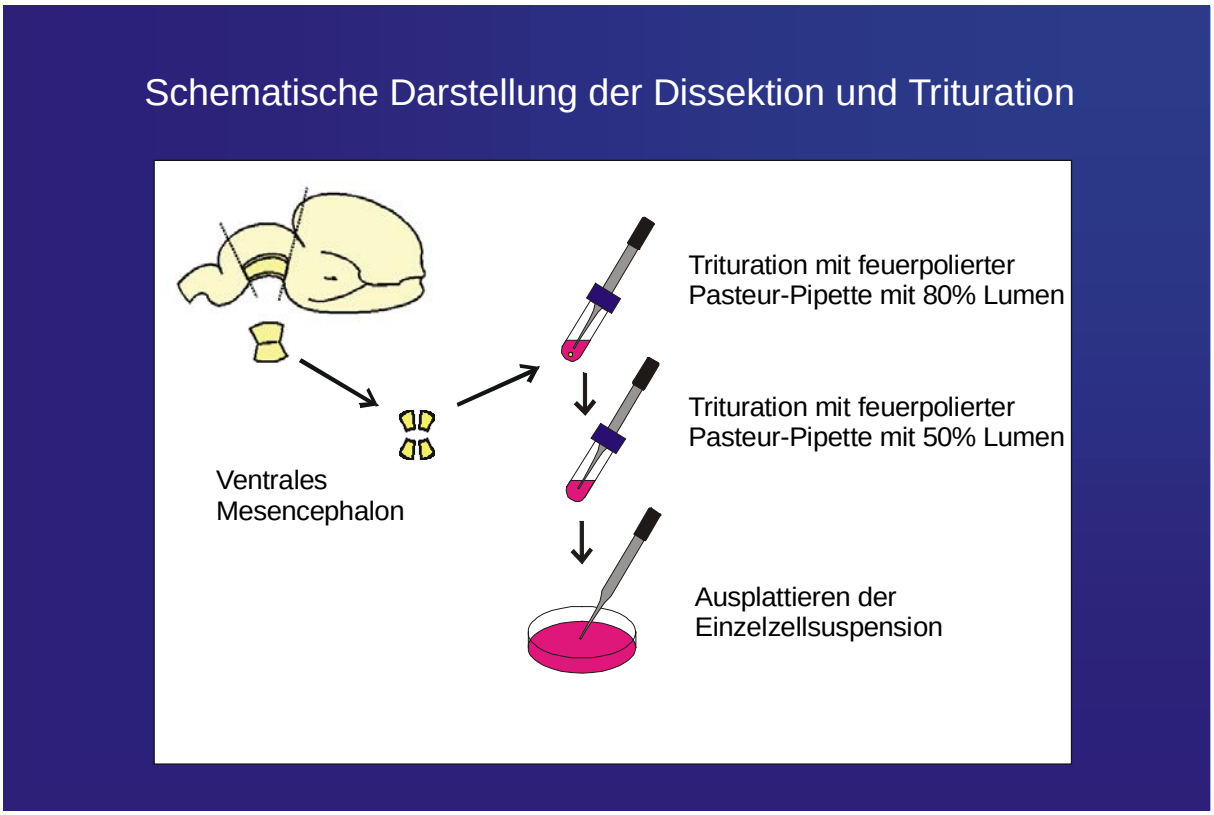


Abb. 2. Schematische Darstellung der Dissektion des VM-Gewebes mit anschließender mechanischer Trituration und Ausplattieren der Einzelzellsuspension

2.2.3 Kultivierung der primären Einzelzellkulturen

Nach Bestimmung der Zelldichte, wurde die Zellsuspension mit einer Dichte von 15.000 Zellen / cm^2 in einer 24 Loch-Platte (Nunc, Rochester, USA) in jeweils 1 ml Expansionsmedium ausplattiert. Jedes Loch der 24 Loch-Platte wurde einen Tag vor Dissektion mit je einem Glasplättchen mit 12 mm Durchmesser (Labor Schubert & Weiss) bestückt und jeweils mit 500 µl Beschichtungslösung versehen. Die Beschichtungslösung enthielt 15 µg Polyornithin und 1 µg Fibronectin pro Milliliter PBS-Puffer. Vor der Dissektion wurde die Beschichtungslösung abgenommen und drei mal für je 5 min mit PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde jedes Loch der 24 Loch-Platte mit 1 ml Kulturmedium gefüllt. Das Expansionsmedium war zusammengesetzt aus DMEM/F12 Nutrient Mix (GibcoBRL, Karlsruhe) mit N2 Supplement (GibcoBRL, Karlsruhe), 10 ng/ml "basic fibroblastic growth factor" (bFGF) (Strathmann Biotech, Hannover), 1 mM Natriumpyruvat (GibcoBRL, Karlsruhe), 0,55 mM 2-Mercaptoethanol (GibcoBRL, Karlsruhe), 50 µM α-Thioglycerat und 20 ηM Bathocuproinedisulfonat. Zur Differenzierung

der VM-Kulturen wurde das Expansionsmedium durch das Differenzierungsmedium ersetzt. Im Gegensatz zum Expansionsmedium enthielt das Differenzierungsmedium 10 % FCS an Stelle des Wachstumsfaktors (bFGF).

2.3 Nicht-virale Transfektion

2.3.1 Transfektion von LAN-5 Zellen mit Effectene (Qiagen)

Einen Tag vor Transfektion wurden die LAN-5 Kulturen nach obigem Protokoll trypsinisiert und in 6 Loch-Platten (Nunc, Rochester, USA) mit einer Dichte von 400.000 Zellen pro Loch ausplattiert. Dies ergab am folgenden Tag eine 70-prozentige Zellkonfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion. Die Vektor-DNA (1 µg) wurde in 150 µl EC Buffer (Qiagen, Hilden) gelöst und mit Enhancer (Qiagen, Hilden) in einem Verhältnis von 1 (DNA in µg) zu 8 (Enhancer in µl) vermischt. Nach kurzem Vortexen wurde der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 25 µl Effectene zugegeben, das Gemisch für 10 Sekunden gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währendessen wurde das Medium der LAN-5 Kulturen abgesaugt und 1 ml frisches Medium vorgelegt. Zuletzt wurden dem Transfektionsgemisch 1 ml Kulturmedium hinzugefügt und der Ansatz danach gleichmäßig den Kulturen zugegeben. Nach 16 Stunden Inkubation unter normalen Kulturbedingungen wurde das Transfektionsmedium abgesaugt und durch 3 ml frisches Medium ersetzt.

Für den Vergleich der Transfektionsrate von proliferierenden LAN-5 Kulturen mit differenzierten LAN-5 Kulturen wurde ein Teil der Tumorzellen mit Retinsäure differenziert (Sidell et al., 1983). Dafür wurde in dem zu differenzierenden Ansatz 6 Stunden vor Transfektion das Medium gewechselt und frisches Medium, bestehend aus DMEM (GibcoBRL, Karlsruhe) und 5 µM Retinsäure, zugegeben. Der proliferierende Ansatz wurde zu jedem Zeitpunkt vor und nach der Transfektion unter normalen Kulturbedingungen mit DMEM-Medium und 10 % FCS kultiviert.

2.3.2 Transfektion von ventralem Mesencephalon

2.3.2.1 Verwendung von Effectene (Qiagen)

Vektor-DNA (0,1 µg - 0,2 µg) wurde in 20 µl EC Buffer gelöst und mit Enhancer versetzt, wobei dieser immer in einem Verhältnis von 1 (DNA in µg) zu 8 (Enhancer in µl) benutzt wurde. Nach dem Vortexen wurde das Gemisch für 2 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur

belassen. In einem nächsten Schritt wurde Effectene (1 µl - 2,5 µl - 5 µl) zugegeben, gevortext und 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde das Transfektionsgemisch mit 35 µl Expansionsmedium vermischt und zu den Kulturen gegeben, wo zuvor 500 µl Medium vorgelegt wurden. Die Transfektion wurde am 2. Tag in Kultur durchgeführt. Nach 6 Stunden wurde der Transfektionansatz abgesaugt und Differenzierungsmedium zugegeben.

2.3.2.2 Verwendung von Versuchslipiden (Qiagen)

Für die Transfektion der primären Zellkulturen wurden von der Firma Qiagen (Hilden) sechs nicht kommerziell erhältliche Lipide für eine Testung zu Verfügung gestellt. Die Versuchslipide (Lipid 1 - 6) (Qiagen, Hilden) wurden in Mengen von 1,125 µl bis 11,25 µl mit EC-Buffer auf 90 µl aufgefüllt. In einem weiteren Ansatz wurden 1,35 µg Vektor DNA in 113 µl EC-Buffer gelöst. Danach wurde Komponente 1 im Verhältnis 1 (DNA in µg) zu 16 (Komponente 1 in µl) zugegeben, gevortext und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Ansatz dem Lipid-Ansatz hinzugefügt und nach wiederholtem vortexen für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Vorlage von 450 µl Expansionsmedium pro Loch der 24 Loch-Platte wurde der Transfektionsansatz tröpfchenweise zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 6 oder 16 Stunden unter normalen Kulturbedingungen wurde das Medium abgesaugt und durch Differenzierungsmedium ersetzt.

2.3.3 Nachweis der Transgen-Expression

Die Messung der relativen Expressionsstärke des RSV-GFP-Konstrukts wurde durch den Vergleich mit dem bereits bekannten Kontrollvektors CMV-GFP (Clontech, Palo Alto, USA) vorgenommen. Hierfür wurden die etablierten LAN-5 Zellen verwendet, welche nach dem oben genannten Protokoll mit beiden Vektoren transfiziert wurden. Die Auswertung erfolgte frühestens 48 Stunden nach der Transfektion am Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Axioskop). Bei 320-facher Vergrößerung wurden pro Loch der 6 Loch-Platte 5 Gesichtsfelder bei 4 gleichen Ansätzen ausgewertet und das Ergebnis arithmetisch gemittelt.

Zur objektiven Messung der Transgen-Expression der transfizierten VM-Kulturen musste das Auswertungsprotokoll angepasst werden. Die Gründe hierfür waren einerseits die wesentlich geringere Zahl GFP-positiver Zellen und anderenseits die schwankende Zelldichte aufgrund des Wachstums der Zellen in Zellgruppen. Um für die statistische Auswertung eine ausreichend große Zellzahl zu erfassen, wurden 3 nebeneinander liegende Flächen pro Loch

ausgewertet, deren Breite der eines Gesichtsfeldes bei 100-facher Vergrößerung entsprach (**Abb. 3**).

Abbildung 3

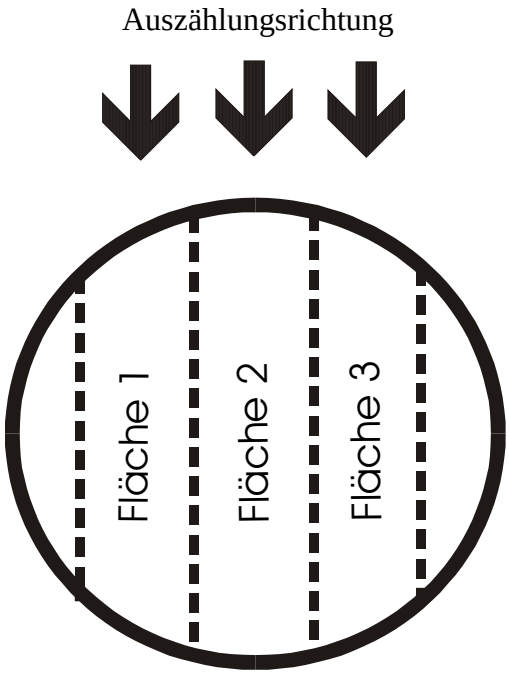


Abb. 3. Schematische Darstellung des Auswertungsverfahrens zur Messung der Transgen-Expression der transfizierten VM-Kulturen in einem Loch einer 24 Loch-Platte (Nunc, Rochester, USA). Die Breite einer Fläche entspricht der Breite eines Gesichtsfeldes bei 100-facher Vergrößerung

2.4 Histologische Aufarbeitung der Kulturen

Zur weiteren morphologischen Aufarbeitung der VM-Kulturen wurden diese für eine Stunde in PBS-gepufferter, 4-prozentiger Paraformaldehyd Fixierlösung fixiert und anschließend mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert.

Bei Verwendung der Antikörper des BrdU-Markierungssystems (Roche Diagnostics, Mannheim) wurden die VM-Kulturen in der folgenden Lösung nach Angaben des Herstellers fixiert. Dieses Fixans bestand aus 70 ml abs. EtOH und 30 ml eines 50 mM Glycinpuffers bei einem pH von 2. Darin wurden die Kulturen für mindestens 20 min bei – 20 °C inkubiert.

2.4.1 Immunhistochemie

Die eingefrorenen (-80°C) Objektträger wurden zuerst 3 x 10 Minuten in PBS gewaschen und anschließend für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 4x Stammlösung bestehend aus 10 % Pferdeserum (GibcoBRL, Karlsruhe) und 0,4% Triton X-100 in PBS inkubiert.

Anschließend wurden die Objektträger wieder 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Der erste Antikörper wurde in entsprechender Konzentration (s.a. unten) in die vierfach in PBS verdünnten 4x Stammlösung gegeben und bei 4°C für ca. 15 Stunden inkubiert. Die Schnitte wurden dann 3 bis 5 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Beim zweiten Antikörper wurde wie beim ersten Antikörper verfahren. Bei Verwendung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurde eine Verdünnung von 1:100 benutzt. Nach einer Inkubationszeit von 2-2,5 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Schnitte wiederum 3 bis 5 x 5 Minuten mit PBS gewaschen.
Sind Fluoreszenz-markierte, zweite Antikörper benutzt worden, können die markierten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Axioskop) betrachtet werden. Zur Verwendung kam ein TRITC-konjugierter, gegen Kaninchen IgG gerichteter Antikörper (Dako, Carpinteria, USA) und ein FITC-konjugierter, gegen Maus IgG gerichteter Antikörper (Dako, Carpinteria, USA).

1. Antikörper	Verdünnung	Spezies
GFP (Clontech, Palo Alto, USA)	**1:1000**	**Kaninchen**
GFAP (Chemicon, Tennecula, USA)	**1:500**	**Maus**
βTubulin III (Chemicon, Tennecula, USA)	**1:400**	**Maus**
Nestin (PharMingen, San Diego, USA)	**1:1000**	**Maus**
TH (Chemicon, Tennecula, USA)	**1:500**	**Maus**

2.4.2 5-Brom-2´-desoxy-Uridin (BrdU) Markierung

Für die Messung der DNA-Syntheserate durch den Einbau von 5-Brom-2´-desoxy-Uridin (BrdU) als Maß für die Stärke der Zellproliferation wurde das BrdU-Markierung Detection Kit I (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Dieses Markierungssystem wurde sowohl zur Messung der Proliferation der Zelllinie LAN-5, als auch der VM-Kulturen unter optimierten Parametern verwendet.
Zur Messung der Proliferation der sich schnell-teilenden Tumorzellen der LAN-5 Linie wurden diese für 30 min mit BrdU inkubiert, welches in einer Konzentration von 10 µM dem jeweiligem Kulturmedium zugeführt wurde. Danach wurden sie 3 x 5 min mit Wasch-Puffer gewaschen und nach dem oben genannten Protokoll fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Deckgläser wiederum 3 x 5 min mit Wasch-Puffer gereinigt. Zur Markierung der BrdU-positiven Zellen wurden die Deckgläser für 2 Stunden mit der Anti-BrdU Arbeitslösung

bei 37 °C inkubiert. Diese setzte sich zusammen aus einem monoklonalen Anti-BrdU Antikörper der Maus mit Nukleasen und Inkubationspuffer im Verhältnis 1 : 100 und wurde gemäß Protokoll kurz vor Gebrauch hergestellt. Danach wurden die Deckgläser 3 x 5 Minuten mit Wasch-Puffer gereinigt. Zur Darstellung der markierten Zellen wurden die Deckgläser für 2 Stunden mit Anti-Maus-Ig-Fluorescein Arbeitslösung bei 37 °C inkubiert. Diese bestand aus einem Anti-Maus-Ig-Fluorescein und PBS-Puffer im Verhältnis 1 : 100. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser 3 x 5 Minuten in Wasch-Puffer gewaschen, eingedeckelt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Axioskop) ausgewertet.

Da sich die Zellen der VM-Kulturen im Verhältnis zu den LAN-5 Zellen langsamer teilen und empfindlicher gegenüber toxischen Substanzen sind, musste das Protokoll optimiert werden. Die Inkubationsdauer des BrdU-Mediums wurde auf 15 Stunden verlängert und gleichzeitig die Konzentration von BrdU auf 1 µM im Medium reduziert. Ansonsten wurden die weiteren Schritte nach dem oben genannten Protokoll ausgeführt.

Die BrdU-Aufnahme der LAN-5 Zellen wurden am Fluoreszenz-Mikroskop 5 Gesichtsfelder bei 320-facher Vergrößerung in 4 identischen Ansätzen ausgewertet und das Ergebnis arithmetisch gemittelt. Bei den VM-Kulturen wurden in 4 gleichen Ansätzen je 8 Zellgruppen sowohl im Dunkel- als auch im Hellfeld ausgezählt, das Ergebnis arithmetisch gemittelt, und die Zahl BrdU-positiver Zellen in Prozent angegeben.

2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit kommerzieller Software (Excel) durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Die Fehlerbalken in den Tabellen geben die Standardabweichung an.

3 ERGEBNISSE

3.1 Plasmidvergleich von CMV-GFP mit RSV-GFP in LAN-5 Zellen

Der in dieser Arbeit hergestellte pRep7-GFP Vektor basiert auf dem kommerziellen Plasmid pRep7, das sich aus einem RSV-Promotor und einem EBNA1-Element zusammensetzt. Dieses Plasmid repliziert episomal und ermöglicht eine hohe Transgen-Expression in neuronalem Gewebe (Holt et al., 1990; Bauer et al., 2000). Die relative Transfektionseffizienz von pRep7-GFP (RSV-GFP) wurde durch vergleichende Transfektionen mit pGFP-C1 (CMV-GFP) bestimmt, bei dem die GFP-Expression unter Kontrolle eines CMV-Promotors steht, und der keine EBV-Elemente enthält. Zur Untersuchung der Plasmid-Eigenschaften an neuronalen Zellen wurde eine humane Neuroblastomzelllinie (LAN-5) verwendet (Sidell et al., 1983). Da LAN-5 Zellen durch Zugabe von Retinsäure und Entzug von Serum differenzieren (Sidell et al., 1983), wurde gleichzeitig in einem differenzierten und einem proliferierenden Ansatz der Einfluss der Zellteilungsrate auf die Transfektionseffizienz bestimmt.

3.1.1 Transfektion differenzierter LAN-5 Zellen mit CMV-GFP und RSV-GFP

Die Transfektion erfolgte in beiden Ansätzen einen Tag nach frischem Ausplattieren der LAN-5 Zellen, bei folgenden Bedingungen: Zellkonfluenz von 70 % am Tag der Transfektion, Verhältnis von 1 µg Vektor-DNA zu 25 µl Effectene (Qiagen, Hilden) und Inkubation des Transfektionsgemisch für 16 Stunden. Die Zellproliferation wurde 48 Stunden nach der Transfektion per BrdU-Markierung (Roche Diagnostics, Mannheim) ermittelt. Sowohl die Transfektionseffizienz als auch die BrdU-Aufnahme der Zellen wurde durch die Zählung von GFP- /BrdU- positiven Zellen in 5 Gesichtsfeldern (GF) pro Loch der sechs Loch-Platte bei vier identischen Versuchsansätzen quantifiziert.

Für die Differenzierung der Neuroblastomzellen wurde 6 Stunden vor der Transfektion das DMEM-Medium (GibcoBRL, Karlsruhe) mit 10 % fetalem Kälber Serum (FCS) (GibcoBRL, Karlsruhe) abgesaugt und durch DMEM-Medium mit 5 µmol Retinsäure ersetzt (Sidell et al., 1983). Die Messung der Zellproliferation mittels BrdU-Markierung ergab für den differenzierten Versuchansatz eine relativ geringe Zahl BrdU-positiver Zellen (5 +/- 0,8 pro GF n=4).

Die Auswertung zeigte 48 Stunden nach der Transfektion bei allgemein niedriger Transgen-Expression eine signifikant höhere Zahl GFP-positiver Zellen (3,6 +/- 1 pro GF, n=4) bei Verwendung von CMV-GFP. Dessen Transgen-Expression stieg noch bis zum 4. Tag nach

der Transfektion an (5,2 +/- 0,8 pro GF, n=4), um danach bis zum Auswertungsende kontinuierlich abzunehmen **(Abb. 4A)**. Hingegen wurde mit dem RSV-GFP nur eine sehr niedrige Zahl GFP-positiver Zellen beobachtet (0,25 +/- 0,5 pro GF, n=4), die auch an den weiteren Auswertungstagen auf diesem Niveau verblieb **(Abb. 4A)**. Zusammengefasst zeigte CMV-GFP im Vergleich zu RSV-GFP in diesem Versuchansatz nach 48 Stunden eine ca. 15-fach höhere und an Tag 4 sogar eine 21-fach höhere Transgen-Expression.

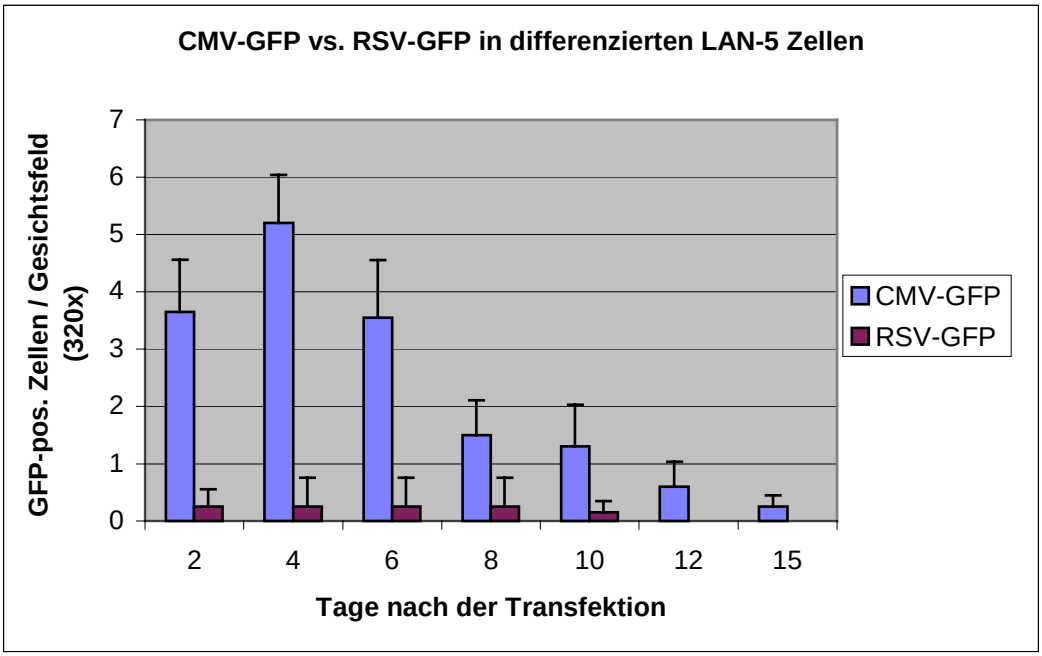
3.1.2 Transfektion proliferiender LAN-5 Zellen mit CMV-GFP und RSV-GFP

Zur Untersuchung der Transfektionseffizienz bei proliferierenden LAN-5 Zellen wurden die Zellen sowohl vor, als auch nach der Transfektion in DMEM-Medium mit 10 % FCS kultiviert. Die BrdU-Markierung für den proliferierenden Ansatz zeigte 48 Stunden nach der Transfektion einen deutlichen Anstieg BrdU-positiver Zellen (34 +/- 6 pro GF n=5) im Vergleich zum differenzierten Ansatz (5 +/- 0,8 pro GF n=4).

Die Auswertung ergab für beide Vektoren eine höhere Zahl GFP-positiver Zellen im Vergleich zur Transfektion differenzierter Zellen. So konnte bei Verwendung des CMV-GFP Plasmids bereits 48 Stunden nach der Transfektion eine deutliche Steigerung der Transgen-Expression gemessen werden (32 +/- 6 pro GF, n=4), und eine fast 15-fach höhere Zahl GFP-positiver Zellen (74 +/- 4 pro GF, n=4) am 6. Tag nach der Transfektion, was zugleich die höchste Effizienz darstellte. Im folgenden Beobachtungszeitraum fiel die Zahl der Transgen-positiven Zellen bis zum Auswertungsende (21 +/- 2 pro GF, n=4) kontinuierlich ab **(Abb. 4B)**. Auch mit dem RSV-Konstrukt war an Tag 2 (3 +/- 0,6 pro GF, n=4) vor allem aber an Tag 6 (10 +/- 1,2 pro GF, n=4) eine Erhöhung der Transfektionseffizienz feststellbar. Allerdings lag diese etwa 10-fach unter der des CMV-Vektors. Im Verlauf der weiteren Auswertungen nahm bei RSV-GFP die Zahl der Transgen-positiven Zellen (1 +/- 0,2 pro GF, n=4) bis zum 15. Tag nach der Transfektion stetig ab **(Abb. 4B)**.

Abbildung 4

A



B

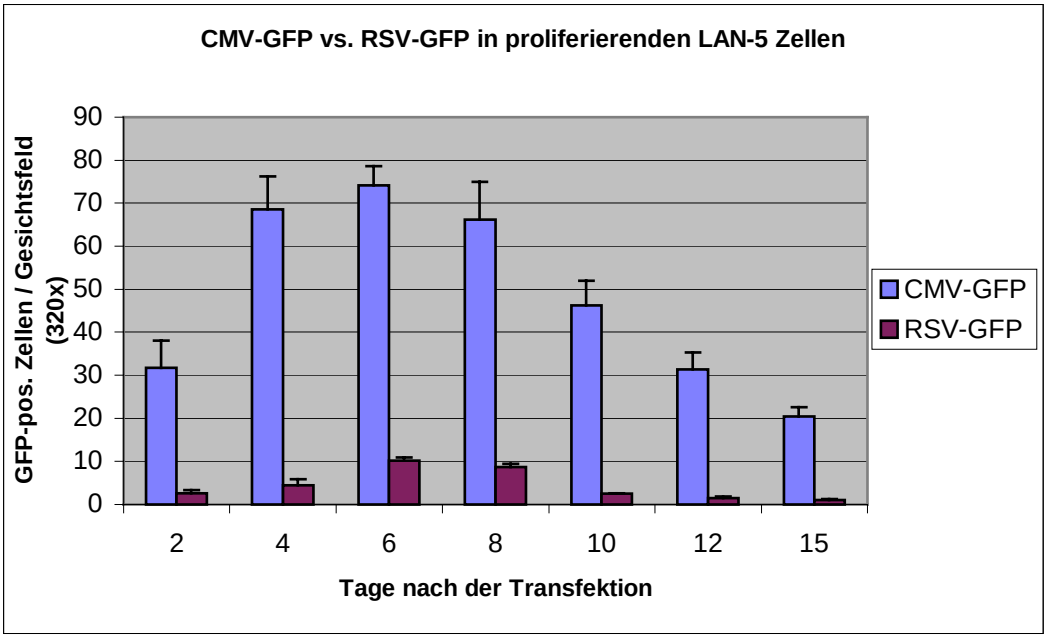


Abb. 4. Anzahl der GFP-positiven Zellen pro GF bei 320-facher Vergrößerung. Die Transfektionsgemische enthielten 1 µg DNA (CMV-GFP, RSV-GFP) und 25 µl Effectene (Qiagen, Hilden). Beide Ansätze wurden für die Transfektionen in 6 Loch-Platten (Nunc, Rochester, USA) überführt. Die Transfektion wurde ein Tag nach dem Ausplattieren durchgeführt. Die Transfektionszeit betrug 15 Stunden. Die Auswertung begann 48 Stunden nach der Transfektion. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Zahl GFP-positiver Zellen pro Gesichtsfeld mit n=4. Die Transfektion proliferierender LAN-5 Zellen (**B**) erzielte im Vergleich zu differenzierten (**A**) bei beiden Konstrukten deutliche Steigerungen der Effizienzen. Die Transgen-Expression war bei Verwendung des RSV-Vektors in beiden Ansätzen unter der des CMV-Vektors.

3.2 Transfektion von ventralem Mesencephalon

Zur Transfektion der mesencephalen Vorläuferzellen der Ratte wurden sowohl Effectene (Qiagen, Hilden) als auch sechs Versuchslipide (Qiagen, Hilden) verwendet. Da die Vorversuche an LAN-5 Zellen die Bedeutung einer hohen Zellteilungsrate zum Erzielen einer hohen Transfektionseffizienz vermuten lässt, wurden die primären Zellen am 2. Tag nach der Präparation (DIV 2), dem Tag des größten BrdU-Aufnahme (78 % +/-5 pro Zellgruppe, n=4) transfiziert. Die Auswertung erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion (DIV 4), unter Verwendung des im Material und Methoden Teils beschriebenen Schemas **(Abb. 3)**.

3.2.1 Transfektionsoptimierung mit Effectene (Qiagen) als Gentransfer-Reagenz

Die Anlage des ventralen Mesencephalons (VM-Gewebe) wurde an Embryonaltag 13 (E13) dissektiert und durch mechanische Trituration in eine Einzelzellkultur überführt. Nach einer Expansionsphase von 2 Tagen mit bFGF wurde die Transfektion mit CMV-GFP durchgeführt. Die in Vorversuchen ermittelten Protokolle zur Transfektion von primären Gewebeblöcken des ventralen Mesencephalons, mit 2 µg DNA und 20 µl Effectene (Bauer et al, 2000), erwiesen sich als zu toxisch für primäre Einzelzellkulturen (dissoziierte VM-Kulturen). Daher wurden die eingesetzten DNA- und Effectene-Mengen schrittweise abgesenkt. Erst bei 0,2 µg DNA mit entsprechenden Effectene-Mengen und einer Inkubationsdauer von 6 Stunden, konnte eine Reduktion des Zelltodes beobachtet werden. Die Testung der DNA-Lipid-Verhältnisse (1:10, 1:25 und 1:50) ergab aber nur bei einem Verhältnis von 1:25 GFP-positive Zellen (13 +/- 4 pro Fläche*, n=4). Die Erhöhung der Inkubationsdauer auf 16 Stunden führte bei steigender Toxizität zu keiner Verbesserung der Transfektionseffizienz. Durch eine weitere Absenkung der Vektor-DNA auf 0,1 µg mit verschiedenen Effectene-Mengen (1:10, 1:25 und 1:50) konnten sowohl bei einem DNA-Effectene–Verhältnis von 1:10 (10 +/- 4 pro Fläche*, n=4), als auch bei 1:25 (12 +/- 2 pro Fläche*, n=4) GFP-positive Zellen beobachtet werden **(Abb. 5A)**. Mit einer weiteren Reduktion der DNA-Menge auf 0,05 µg DNA konnte keine Steigerung des Transfektionsergebnisses erreicht werden.

3.2.2 Transfektionsoptimierung mit Versuchslipiden (Qiagen) als Gentransfer-Reagenz

Die neuronalen Vorläuferzellen des ventralen Mesencephalons wurden an E13 dissektiert und trituriert. Nach einer Expansionsphase von 2 Tagen mit bFGF wurde die Transfektion mit CMV-GFP durchgeführt. Die Testung und Optimierung der sechs Versuchslipide (Qiagen, Hilden) wurde mit LAN-5 Zellen in 96 Loch-Platten durchgeführt. Dabei erzielte, nach

Umrechnung auf 24 Loch-Platten-Format, eine DNA-Menge von 1,35 µg mit Lipidmengen von 4,5 bis 11,25 µl optimale Transfektionseffizienzen. Komponente 1 wurde stets im Verhältnis 1 (DNA in µg) zu 16 (Komponente 1 in µl) hinzugegeben.

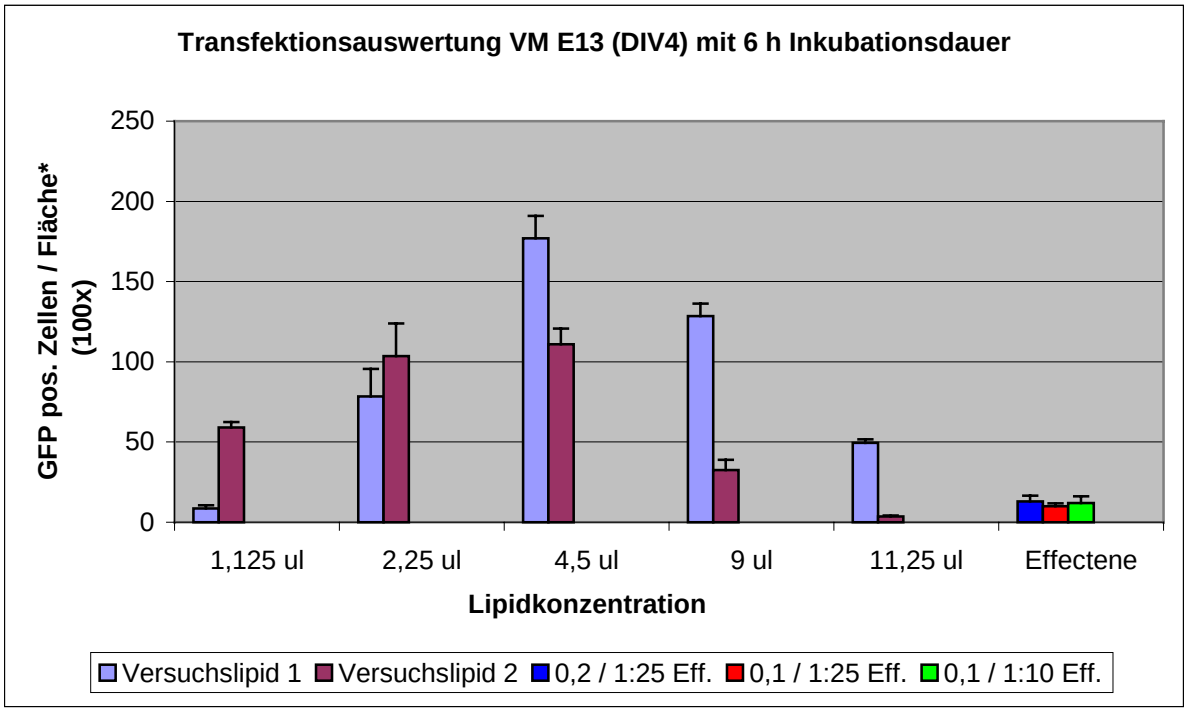
In Vorversuchen wurden die dissoziierten VM-Kulturen mit den sechs Lipiden, unter Verwendung von drei verschiedenen Lipidmengen (4,5 µl, 9 µl und 11,25 µl) und einer Inkubationszeit von sechs Stunden in zwei unabhängigen Versuchen transfiziert. Da alle Lipide am Tag zwei nach Transfektion, im Vergleich zu Effectene, höhere Transfektionseffizienzen bei niedriger Toxizität zeigten, wurden die vier besten Lipide zur weiteren Optimierung ausgewählt. Weil bei diesen vier Reagenzien die niedrigste Lipidkonzentration (4,5 µl) das höchste Transfektionsergebnis erzielt hatte, wurden in zwei weiteren Versuchen noch niedrigere Lipidmengen (1,125 µl, 2,25 µl und 4,5 µl) getestet. Nach Auswahl der zwei Lipide mit der höchsten Transfektionseffizienz wurden diese mit allen bisherigen Lipidmengen (1,125 µl, 2,25 µl, 4,5 µl, 9 µl und 11,25 µl), bei vier gleichen Ansätzen, für sechs Stunden transfiziert. Im Vergleich zur Transfektion mit Effectene, konnte die Transfektionseffizienz mit Versuchslipid 1 um das 18-fache (177 +/- 14 pro Fläche*, n=4), mit Versuchslipid 2 um das 11-fache (111 +/- 10 pro Fläche*, n=4) gesteigert werden. Dabei erzielten beide Versuchsreagenzien die maximale Zahl GFP-positiver Zellen mit einer Lipidmenge von 4,5 µl **(Abb. 5A)**. Das Auftreten einer toxischen Wirkung der Transfektionsgemische konnte mit Versuchslipid 2 bei 9 µl und mit Versuchslipid 1 erst ab 11,25 µl beobachtet werden.

In einer weiteren Versuchsserie wurden die VM-Kulturen, unter Verwendung der gleichen Lipidmengen (1,125 µl, 2,25 µl, 4,5 µl, 9 µl und 11,25 µl), mit einer verlängerten Inkubationszeit (16 h) transfiziert. Eine Steigerung der Transfektionseffizienz konnte für beide Lipide beobachtet werden. Die Zahl der Transgen-positiven Zellen erhöhte sich im Vergleich zu Effectene um das 31-fache mit Versuchslipid 1 (311 +/- 90 pro Fläche*, n=4) und um das 21-fache mit Versuchslipid 2 (209 +/- 8 pro Fläche*, n=4). Hierbei lag die maximale Zahl GFP-positiver Zellen in beiden Ansätzen wiederum bei einer Lipidmenge von 4,5 µl **(Abb. 5B)**.

* Auswertungsfläche siehe Material und Methoden Abbildung 3

Abbildung 5

A



B

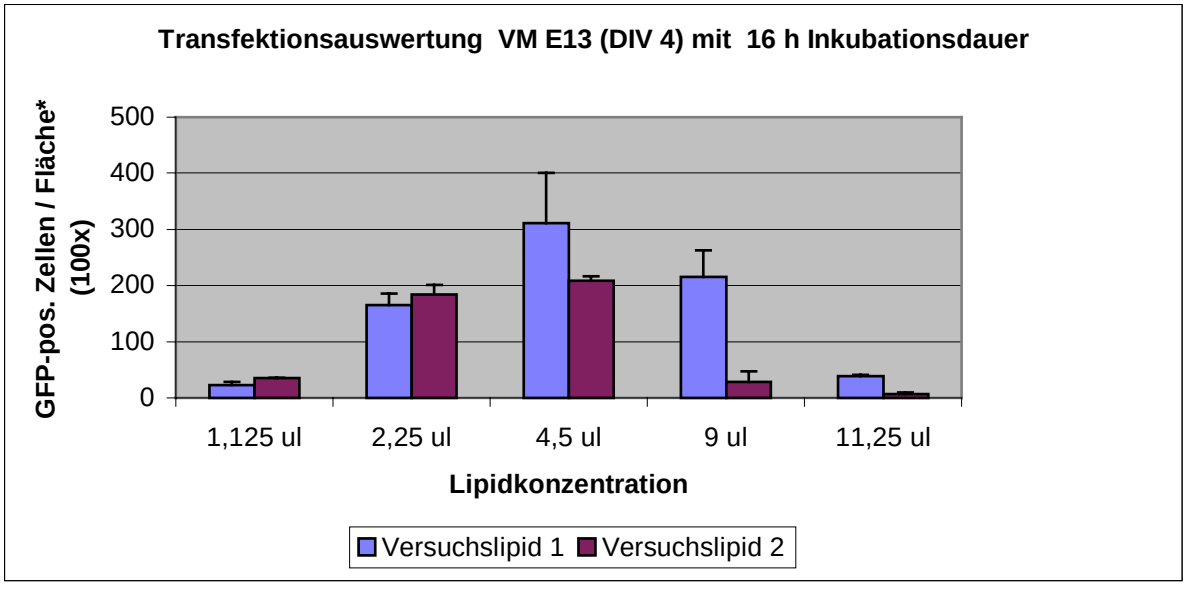


Abb. 5. Die Anzahl GFP-positiver Zellen pro Fläche bei 100-facher Vergrößerung in VM-Kulturen (E13) am 4. Tag in Kultur. Die Transfektionslösungen von Versuchslipid 1 und 2 (Qiagen, Hilden) bestanden aus 1,35 µg DNA und verschiedenen Lipidmengen (1,125 µl, 2,25 µl, 4,5 µl, 9 µl und 11,25 µl). Die Transfektionsgemische der Transfektionen mit Effectene (Qiagen, Hilden) enthielten 0,2 oder 0,1 µg DNA und Effectene im Verhältnis 1:10 oder 1:25 (**A**). Die Transfektionen erfolgten in 24 Loch-Platten (Nunc, Rochester, USA) mit Inkubationszeiten von 6 Stunden (**A**) und 16 Stunden (**B**). Die Auswertung erfolgte am 2. Tag nach der Transfektion. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Zahl GFP-positiver Zellen pro Fläche (s. **Abb. 3**) mit n=4. Bei Verwendung der Versuchslipide (jeweils 4,5 µl Lipidmenge) konnte im Vergleich zu Effectene eine Steigerung der Transfektionseffizienz, um das 31-fache mit Versuchslipid 1 (**A**) und das 21-fache mit Versuchslipid 2 (**B**) beobachtet werden.

3.3 Immunhistochemische Charakterisierung des ventralen Mesencephalons der Ratte und der transfizierten Zellen

Am Embryonaltag 13 (E13) finden in der Anlage des ventralen Mesencephalons der Ratte große Veränderungen in Hinsicht auf die sich entwickelnden Zelltypen statt. Nach Bildung des Neuralrohrs liegen teilungsfähige, immature Vorläuferzellen vor, die in der weiteren Entwicklung zu postmitotischen Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren können. Das Vorliegen teilungsfähiger Vorläuferzellen ist für einen effektiven, nicht-viralen Gentransfer bedeutsam, da proliferierenden Vorläuferzellen höhere Transfektioneffizienzen erzielen als postmitotische Neuronen (Felgner et al., 1989). Um die Zusammensetzung der Zelltypen unter den jeweiligen Kulturbedingungen zu erfassen, wurden die VM-Kulturen nach unterschiedlichen Kulturzeiten immunhistochemisch charakterisiert. Es wurden hierfür verschiedene Antikörper zur Markierung der folgenden Strukturen verwendet: Nestin, Tyrosinhydroxylase (TH), beta Tubulin III (β-TUB III) und Glial fibrillatory acidic protein (GFAP) **(Tabelle 1)**.

Nach Dissektion und Trituration an E13 wurden die VM-Kulturen während der Expansionsphase für 5 Tage unter definierten Bedingungen expandiert (Studer et al., 1998), und in der sich anschließenden Differenzierungsphase, durch Entzug von bFGF und Zugabe von 10% FCS, für weitere 7 Tage differenziert **(Abb. 6A)**. Als Marker für die immaturen, neuroephithelialen Vorläuferzellen diente das Intermediärfilament Nestin. Dessen Nachweis ist möglich nach Bildung des Neuralrohrs ab E11 und endet mit Beginn der Differenzierung (Lendahl et al., 1990). In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Studer und Kollegen (1998) lagen in der Expansionsphase bis zum 5. Tag fast ausschließlich Nestin-positive Vorläuferzellen vor **(Abb. 6B)**. Erst in der Differenzierungsphase konnten zunehmend differenzierte Zellen durch β-TUB III, GFAP und TH, neben Nestin-positiven Zellen detektiert werden **(Abb. 6B)**.

Für die immunhistochemische Charakterisierung von transfizierten VM-Kulturen, wurden Vorläuferzellen nach dem oben genannten, optimierten Protokoll mit Versuchslipid 1 am 4. Tag in Kultur transfiziert. Die immunhistochemische Doppelfärbung mit einem GFP-Antikörper zeigte die Transfektion von Nestin- und TH-positiven Zellen **(Abb. 6C)**.

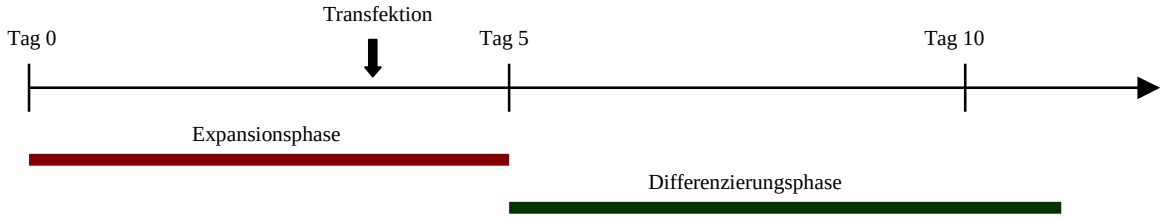
Tabelle 1 Immunhistochemische Charakterisierung der VM-Kulturen

Antigen	**Markierter Zelltyp**
Nestin	Epression in immaturen, neuroephithelialen Vorläuferzellen (Lendahl et al., 1990)
β-Tubulin III	Expression in maturen Neuronen (Lee et al., 1990)
GFAP	Expression in maturen Gliazellen (Fisher et al., 1997)
TH	Expression in maturen, dopaminergen Neuronen
GFP	Nachweis GFP-expremierender, transfizierter Zellen

Tab. 1. Immunhistochemische Charakterisierung der VM-Kulturen der Ratte. Darstellung der durch den 1. Antikörper detektierten Antigene und deren Expression in den jeweiligen Zelltypen.

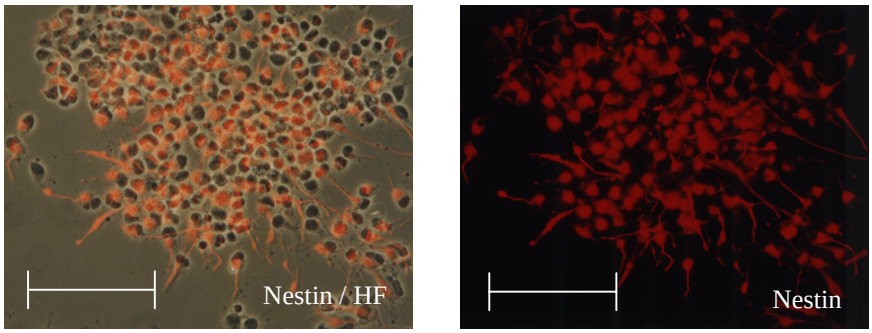
Abbildung 6

A Versuchsaufbau



B Expansion & Differenzierung

Expansionsphase (5 Tage)



Differenzierungsphase (7 Tage)

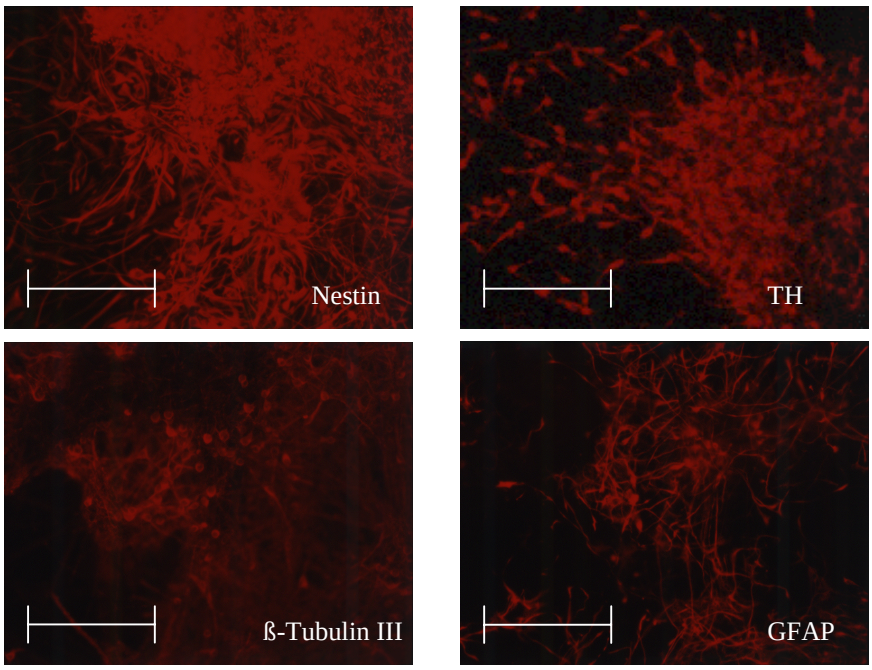


Abb. 6. Immunhistochemische Charakterisierung der VM-Kulturen (E13) der Ratte. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus (**A**). Expansion der VM-Kulturen mit bFGF über 5 Tage. Differenzierung für weitere 7 Tage durch Entzug von bFGF und Zugabe von 10% FCS. Darstellung von Nestin-positiven Zellen im Dunkel- und Hellfeld (**B**, oben) nach 5 Tagen Expansion. Detektion von Nestin-, TH-, β-Tubulin III- und GFAP-pos. Zellen (**B**, unten) am Ende der Differenzierungsphase. Der Skalierungsbalken (**B**) entspricht 50 µm.

C Transfektion

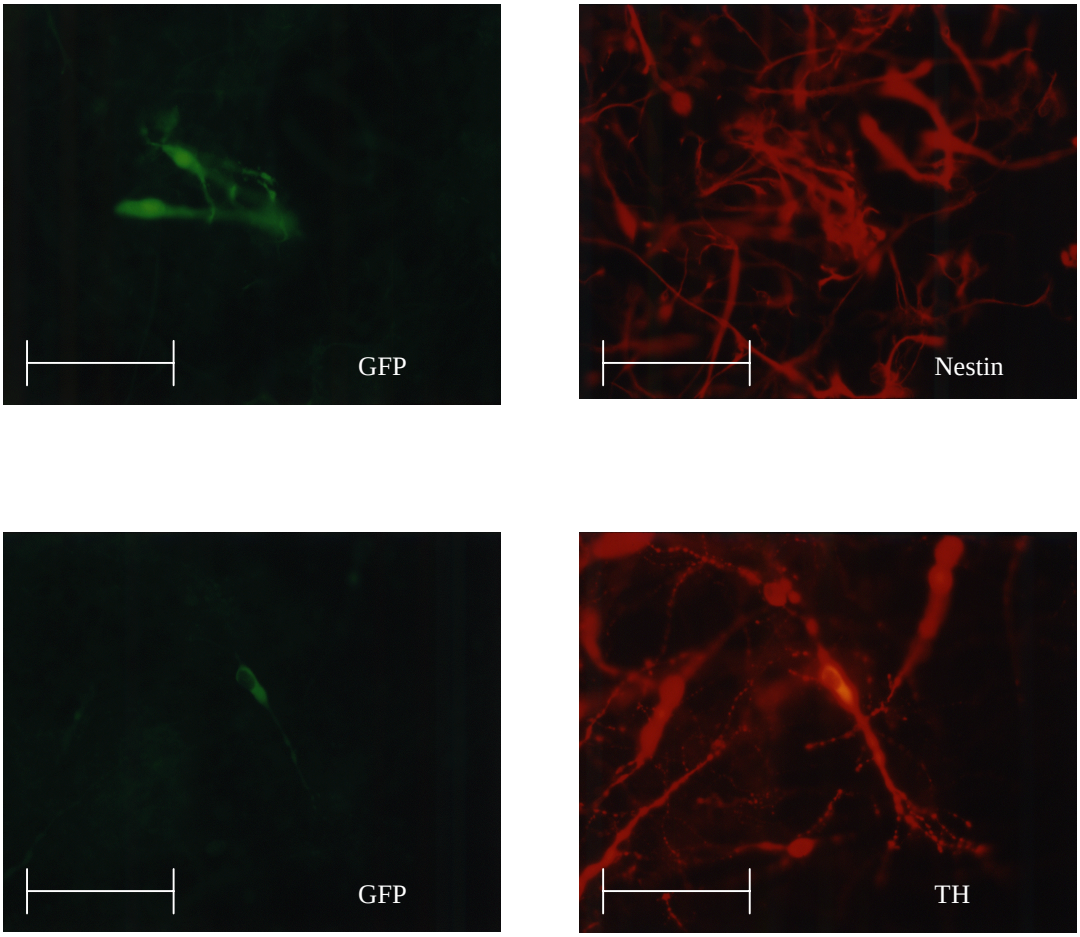


Abb. 6. Doppelfärbung transfizierter Zellen (**C**) mit GFP- und Nestin-Antikörper (**C**, oben) bzw. TH-Antikörper (**C**, unten). Der Skalierungsbalken (**C**) entspricht 30 µm. Verwendung von FITC- (grün) (**C**) bzw. TRITC- (rot) (**B**, **C**) markierten Sekundärantikörpern. Mikroskop: Zeiss, Axioskop.

4 DISKUSSION

Bisherige Versuche zur Zelltherapie des Morbus Parkinson verwendeten hauptsächlich fetale, mesencephale Zellen (Lindvall et al, 1989, Freed et al., 2001). Ein für solche Verfahren limitierendes Problem stellt dabei der Mangel an embryonalem Gewebe dar. Einen möglichen Ansatz zur Reduzierung des Bedarfs an Spendergewebe zeigte die Studie von Studer und Kollegen (1998) auf, in der neuronale Vorläuferzellen *in vitro* expandiert und differenziert wurden und nach ihrer Transplantation funktionelle Effekte im Tiermodel erzielten. Ein Ziel dieser Studie war es neuronale Vorläuferzellen *in vitro* zu expandieren und diese Expansionsphase für eine nicht-virale Transfektion zu nutzen. Die in den Vorversuchen an LAN-5 Zellen beobachtete Bedeutung der Proliferation für den nicht-viralen Gentransfer war eine wesentliche Grundlage für die erfolgreiche Transfektion der Vorläuferzellen in der Expansionsphase. Ein weiteres Ziel der Studie war es durch die Anwendung der Protokolle von Studer und Kollegen (1998) den Anteil dopaminerger Zellen während der Differenzierungsphase zu erhöhen, um die nicht-virale Transfektion dieser Zellen zu ermöglichen. Die immunhistochemische Charakterisierung der Transgen-positiven Zellen ergab, dass auch die, für zelltherapeutische Strategien des MP relevanten, dopaminergen Neurone mit dem etablierten Verfahren transfiziert werden konnten.
Für die Vorversuche zur Optimierung der Transfektion an LAN-5 Zellen mittels Effectene (Qiagen, Hilden) wurden zwei für GFP-kodierendere Vektoren mit unterschiedlichen Aufbau untersucht (CMV-GFP; RSV-GFP). Zur Transfektion der Vorläuferzellen wurden neben Effectene auch in der Entwicklung befindliche Versuchslipide (Qiagen, Hilden) angewendet. Die immunhistochemische Charakterisierung zeigte, dass Nestin-positive und auch TH-positive Neurone transfiziert wurden.

4.1 Faktoren zur Optimierung des nicht-viralen Gentransfers in LAN-5 Zellen

Für einen erfolgreichen nicht-viralen Gentransfer existiert eine Vielzahl von unterschiedlichen Voraussetzungen. Eine wesentliche Voraussetzung stellt die Wahl des Lipides für die Transfektion dar, da es sowohl verantwortlich für die Struktur des DNA-Lipid-Komplexes als auch dessen Interaktion mit den Zielzellen ist (Chesnoy et al., 2000). Als Transfektionsreagenz wurde Effectene verwendet, da es im Vergleich zu Lipofectamine (GibcoBRL, Karlsruhe) in Vorversuchen an mesencephalen Gewebeblöcken höhere Transfektionseffizienzen erzielte (Bauer et al., 2000). Effectene besteht aus kationischen Lipiden, die aber im Gegensatz zu Lipofectamine keine liposomalen Formationen ausbilden.

Über die genaue Zusammensetzung der einzelnen Komponenten von Effectene liegen derzeit noch keine Informationen vor.

4.1.1 Einfluss der Zellteilung auf die Transfektionseffizienz

Nach der Interaktion des DNA-Lipid-Komplexes mit den Zielzellen, die sich hauptsächlich aus dessen Bindung an die Zielzellen und dessen endosomaler und cytoplasmatischer Aufnahme zusammensetzt, muss die DNA zur Expression in den Zellkern eingeschleust werden (Chesnoy et al., 2000). Da Moleküle über 70 kDa nur über transportspezifische Kernporen in den Zellkern gelangen (Dowty et al., 1995), ist eine freie Diffusion der DNA in den Kern nicht möglich. Viraler Gentransfer überwindet dieses Problem durch spezifische virale Kernlokalisierungspeptide, die den Transport der DNA über die Kernporen ermöglichen. Erste Versuche zur Nutzung dieses Prinzips bei nicht-viralen Gentransferverfahren blieben für die praktische Anwendung ohne Bedeutung (Remy et al., 1995). Vielversprechend sind neuere Untersuchungen, die durch Kopplung von Kernlokalisierungspeptiden mit Genen bis zu 1000-fach höhere Transfektionseffizienzen erzielen (Zanta et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit zur Einschleusung der DNA in den Zellkern ist die Ausnutzung der Phasen im Zellzyklus, in denen keine Kernmembran vorliegt (Felgner und Ringold, 1989). Da dies nur während der Mitose der Fall ist, sollte sich für eine erfolgreiche nicht-virale Transfektion eine möglichst hohe Zahl der kultivierten Zellen in der Proliferationsphase befinden (Felgner und Ringold, 1989).

Zur Überprüfung dieser These wurden Transfektionsversuche an LAN-5 Zellen durchgeführt. Aufgrund der Möglichkeit diese Zelllinie durch Retinsäure und Serumentzug zu differenzieren (Sidell et al., 1983), konnten zwei Ansätze mit unterschiedlicher Proliferationsstärke untersucht werden. Für den Vergleich der Transfektionseffizienzen der beiden Ansätze wurden die Ergebnisse des CMV-Plasmids im Pilotexperiment verwendet, da mit diesen, aufgrund der höheren Zahl Transgen-positiver Zellen, zuverlässigere Aussagen ableitbar sind. Die Transfektionsergebnisse zeigten eine deutliche Steigerung der Zahl GFP-positiver Zellen unter proliferativen Bedingungen. Bereits 48 Stunden nach der Transfektion konnte gegenüber dem Differenzierungsansatz eine fast 10-fache Erhöhung der Zahl transfizierter Zellen im Proliferationsansatz beobachtet werden. Im weiteren Verlauf des Versuches erhielt man am vierten Tag eine 15-fache Steigerung der Transgen-Expression, was zugleich die höchste Effizienz darstellte. Danach nahm die Zahl Transgen-positiver Zellen unter beiden Bedingungen bis zum Auswertungsende kontinuierlich ab. Die Messung der Proliferationsstärke mittels BrdU-Markierung, 48 Stunden nach der Transfektion, ergab

aber nur eine 7-fach höhere Zahl BrdU-positiver Zellen unter proliferativen Bedingungen. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Korrelation zwischen BrdU- und GFP-positiven Zellen könnte in einer unterschiedlichen Expressionskinetik der transfizierten Zellen liegen.
Zusammengefasst zeigten die Vorversuche an LAN-5 Zellen, dass für die Transfektionseffizienz nicht-viraler Transfektionmethoden die Zellproliferation ein wichtiger Faktor ist. Die sich hieraus ergebende Konsequenz für die erfolgreiche Transfektion primärer, mesencephaler Zellen ist, dass eine Transfektion während der Expansionsphase der neuronalen Vorläuferzellen höhere Transfektionseffizienzen erwarten lässt als die Transfektion differenzierter Zellen.

4.1.2 Einfluss des Vektor-Konstrukts auf die Transfektionseffizienz

Neben der durch den DNA-Lipid-Komplex vermittelten Zellinteraktion und einer proliferationsabhängigen Einschleusung der DNA in den Zellkern, spielt auch der verwendete Vektor eine wesentlich Rolle für das Erreichen einer möglichst hohen Transfektionseffizienz. Eine Vorraussetzung für eine hohe Transgen-Expression ist die erfolgreiche Transkription des Zielgens. Hierfür ist unter anderem die Wahl eines geeigneten Promotors entscheidend. Zusätzlich ist eine stabile Expression des Transgenes erwünscht. Da konventionelle Vektoren, ohne eigenen Replikationsursprung, bei proliferierenden Zellen wegen fehlender Replikation nicht effektiv sind, ist ein Vektor von Vorteil, der als Episom unabhängig vom Genom repliziert wird. Wegen dieser Anforderungen wurde das Reportergen GFP in pRep7 kloniert. Dieser Vektor enthält einen Rous-Sarcoma-Virus-(RSV)-Promotor, der in fetalem ZNS-Gewebe eine stärkere Transgen-Expression als CMV- oder SV40-Promotoren ermöglicht (Holt et al., 1990; Jiao et al, 1992). Darüber hinaus enthält pRep7 die Sequenz der 3'-trunkierten Form von EBV-Nuclear Antigen1 (EBNA1) des Epstein-Barr-Viruses (EBV). EBNA1 ist ein multifunktionelles, virales Protein, das im Zusammenspiel mit anderen zellulären Faktoren zur Persistenz des Episoms im Zellkern beiträgt. EBNA1 bindet an den, im pRep7-Konstrukt enthaltenen, viralen Replikationsursprung (oriP), der die Replikation des Plasmids in der Phase der viralen Latenz ermöglicht. Die genannten Eigenschaften von Vektoren mit EBV-Elementen gelten insbesondere für Zelllinien, die auf humanen, oder den Zellen anderer Primaten basieren, und können speziesspezifisch variieren. Die Zellen von Nagern werden unter natürlichen Bedingungen nicht infiziert. Dennoch konnten Vektorkonstrukte mit EBV-Elementen erfolgreich eingesetzt (Bauer et al., 2000), und eine transiente Erhöhung der Transgen-Expression im Vergleich zu nicht EBV-assoziierten Vektoren beobachtet werden (Tomiyasu et al., 1998). Zusammengefasst waren für die Wahl

des pRep7-Konstrukts die sich aus dem Promotor und den EBV-Elementen ergebenden Möglichkeiten für eine hohe und stabile Transgen-Expression entscheidend.
Zur Überprüfung der Erwartungen an RSV-GFP wurden vergleichende Transfektionen mit pGFP-C1 (CMV-GFP) (Clonetech, Palo Alto, USA) durchgeführt. Bei dem zuletzt genannten Vektor steht die GFP-Expression unter Kontrolle des CMV-Promotors und EBV-Elemente sind nicht enthalten. Der Vergleich der beiden Plasmide an LAN-5 Zellen zeigte für Transfektionen mit RSV-GFP deutlich niedrigere Transgen-Expression als für CMV-GFP. 48 Stunden nach Transfektion war die Zahl GFP-positiver Zellen bei proliferienden LAN-5 Zellen für CMV-GFP (32+/- 6 pro GF, n=4) verglichen mit RSV-GFP (3 +/- 0,6 pro GF, n=4) ca. 10-mal höher. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den oben genannten Forderungen an das pRep7-Konstrukt. Als Ursache werden kurze Sequenzen zwischen dem Promotor und der Insertionsstelle vermutet, die eine effiziente Transkription durch die RNA Polymerase II behindern. Dieses Phänomen trat zum Teil in anderen Experimenten mit unterschiedlicher cDNA an dieser Steller auf (M. Ueffing, persönliche Mitteilung). Wegen der niedrigen Zahl GFP-positiver Zellen bei den Transfektionen mit RSV-GFP sind keine sicheren Aussagen über eine durch EBNA1 verlängerte Transgen-Expression möglich. Für die weiteren Transfektionsversuche mit primärem Gewebe wurde, aufgrund dieser Ergebnisse, der CMV-Vektor verwendet.

4.2 Transfektion von ventralem Mesencephalon

Seit den ersten Versuchen des liposomalen Gentransfers für eukaryotische Zellen durch Felgner und Kollegen (Felgner et al., 1987), wurden die Transfektionsreagenzien hinsichtlich einer verminderten Toxizität und höherer Transfektionseffizienzen stetig verbessert (Templeton und Lasic, 1999). Dies ermöglichte es, nicht nur schnell-proliferierende Zell-Linien (Wiesenhofer and Humpel, 2000) sondern auch primäre, mesencephale Gewebeblöcke durch nicht-viralen Gentransfer zu erreichen (Bauer et al., 2000). Da bei der Transfektion von Gewebeblöcken aber bevorzugt die äußeren Schichten transfiziert werden, wurden die folgenden Versuche an primären Einzelzellkulturen (dissoziierte VM-Kulturen) durchgeführt. Eine wesentliche Grundlage dafür bilden die Untersuchungen von Studer und McKay (Studer et al., 1998), in denen dissoziierte, mesencephale Vorläuferzellen *in vitro* durch bFGF expandiert, anschließend differenziert und erfolgreich transplantiert wurden. Der Einsatz von bFGF bewirkt einerseits eine gesteigerte Zellproliferation und anderenseits eine verlangsamte Differenzierung der Vorläuferzellen (Bouvier et al., 1995), wodurch ein effektiver, nicht-

viraler Gentransfer erst möglich wird (Felgner et al., 1989). Als Transfektionsreagenzien wurden Effectene und Versuchslipide eingesetzt.

4.2.1 Transfektion mit Effectene (Qiagen)

Effectene wurde als Transfektionsreagenz verwendet, aufgrund von vielversprechenden Ergebnissen bei der Transfektion mesencephaler Gewebeblöcke (Bauer et al., 2000). Das dabei verwendete Transfektionsprotokoll mit 20 µl Effectene, 2 µg DNA und 15 h Inkubationszeit war jedoch für dissoziierte VM-Kulturen zu toxisch. Erst nach 10-facher Reduktion der eingesetzten Menge an DNA und Effectene konnten bei gleichzeitig deutlich verminderter Toxizität Transgen-positive Zellen nachgewiesen werden. Die erzielte Transfektionseffizienz war jedoch im Vergleich zu den Versuchen an VM-Gewebeblöcken wesentlich niedriger, was auf die relativ geringe Menge an verwendeter DNA und Effectene zurückzuführen sein könnte. Die Transfektionseffizienz eines Lipides wird daher auch durch dessen Toxizität beeinflusst (Caplen et al., 1994; Bell et al., 1998). Faktoren, die die relative Toxizität eines Lipides bestimmen sind unter anderem strukturelle Eigenschaften, wie die Ladung oder die Form der DNA-Lipid-Komplexe, die eingesetzte Lipidmenge, die Inkubationsdauer und der zu transfizierende Zelltyp (Caplen et al., 1994; Aramaki et al., 1999; Wiesenhofer et al., 1999). In aktuellen Studien konnte durch die liposomale Transfektion verschiedener Zelllinien die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies als ein weiterer, toxischer Faktor identifiziert werden (Aramaki et al., 1999; Aramaki et al., 2000). Diese Radikale werden vor allem durch das Enzym Lipoxygenase gebildet und induzieren durch die Zunahme von oxidativem Stress die Apoptose der Zellen (Takano et al., 2001). Durch die Zugabe von antioxidativen Substanzen oder Inhibitoren der Lipoxygenase konnte der durch die Transfektion bedingte Zelltod signifikant vermindert werden (Takano et al., 2001).

Die Reduktion des oxidativen Stress innerhalb der VM-Gewebeblöcke könnte auch eine mögliche Erklärung sein für die geringere Toxizität bei Transfektionen mit gleichen Effectene Konzentrationen im Vergleich zu dissoziierten Kulturen. Als Ursachen hierfür sind unter anderem zu diskutieren, die Erhöhung der antioxidativen Kapazität durch synergistische Effekte innerhalb des Zellverbandes oder die verminderte Exposition der einzelnen Zelle gegenüber den toxischen Transfektionsreagenzien, aufgrund der bei Gewebeblöcken reduzierten Zelloberfläche. Da die Zelloberfläche bei dissoziierten Zellkulturen nicht verändert werden kann, ist eine Verminderung der Toxizität nur durch Reduktion der eingesetzten Menge an Reagenzien, durch Zugabe antioxidativ-wirkender Substanzen, oder

durch Erhöhung der Zelldichte möglich. Die Zugabe von Natriumpyruvat, α-Thioglycerat, Bathocuproine Disulfonat (Brielmeier et al., 1998) und β-Mercaptoethanol (Lee et al., 2000) zur Reduktion von oxidativem Stress, ist bei VM-Gewebe deshalb vielversprechend, da neuronale Zellen nicht in der Lage sind Cystin zu transportieren. Dies beruht darauf, dass neuronale Zellen, im Gegensatz zu fast allen anderen Zelltypen, keinen Cystin-Transporter exprimieren (Murphy et al., 1989). Cystin oder das reduzierte Cystein sind aber von entscheidender Bedeutung für die Synthese von Glutathion, einem wichtigem antioxidativem Schutzsystem von Zellen. Üblicherweise liegt in Zellkultur nur oxidiertes Cystin vor, das aber durch Zugabe der oben genannten antioxidativen Substanzen zu Cystein reduziert und in dieser Form *in vitro* erhalten werden kann. Die Zugabe der antioxidativ-wirkenden Substanzen ermöglicht eine effiziente Aufnahme von reduziertem Cystein über den Ala-Ser-Cys-Aminosäuretransporter und verbessert so das Zellüberleben (Brielmeier et al., 1998). In einer Studie mit Burkitt-Lymphom-Zellen, die diesen Aminosäuretransporter ebenfalls nicht expremieren, konnte durch Zugabe der antioxidativen Substanzen die Effizienz stabiler Transfektionen deutlich erhöht werden (Brielmeier et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden aber keine quantitativen Untersuchungen über die Steigerung der Transfektionseffizienz durch Reduktion des oxidativen Stress bei der Transfektion dissoziierter VM-Kulturen durchgeführt.

4.2.2 Transfektion mit Versuchslipiden (Qiagen)

Bei den Transfektionsversuchen mit den Versuchslipiden wurden mit Versuchslipid 1 über 30 mal mehr Zellen transfiziert als mit Effectene. Die Toxizität der neuen Lipide war dabei wesentlich geringer. Daher war es möglich die in den Vorversuchen mit LAN-5 Zellen ermittelten Konzentrationen der Transfektionsreagenzien auch für das primäre Gewebe beizubehalten. Ein Grund für die geringe Toxizität könnte die Verwendung von Komponente 1 sein, da trotz hoher DNA-Konzentrationen vergleichsweise niedrige Lipidmengen benötigt werden. So war, im Unterschied zu Effectene, bei Anwendung der Versuchslipide die DNA-Menge ca. 5- bis 10-fach höher (1,35 µg DNA), während die Lipidmenge gleichzeitig nur um den Faktor 2 bis 4 anstieg (4,5 µl im besten Ansatz). Diese signifikante Steigerung der Transfektionseffizienz bei relativ niedriger Toxizität gibt Anlass für weitere Überlegungen zur Steigerung des Gentransfers. Augrund der niedrigen Toxizität könnten die Zellen beispielsweise an mehreren Tagen aufeinanderfolgend transfiziert werden ("boost"). So wurde bei Versuchen mit primären Gliazellen eine beachtliche Steigerungen der

Transfektionseffizienzen beobachtet, durch Transfektionen an drei aufeinanderfolgenden Tagen für je sechs Stunden (Wiesenhofer et al., 2000).

4.3 Immunhistochemische Charakterisierung des ventralen Mesencephalons der Ratte und der transfizierten Zellen

Die Ausbildung der embryonalen Anlage des ventralen Mesencephalons findet bei der Ratte zwischen E11 und E15 statt (Hanaway et al., 1972; Lauder und Bloom, 1974). Thyrosinhydroxylase (TH)-positive, dopaminerge Neuronen können frühestens ab E12.5 immunhistochemisch nachgewiesen werden. An E15 ist deren Bildung abgeschlossen (Specht et al., 1981; Lauder und Bloom, 1974). Durch Kultivierung unter definierten Bedingungen und Verwendung von bFGF kann der Zeitraum, in dem die Zellen als immature Vorläuferzellen vorliegen, verlängert werden (Bouvier et al, 1995, Fawcett et al., 1995, Studer et al., 1998). Als Grund für diese bFGF-vermittelten Effekte wird im Tiermodel unter anderem eine vermehrte Expression des Enzyms Telomerase diskutiert (Haik et al., 2000), welches über die Verlängerung der Telomere von Chromosomen die Seneszens von Zellen verlangsamt (Harley et al., 1990). Ein zellulärer Marker für immature Vorläuferzellen ist das Intermediärfilament Nestin (Lendahl et al., 1990). In Anlehnung an die Experimente von Studer und Kollegen (1998) wurde durch die tägliche Zugabe von 10 ng/ml bFGF die Expansion Nestin-positiver Vorläuferzellen bis zum fünften Tag *in vitro* verlängert. Differenzierte Strukturen, wurden erst nach dem Entzug von bFGF und der Zugabe von FCS in der Differenzierungsphase exprimiert. Sieben Tage nach Differenzierungsinduktion konnten GFAP-positive Gliazellen (Fisher et al., 1997), β-TUB III-positive Neurone (Lee et al., 1990) und auch TH-positive, dopaminerge Zellen beobachtet werden. Eine Untersuchung der prozentualen Anteile der jeweiligen Zellpopulation wurde nicht durchgeführt. In den Versuchen von Studer und Kollegen (1998) konnte aber unter Anwendung dieses Expansions- und Differenzierungsschemas die Zahl dopaminerger Neuronen um das 30-fache gesteigert werden. Der große Anteil an dopaminergen Neuronen, die sich aus den proliferierenden, Nestin-positiven Vorläuferzellen bildeten, war entscheidend, um trotz der niedrigen Transfektionseffizienz des nicht-viralen Gentransfers TH-positive Neuronen zu transfizieren.

4.4 Perspektiven und Ausblicke

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Zellsystems dissoziierter, neuronaler Vorläuferzellen des ventralen Mesencephalons der Ratte und deren nicht-virale Transfektion.

Das entwickelte Zellsystem ermöglicht weitere Untersuchungen zum therapeutischen Gentransfer im Rahmen einer Zelltherapie des Morbus Parkinson.

Ein wesentliches Problem der Zelltherapie des Morbus Parkinson ist der Mangel an fötalem Gewebe für eine Transplantation. Da nach heutigen Transplantationsprotokollen nur ca. 1 bis 20 % der transplantierten, embryonalen Zellen langfristig überleben (Dunnett und Björklund, 1999), wird Gewebe von mindestens vier bis acht Föten pro Striatum für eine signifikante Symptomreduktion benötigt (Brundin et al., 2000). Eine Methode mit ständigem Bedarf an humanen Föten ist für eine breite, klinische Anwendung jedoch aus ethisch-moralischen Gründen nicht vertretbar und kann nur als experimentelles Therapieverfahren eingesetzt werden (zur Übersicht, Boer et al., 1994). Als Alternativen für humanes Gewebe werden zur Zeit vor allem der Einsatz von Xenotransplantaten oder Stammzellen untersucht. Gleichzeitig werden Wege zur Verbesserung des Überlebens des Transplantats gesucht, wie z.B. der Schutz durch neurotrophe Faktoren.

Erste Versuche mit Mittelhirn-Gewebe des Schweins als Xenotransplantat zeigten im Rattenmodel vielversprechende Ergebnisse (Galpern et al., 1996), ebenso wie erste Anwendungen bei Parkinson Patienten (Deacon et al., 1997). Trotz der möglichen Erfolge ist die Methode der Xenotranplantation dennoch nicht unumstritten. Ein Grund ist das mögliche Auftreten von komplementvermittelten Transplantatabstoßungen (Weiss et al., 1997). Ein weiteres Risiko der Xenotransplantation ist der mögliche Transfer unbekannter, endogener Retroviren des Schweins auf den Menschen mit Folgen wie das Auftreten von HIV-ähnlichen Epidemien (Butler et al., 1998; Weiss et al., 1997). Kritisiert wird auch die niedrige Überlebensrate der transplantierten Neuronen, die wesentlich weniger als ein Promille beträgt (Deacon et al., 1997). Aus diesen Gründen wird in aktuellen Artikeln der Einsatz der Xenotranplantation als zukünftige Zelltherapie des MP zunehmend in Frage gestellt (Hagell und Brundin, 2001; Dunnett et al., 2001).

Als alternative Quelle dopaminerger Neurone wird deren Generierung aus humanen, embryonalen Stammzellen angesehen. Seit Isolierung dieser pluripotenten Zellen aus Blastocysten (Thomson et al., 1998) sind sie als Quelle somatischer Vorläuferzellen von großem Interesse für die klinische Forschung. In Versuchen mit embryonalen Stammzellen der Maus sind neben Kardiomyozyten und hämatopoetischen Zellen auch Zellen mit neuronalem Phänotyp beobachtet worden (Klug et al., 1996; Keller et al., 1998; Okabe et al., 1996). In Bezug auf eine Zelltherapie des MP, sind aktuelle Protokolle zur Differenzierung embryonaler Stammzellen über mehrere *in vitro* Schritte in dopaminerge Neuronen vielversprechend (Lee et al., 2000). Eine Anwendung der tierexperimentellen Erkenntnisse

auf humane, embryonale Stammzellen ist jedoch zur Zeit in Deutschland, aufgrund des Embryonenschutzgesetzes und Diskussionen der Öffentlichkeit über ethische Bedenken nicht möglich. Kritisch hinterfragt wird auch, ob für die Forschung oder zumindest für die klinische Anwendung die Arbeit an adulten Stammzellen nicht ausreichend wäre. Diese Zellen konnten aus dem Subependym des Frontalhirns (Morshead et al., 1994) isoliert, kultiviert und in verschiedene neuronale Zelltypen differenziert werden (Palmer et al., 1995). Dennoch sind bei adulten ZNS-Stammzellen mögliche Restriktionen in ihrer Differenzierungsfähigkeit noch nicht völlig auszuschließen (McKay, 1997). Außerdem besteht sowohl bei embryonalen, als auch adulten Stammzellen das Problem der genetischen und der epigenetischen Instabilität, aufgrund der ständigen *in vitro* Proliferation und Selektion auf Zellen mit hohem mitotischen Index (Humpherys et al., 2001). Dies kann unter Umständen eine tumorähnliche Proliferation nach deren Transplantation zu Folge haben, auch wenn dies bisher noch nicht beobachtet wurde. Für zukünftige Stammzelltherapien sind die Klärung dieser Fragen und die Definition ethischer Grundsätze entscheidend.

Für eine erfolgreiche Zelltherapie neurodegenerativer Erkrankungen ist aber nicht nur eine ausreichende Menge an transplantierbarem Gewebe bedeutsam, sondern auch eine Verbesserung des Überlebens des Transplantats. Neben der Verfeinerung der operativen Techniken, wird auch die Wirkung antioxidativer, antiapoptotischer oder neurotropher Strategien untersucht (zur Übersicht, Brundin et al., 2000). Unter anderem konnte durch den Einsatz neurotropher Faktoren wie z.B. BDNF oder GDNF eine signifikante Verbesserung des Zellüberlebens festgestellt und auch im Tiermodel bestätigt werden (Levivier et al., 1995; Choi-Lundberg et al., 1997; Bauer et al., 2000). Dabei scheint die Methode der Faktorproduktion durch genetisch-modifizierte Zellen einer intrazerebralen Injektion der Substanzen überlegen zu sein (Kordower et al., 1999). Zukünftige Zelltherapien sollten daher auch die Möglichkeit zur genetischen Manipulation des zu transplantierenden Gewebes bieten, um eine Verbesserung des Transplantationsergebnisses zu erzielen.

In der vorgelegten Arbeit wurde ein Kultursystem dissoziierter, neuronaler Vorläuferzellen des ventralen Mesencephalons der Ratte etabliert, und eine nicht-virale Transfektion dieser Zellen ermöglicht. Die hier etablierte Methode des nicht-viralen Gentransfers ist in ihren Einsatzmöglichkeiten bei verschiedenen Geweben oder Transgenen in hohem Maße variabel. Dies eröffnet die Möglichkeit auch neuen Entwicklungen Rechnung tragen zu können und die Auswirkungen verschiedenster Transgene auf die Expansion und Differenzierung der Vorläuferzellen gezielt zu untersuchen. Die sich entwickelnden Möglichkeiten des nicht-

viralen Gentransfers, lässt einen zukünftigen Beitrag gentherapeutischer Verfahren zur Verbesserung der Neurotransplantation bei Morbus Parkinson erhoffen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung einer dissoziierten Kultur mesencephaler Vorläuferzellen der Ratte und deren nicht-virale Modifikation mittels kationischer Lipide.

In Vorversuchen wurden Faktoren zur Optimierung nicht-viraler Transfektionsverfahren ermittelt. Zur Untersuchung des Einflusses der Zellproliferation auf die Transfektionseffizienz, wurden LAN-5 Neuroblastomzellen in zwei Ansätzen mit unterschiedlichem mitotischen Index mittels Effectene (Qiagen, Hilden) transfiziert. Es konnte gezeigt werden, dass proliferierende LAN-5 Zellen fast 15-fach höhere Transfektionsraten bei der Transfektion mit Effectene erzielen. In dem selben Versuchsansatz wurde die Transfektionsrate des klonierten RSV-GFP, basierend auf dem pRep7-Konstrukt, mit der des bereits bekannten CMV-GFP Plasmids verglichen. Im Gegensatz zu den Erwartungen wurden mit dem pRep7-Konstrukt deutlich niedrigere Effizienzen beobachtet.

Das VM-Gewebe wurde in dissoziierten *in vitro* Kulturen gemäß den Protokollen von Studer und Kollegen (1998) kultiviert. Durch Gabe von bFGF wurden die neuronalen Vorläuferzellen zunächst expandiert, und erst durch Entzug von bFGF und Zugabe von fetalem Kälber Serum setzte die Differenzierung ein. Dies konnte mit immunhistochemischen Markern nachgewiesen werden. Da die Protokolle zur Transfektion von organotypischen VM-Kulturen mit Effectene zu toxisch für dissoziierte Vorläuferzellen waren, musste die eingesetzte Menge an Effectene (Qiagen, Hilden) um das 10-fache reduziert werden. Im Vergleich zu Effectene, erzielten die getesteten Versuchslipide (Qiagen, Hilden) bis zu 31-mal höhere Transfektionseffizienzen. Die immunhistochemische Charakterisierung der transfizierten Zellen belegte die Transfektion TH-positiver Neurone.

Durch die vorgelegte Arbeit konnten Methoden zur genetischen Modifikation primären mesencephalen Gewebes etabliert werden, die auf chemisch genau definierten Lipid-Komponenten beruhen und die nicht mit den Risiken viraler Vektorsysteme behaftet sind. Durch den effizienten Einsatz Lipid-vermittelten Gentransfers entstehen damit neue Perspektiven für einen möglichen Einsatz nicht-viraler Transfektionsverfahren in *ex vivo* Gentherapie-Ansätzen.

6 LITERATUR

Agid, Y. Levodopa: is toxicity a myth? Neurology (1998). 40: 858-63.

Ambinder, R.F., Mullen, M., Chang, Y.N., Hayward, G.S., Hayward, D. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. J Virol (1991). 65: 1466-78.

Aramaki, Y., Takano, S., Tsuchiya, S. Induction of apoptosis in macrophages by cationic liposomes. FEBS Letters (1999). 460: 472-6.

Baas, H., Deuschl, G., Oertel, W.H., Poewe, W.H. Medikamentöse Therapie der Parkinson-Krankheit. Dt Ärzteblatt (1996). 93: A2470-7.

Bauer, M., Ueffing, M., Gasser, T. Somatic gene therapy in animal models of Parkinson´s disease. J Neural Transm Suppl (1999). 55: 131-47.

Bauer, M., Meyer, M., Grimm, L., Meitinger, T., Zimmer, J., Gasser, T., Ueffing, M., Widmer, H.R. Non-viral GDNF gene transfer enhances survival of cultured dopaminergic neurons and improves their functions and survival after transplantation in a rat model of Parkinson´s disease. Hum Gene Ther (2000). 1529-41.

Bauer, M., Meyer, M., Sauter, J., Gasser, T., Ueffing, M., Widmer, H.R. Liposome-mediated gene transfer to fetal human ventral mesencephalic explant cultures. Neuroscience letters (2001). 308: 169-72.

Beck, K.D., Valverde, J., Alexi T., Poulsen, K., Moffat, B., Vandlen, R.A., Rosenthal, A., Hefti, F. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. Nature (1995). 373: 339-41.

Bell, H., Wendy, L.K., Mingwei, L., Whittle, I.R. Liposomal transfection efficiency and toxicity on glioma cell lines: in vitro and in vivo studies. Neuroreport (1998). 9:793-8.

Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., Seitelberger, F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. J Neurol Sci (1973). 20: 415-455.

Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson´s disease. Nat Neurosci (2000). 3(12): 1301-6.

Björklund, A., Lindvall, O. Parkinson´s disease gene therapy moves toward the clinic. Nat Med (2000) 6(11): 1207-8.

Björklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B., Iversen, S.D. Functional reactivation of the deafferented neostriatum by nigral transplants. Nature (1981). 289: 497-9.

Boer, G.J. Ethical guidelines for the use of human embryonic or fetal tissue for experimental and clinical neurotransplantation and research. J Neurol (1994). 242: 1-13.

Bohn, M.C., Choi-Lundberg, D.L. Gene therapies for Parkinson´s disease. Gene Therapy for Neurological Disorders and Brain Tumors (1998). In: Chiocca, E.A., Breakfield, X.O., eds. Humana Press, Towata, NJ, 377-95.

Bouvier, M.M., Mytilineou, C. Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. J Neurosci (1995). 15(11): 7141-49.

Brielmaier, M., Béchet, J.M., Falk, M.H., Pawlita, M., Polack, A., Bornkamm, G.W. Improving stable transfection efficiency: antioxidants dramatically improve the outgrowth of clones under dominant marker selection. Nucleic Acid Research (1998). 26(9): 2082-85.

Brooks, D.J. The early diagnosis of Parkinson´s disease. Ann Neurol (1998). Suppl 44: S10-S18.

Brücke, T., Djamshidian, S., Benscits, G., Pirker, W., Asenbaum, S., Podreka, I. SPECT an PET imaging of the dopaminergic system in Parkinson´s disease. Journal of Neurology (2000). 242, Suppl. 4: IV/2-IV/7

Brüstle, O., Maskos, U., McKay, R.D.G. Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain. Neuron (1995). 12: 514-17.

Brundin, P., Karlsson, J., Emgard, M., Kaminski Schierle, G.S., Hansson, O., Petersén, A., Castilho, R.F. Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. Cell Transpl (2000). 9: 179-93.

Butler, D. Last chance to stop and think on risks of xenotransplants. Nature (1998) 391(22): 320-4.

Calne, D.B., Teychenne, P.E., Leigh, P.N., Bamji, A.N., Greenacre, J.K. Treatment of parkinsonism with bromocriptin. Lancet (1974). 2: 1355-6.

Caplen, N.J., Kinrade, E., Sorgi, F., Gao, X., Gruenert, D., Geddes, D., Coutelle, C., Huang, L., Alton, E.W., Williamson, R. In vitro liposome-mediated DNA transfection of epithelial cell lines using cationic liposome DC-Chol/DOPE. Gene Therapy (1995). 2: 603-13.

Chase, T.N., Engber, T.M., Mouradian, M.M. Palliative and prophylactic benefits of continuously administered dopaminomimetics in Parkinson´s disease. Neurology (1994). 44: Suppl 6: S15-S18.

Chesnoy, S., Huang, L. Structures and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. Annu Rev Biomol Struct (2000). 29: 27-47.

Choi-Lundberg, D.L., Lin, Q., Chang, Y.N., Chiang, Y.L., Hay, C.M., Mohajeri, H., Davidson, B.L., Bohn, M.C. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. Science (1997). 46: 419-24.

Chouza, C., Ketzoian, C., Caamano, J.L., Caceres, R., Coirolo, G., Dieguez, E., Rega, I., Battistin, L., Scarlato, G., Caraceni, T., Ruggieri, S. Prevalence of Parkinson's disease in a Population in Uruguay. Advances in Neurology. Philadelphia, Lippincott-Raven, (1996).13-7.

Clarke, D.J., Brundin, P., Strecker, R.E., Nilsson, O.G., Björklund, A., Lindvall, O. Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson´s disease: Ultrastructural evidence for synapse formation using tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. Exp Brain Res (1988). 73: 115-26.

Cotzias, G.C., Papavasiliou P.S., Gellene R. Modification of parkinsonism – chronic treatment with L-DOPA. N Engl J Med (1969). 280: 337-45.

Curtis, L., Lees, A.J., Stern, G.M., Marmot, M.G. Effect of L-dopa on the course of Parkinson's disease. Lancet (1984). 2: 211-2.

van Craenenbroeck, K., Vanhoenacker, P., Haegeman, G. Episomal vectors for gene expression in mammalian cells. Eur J Biochem (2000). 267(18): 5665-78.

Deacon, T., Schumacher, J., Dinsmore, J., Thomas, C., Palmer, P., Isacson, O. Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. Nat Med (1997). 3(3): 350-3.

Dowty, M.E., Williams, P., Zhang, G., Hagstrom, J., Wolff, J.A. Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. Proc Natl Acad Sci (1995). 92: 4572-6.

Dunnett, S.B., Björklund, A. Staging and dissection of rat embryos. Dunnett S.B., Björklund, A. Neural transplantation. A practical approach. Oxford, Oxford University Press, (1992). 1-19.

Dunnett, S.B., Björklund, A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson´s disease. Nature (1999). 399, upp: A32-A39.

Dunnett, S.B., Björklund, A., Lindvall, O. Cell therapy in Parkinson´s disease – stop or go? Nat Rev Neurosci (2001). 2(5): 365-9.

Ebadi, M., Srinivasan, S.K., Baxi, M.D. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson´s disease. Prog Neurobiol (1996). 48: 1-19.

Fahn, S., Cohen, G. The oxidative stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. Arch Neurol (1992). 32: 804-12.

Fawcett, J.W., Barker, R.A., Dunnett, S.B. Dopaminergic neuronal survival and the effects of bFGF in explant, three dimensional and monolayer cultures of embryonic rat ventral mesencephalon. Exp Brain Res (1995). 106(2): 275-82.

Fearnley, J.M., Lees, A.J. Ageing and Parkinson´s disease: substantia nigra regional selectivity. Brain (1991). 114: 2283-301.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northorp, J.P., Ringold, G.M., Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci (1987). 84(21):7413-7.

Felgner, P.L., Ringold, G.M. Cationic liposome-mediated transfection. Nature (1989). 337: 387-8.

Felgner, P.L., Rhodes, G. Gene therapeutics. Nature (1991). 349: 351-2.

Fishell, G. Striatal precursors adopt cortical identities in response to local cues. Development (1995). 121: 803-12.

Fisher, L.J., Jinnah, H., Kale, L., Higgins, G., Gage, F. Survival and function of intrastriatally grafted primary fibroblasts genetically modified to produce L-DOPA. Neuron (1991). 6: 371-80.

Fisher, L.J. Neural precursor cells: applications for the study and repair of the central nervous system. Neurobiol Dis (1997). 4: 1-22.

Forno, L.S. Neuropathology of Parkinson's disease. J of Neuropath and Exp Neurol (1996). 55(3): 259-72.

Freed, C.R., Greene, P.E., Breeze, R.E., Tsai ,W.-Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J.Q., Eidelberg, D., Fahn, S. Transplantation of

embryonic dopamine neurons for severe Parkinson´s disease. N Engl J Med (2001). 344(10): 710-19.

Fred, W.J., Geller, H.M., Poltorak, M., Cannon-Spoor, H.E., Cottingham, S.L., La Marca, M.E. Genetically altered and defined cell lines for transplantation in animal models of Parkinson´s disease. Prog Brain Res (1990). 82: 11-21.

Gage, F.H., Ray, J., Fisher, L.J. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. Ann Rev Neurosci (1995). 18: 159-92.

Gage, F.H. Mammalian neural stem cells. Science (2000). 287: 1433-1438.

Gai, W.P., Blessing, W.W., Blumbergs, P.C. Ubiquitin-positive degenerating neurites in the brainstem in Parkinson´s disease. Brain (1995). 118: 1447-59.

Galpern, W.R., Burns, L.H., Deacon, T., Dinsmore, J., Isacson, O. Xenotransplantation of porcine fetal ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease: functional recovery and graft morphology. Exp Neurol (1996). 140: 1-13.

Gash, D.M., Zhang, Z.M., Ovadia, A., Cass, W.A., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P.A., Collins, F., Hoffer, B.J., Gerhardt, G.A. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. Nature (1996). 373: 339-41.

Gasser, T., Müller-Myhsok, B., Wszolek, Z., Oehlmann, R., Calne, D.B., Bonifati, V., Bereznai, B., Fabrizio E., Vieregge, P., Horstmann, R. A susceptibility locus for Parkinson´s disease maps to chromosome 2p13. Nature Genet (1998). 18: 262-265.

Haik, S., Gauthier, L.R., Granotier, C., Peyrin, J.M., Lages, C.S., Dormont, D., Boussin, F.D. Fibroblast growth factor 2 upregulates telomerase activity in neural precursor cells. Oncogene (2000) 19: 2957-66.

Hanaway, J., Mc Connel, J., Netsky, M.G. Histogenesis of the substantia nigra, ventral tegmental area of tsai and interpeduncular nucleus: an autoradiographic study of the mesencephalon in the rat. J Comp Neurol (1972). 142: 59-74.

Hagell, P., Schrag, A., Piccini, P., Jahanshahi, M., Brown, R., Rehncrona, S., Widner, H., Brundin, P., Rothwell, J.C., Odin, P., Wenning, G.K., Morrish, P., Gustavii, B., Björklund, A., Brooks, D.J., Marsden, C.D., Quinn, N.P., Lindvall, O. Sequential bilateral transplantation in Parkinson´s disease. Brain (1999). 122: 1121-32.

Hagell, P., Brundin, P. Cell survival and clinical outcome following intrastriatal Transplantation in Parkinson disease. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology (2001) 60(8): 741-52.

Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature (1990) 345(6274): 458-60.

Hely, A.H., Morris, G.L. Controversies in the treatment of Parkinson's disease. Curr Op Neurol (1996). 9: 308-13.

Hely, M.A., Morris, J.G.L., Reid, W.G.J., O'Sullivan, D.J., Williamson, P.M., Rail, D., Broe, G.A., Margrie, S. The Sydney Multicentre Study of Parkinson´s disease: a randomised, prospective five year study comparing low dose bromocriptine with low dose levodopa-carbidopa. J Neurol Neurosurg Psychiatry (1994). 57: 903-10.

Hirsch, E.C., Faucheux, B.A. Iron metabolism and Parkinson´s disease. Mov Disord (1998). 13: 39-45.

Holt, C.E., Garlick, N., Cornel, E. Lipofection of cDNAs in the embryonic vertebrate central nervous system. Neuron (1990). 4: 203-14.

Holthoff-Detto, V.A., Kessler, J., Herholz, K., Bonner, H., Pietrzyk, U., Wurker, M., Ghaemi, M., Wienhard, K., Wagner, R., Heiss, W.D. Funtional effects of striatal dysfuntion in Parkinson´s disease. Arch Neurol (1997). 54: 145-50.

Horellou P., Guibert B. Retroviral transfer of a human tyrosine hydroxylase cDNA in various cell lines: regulated release of dopamine in mouse anterior pituitary AtT-20 cells. Proc Natl Acad Sci USA (1989). 86: 7233-7.

Horowski, R., Obeso, J.A. Lisuride: a direct dopamin agonist in the treatment of Parkinson´s disease. In: Koller, W.C., Paulson, G., eds. Therapy of Parkinson´s disease. 2nd ed. rev. New York: Marcel Dekker (1995). 219-48

Hughes, A.J., Daniel, S.E., Blankson, S., Lees, A.J. A clinicopathological study of 100 cases of Parkinson's disease. Arch Neurol (1993). 50: 140-9.

Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout, W.M., Biniszkiewicz, D., Yanagimachi, R., Jaenisch, R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. Science (2001). 293: 95-97.

Jenner, P. The rational for the use of dopamine agonists in Parkinson's disease. Neurology (1995). 45: Suppl 3: S6-S12.

Jenner, P., Olanow, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson´s disease. Neurology (1996). 47, Suppl 3: S161-S170.

Jenner, P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson´s disease. Mov Disord (1998). 13, Suppl 3: 24-34.

Jiao, S., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L., Wolff, J. Persistence of plasmid DNA and expression in rat brain cell in vivo. Exp Neurol (1992). 115: 400-13.

Johe, K.K., Hazel, T.G., Müller, T., Dugich-Djordjevic, M.M., McKay, R.D.G. Single factors direct the differentiation of stem cells from the fetal and adult central nervous system. Genes & Development (1996). 10: 3129-40.

Keller, G., Wall, C., Fong, A.Z., Hawley, T.S., Hawley, R.G. Overexpression of HOX11 leads to the immortalization of embryonic precursors with both primitive and definitive hematopoietic potential. Blood (1998). 92: 877-87.

Kish, S.J., Shannak, K., Hornykiewicz, O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson´s disease. Pathophysiologic and clinical implications. N Engl J Med (1988). 318: 876-80

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., Shimizu, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature (1998). 392: 605-608.

Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y., Field, L.J. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intracardiac grafts. J Clin Invest (1996). 98: 216-24.

Kordower, J.H., Palfi, S., Chen, E.Y., Ma, S.Y., Sendera, T., Cochran, E.J., Mufson, E.J., Penn, R., Goetz, C.G., Comella, C.D. Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson´s disease. Ann Neurol (1999). 46: 419-24

Kordower, J.H., Emborg, M.E., Bloch, J., Ma, S.Y., Chu, Y., Leventhal, L., McBride, J., Chen, E.Y., Palfi, S., Roitberg, B.Z., Brown, W.D., Holden, J.E., Pyzalski, R., Taylor, M.D., Carvey, P., Ling, Z., Trono, D., Hantraye, P., Deglon, N., Aebischer, P. Neurodegeneration prevented by lentiviral delivery of GDNF in primate models of Parkinson´s disease. Science (2000). 290: 767-73.

Lang, A.E., Lozano, A. Parkinson´s disease; First of two parts. N Engl J Med (1998). 339 (15): 1044-1053.

Lang, A.E., Lozano, A. Parkinson´s disease; Second of two parts. N Engl J Med (1998). 339 (16): 1130-1143.

Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. Science (1983). 219: 979-80.

Latchman, D.S., Coffin, R. Viral vectors in the treatment of Parkinson´s disease. Mov Disord (2000). 15(1): 9-17

Lauder, J.M., Bloom, F.E. Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. J Comp Neurol (1974). 155: 469-82.

Lee, M.K., Tuttle, J.B., Rebhun, L.I., Cleveland, D.W., Frankfurter, A. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. Cell Motil Cytoskeleton (1990). 17(2): 118-32.

Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., McKay, R.D.G. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nat Biotech (2000) 18: 675-79.

Lees, A.J. Comparison of therapeutic effects and mortality data of levodopa and levodopa combined with selegiline in patients with early, mild Parkinson’s disease. BMJ (1995). 311: 1602-9.

Lendahl, U., Zimmerman, L.B., McKay, R.D.G. CNS Stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell (1990). 60: 585-95.

Levivier, M., Przedborski, S., Bencsics, C., Kang, U. Intrastriatal implantation of fibroblast genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson´s disease. J Neurosci (1995). 15: 7810-20.

Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S., Collins, F. GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science (1993). 260: 1130-2.

Lindsay, R.M. Neuron saving schemes. Nature (1995). 373: 289-90.

Lindvall, O., Rehncrona, S., Brundin, P., Gustavii, B., Astedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Björklund, A., Leenders, K.L., Rothwell, J.C. Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. Arch Neurol (1989). 46: 615-31.

Lindvall, O., Clinical application of neuronal grafts in Parkinson's disease. J Neurol (1994). 242, Suppl 1: S54-6.

Madrazo, I., Leon, V., Torres, C., Aguilera, M.C., Varela, G., Alvarez, F., Fraga, A., Drucker-Colin, R., Ostrosky, F. and Skurovich, M. Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. N Engl J Med (1988). 318: 51

Manyam, B.V. Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise. Mov Disord (1990). 5: 47-8.

Marsden, C.D. Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatr (1994). 57: 672-81.

McKay, R.D.M. Stem cells in the central nervous system. Science (1997). 276: 66-71.

Mizuno, Y. Mov Disord Neurological Principles and Practice. (eds Watts, R.L., Koller, W.C.) 161-182 (McGraw-Hill, New York, 1997).

Moghal, S., Rajput, A.H., D'Arcy, C., Rajput, R. Prevalence of movement disorders in elderly community residents. Neuroepidemiology (1994). 13: 175-8.

Montastruc, J.L., Ziegler, M., Rascol, O. and Malbezin, M. A randomized, double-blind study of a skin patch of a dopaminergic agonist, piribedil, in Parkinson's disease. Mov Disord (1999). 14(2): 336-41.

Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S., van der Kooy, D. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. Neuron (1994). 13: 1071-82.

Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L., Coyle, J.T. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. Neuron (1989). 2: 1547-1558.

Mytilineou, C., Radcliffe, P.M., Olanow, C.W. L-(-)-desmethylselegiline, a metabolite of selegiline [L-(-)-deprenyl], protects mesencephalic dopamine neurons from excitotoxicity in vitro. J Neurochem (1997). 68: 434-6.

Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., Trono, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science (1996). 272: 263-7.

Nishino, H., Hida, H., Takei, N. Kumazaki, M., Nakajiama, K., Baba, H. Mesencephalic neural Stem (Progenitor) cells develop to dopaminergic neurons more strongly in dopamine-depleted striatum than intact striatum. Exp Neurol (2000). 164: 209-14.

Ogris, M., Brunner, S., Schuller, S., Kircheis, R., Wagner, E. Pegylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interactions with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. Gene Ther (1999). 6: 595-605

Okabe, S., Forsberg-Nilsson, K., Spiro, A.S., Segal, M., McKay, R.D.G. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mech Dev (1996). 59: 89-102.

Olanow, C.W. An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. Ann Neurol (1992). 32: S2-S9.

Olanow, C.W., Hauser, R.A., Gauger, L., Malapira, T., Koller, W., Hubble, J., Bushenbark, K., Lilienfeld, D., Esterlitz, J. The effect of deprenyl and levodpa on the progression of Parkinson´s disease. Ann Neurol (1995). 38: 771-7

Olanow, C.W., Fahn, S., Langston, J.W., Godbold, J. Selegilin and mortality in Parkinson´s disease. Ann Neurol (1996). 40: 841-5.

Olanow, C.W., Kordower, J.H., Freeman, T.B. Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. Trends Neurosci (1996). 19: 102-9.

Olanow, C.W., Watts, R.L., Koller, W.C. An algorithm (decision tree) for the managment of Parkinson´s disease (2001): Treatment guidelines. Neurology (2001). 56, Suppl 5: S1-S88.

Pakkenberg, B., Möller, A., Gundersen, H.J., Mouritzen Dam A., Pakkenberg, H. The absolut number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson disease estimated with an unbiased stereological method. J Neurol Neurosurg Psychiatry (1991). 54: 30-33.

Palmer, T.D., Ray, J., Gage, F.H. FGF-2 responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of adult rodent brain. Mol Cell Neurosci (1995). 6: 474-86.

Parkinson, J. An Essay on the Shaking Palsy. Sherwood, Neely & Jones, London, (1817).

Patridge, T.A., Davies, K.E. Myoblast-based gene therapies. Br Med Bull (1995). 51: 123-37.

Pearce, R.K., Jackson, M., Smith, L., Jenner, P., Marsden, C.D. Chronic L-DOPA administration induces dyskinesias in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated common marmoset. Mov Disord (1995). 10: 731-40.

Perlow, M.J., Freed, W.J., Hoffer, B.J., Seiger, A., Olson, L., Wyatt, R.J. Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. Science (1979). 204: 643-7.

Poewe, W.H., Lees, A.J., Stern, G.M. Low-dose L-dopa therapy in Parkinson's disease: a 6-year follow-up study. Neurology (1986). 36: 1528-30.

Polymeropoulos, M., Higgins, J., Golbe, L. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-23. Science (1996). 274: 1197-9.

Rajput, A.H., Uitti, R.J., Offord, K.P. Timely levodopa (LD) administration prolongs survival in Parkinson´s disease. Parkinsonism Relat Disord (1997). 3:159-65.

Ray, J., Gage, F.H. Gene transfer into established and primary fibroblast cell lines. Bio Techinques (1992). 13: 598-603.

Remy, J.S., Sirlin, C., Vierding, P., Behr, J.P. Gene transfer into hepatoma cells with lipopolyamine-condensed DNA particles presenting galactose ligands: a stage towards artificial viruses. Proc Natl Acad Sci (1995). 92: 1744-8.

de Rijk M.C., Tzourio, C., Breteler, M.M.B., Dartigues, J.F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., Alperovitch, A., Rocca, W.A. Prevalence of parkinsonism and Parkinson´s disease in Europe: The EUROPARKINSON Collaboration Study. J Neurol Neurosurg Psychiatr (1997). 62: 10-5.

de Rijk, M.C., Launer, L.J., Berger, K., Breteler, M.M.B., Dartigues, J.-F., Baldereschi, M., Fratiglioni, L., Lobo, A., Martinez-Lage, J., Trenkwalder, C., Hofman, A. Prevalence of Parkinson´s disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurology (2000). 54, Suppl 5: S21-S27.

Roos, R.A.C., Vredevoogd, C.B., Vandervelde, E.A. Response fluctuations in Parkinson's disease. Neurology (1990). 40: 1344-6.

Sage, J.I., Sonsalla, P.K., Mc Hale, D.M., Heikkila, R.E., Duvoisin, R.C. Clinical experience with duodenal infusions of levodopa for the treatment of motor fluctuations in Parkinson´s disease. Adv Neurol (1990). 53: 383-6.

Sánchez-Pernaute, R., Studer, L., Bankiewicz, K.S., Major, E.O., McKay, R.D.G. In vitro generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. J Neurosci res (2001). 65: 284-288.

Schapira, A.H.V., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. Lancet (1989). 1, 1269.

Schapira, A.H.V. Neurotoxicity and the mechanisms of cell death in Parkinson's disease. Battistin L, Scarlato G, Caraceni T, Ruggieri S. Advances in Neurology. Philadelphia, Lippicott-Raven, (1996). 161-5.

Schumacher, J.M., Ellias, S.A., Palmer, E.P., Kott, H.S., Dinsmore, J., Dempsey, P.K., Fischman, A.J., Thomas, C., Feldman, R.G., Kassissieh, S., Raineri, R., Manhart, C., Penney, D., Fink, J.S., Isacson, O. Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. Neurology (2000). 54: 1042-50.

Specht, L., Pickel, V., Joh, T., Reis, D. Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. J Comp Neurol (1981). 199: 233-53.

Spenger, C., Studer, L., Evtouchenko, L., Egli, M., Burgunder, J.M., Markwalder, R., Seiler, R.W. Long-term survival of dopaminergic neurons in free-floating roller tube cultures of human fetal ventral mesencephalon. J Neurosci Meth (1994). 54: 63-73.

Spillantini, M.G. α-Synuclein in Lewy bodies. Nature (1997). 388: 839-890.

Sidell, N., Altmann, A., Haussler, M.R., Seeger, R.C. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several neuroblastoma cell lines. Exp Cell Res (1983). 148: 21-30.

Sidell, N., Lucas, C.A., Kreutzberg, G.W. Regulation of Acetylcholinesterase activity by retinoic acid (RA) in a human neuroblastoma cell line. Exp Cell Res (1984). 155: 305-309.

Studer, L., Tabar, V., McKay, R.D.G. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. Nature Neurosci (1998). 1(4): 290-5.

Takano, S., Aramaki, Y., Seishi, T. Lipoxygenase May Be Involved in Cationic Liposome-Induced Macrophage Apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications (2001). 288: 116-20.

Temple, S. Stem cells plasticity – building the brain of our dreams. Nat Rev Neurosci (2001). 2: 513-20.

Templeton, N.S., Lasic, D.D. New directions in liposome gene delivery. Mol Biotechnol (1999). 11(2):175-80.

The Parkinson Study Group. Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. N Engl J Med (1993). 328: 176-83.

The Parkinson Study Group. Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring levodopa. Ann Neurol (1996). 39: 37-45.

The Parkinson Study Group. Mortality in DATATOP: a multicenter trial in early Parkinson´s disease. Ann Neurol (1998). 43: 318-25.

The Parkinson Study Group. Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. The journal of the American medical association (2002). 287(13): 1653-61.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science (1998). 282: 1145-47.

Tomiyasu, K., Satoh, E., Oda, Y., Nishizaki, K., Kondo, M., Imanishi, J., Mazda, O. Gene transfer in vitro and in vivo with Epstain-Barr virus-based episomal vector results in markedly high transient expression in rodent cells. Biochem Biophys Res Comm (1998). 253(3): 733-8.

Vicario-Abejón, C., Johe, K.K., Hazel, T.G., Collazo, D., McKay, R.D.G. Functions of basic fibroblast growth factor and neurotrophins in the differentiation of hippocampal neurons. Neuron (1995). 15: 105-114.

Waters, C.H., Kurth, M.C., Bailey, P.A., Shulman, L.M., LeWitt, P., Dorflinger, E., Deptula, D., Pedder, S. Tolcapone in stable Parkinson's disease: efficacy and safety in long-term treatment. Tolcapone Stable Sudy Group. Neurology (1997). 49: 665-71.

Weiss, R.A. Transgenic pigs and virus adaptation. Nature (1998). 391: 327-8.

Wenning, G.K., Odin, P., Morrish, P., Rehncrona, S., Widner, H., Brundin, P., Rothwell, J.C., Brown, R., Gustavii, B., Hagell, P., Jahanshahi, M., Sawle, G., Björklund, A., Brooks, D.J.,

Marsden, C.D., Quinn, N.P., Lindvall, O. Short-and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. Ann Neurol (1997). 42: 95-107.

Wiesenhofer, B., Humpel, C. Lipid-mediated gene transfer into primary neurons using FuGene: Comparison to C6 glioma cells and primary glia. Exp Neurol (2000). 164: 38-44.

Yates, J.L., Warren, N., Sudgen, B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. Nature (1985). 313: 812-5.

Zanta, M.A., Belguise-Valladier, P., Behr, J.P. Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to cell nucleus. Proc Natl Acad Sci (1999). 96: 91-6.

7 ABKÜRZUNGEN

AAV	Adeno-assoziiertes-Virus
Abb.	Abbildung
β-CIT	2β-carboxymethoxy-3β(4-iodophenyl)tropan
DIV	Tage *in vitro* (engl.: days *in vitro*)
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalie-Virus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E13	Gestationsalter von 14 Tagen *post conceptionem*
EBV	Epstein-Barr-Virus
EBNA1	EBV-Nuclear Antigen 1
bFGF	basic fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GDNF	glial derived neurotrophic factor
GFAP	glial fibrillatory acidic protein
HSV	Herpes-simplex-Virus
kD	kilo-Dalton: Einheit des Molekulargewichts
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylamin
LMP	low melting point
MP	Morbus Parkinson
PET	Positronenemissionstomographie
Tab.	Tabelle
TH	Tyrosinhydroxylase
TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(and-6-)isothiocyanate
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
β-TUB III	Beta-Tubulin III
VM	Ventrales Mesencephalon

8 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren in München Herr PD Dr. Thomas Gasser, Herr Dr. Marius Ueffing und Herr Dr. Matthias Bauer.

9 DANKSAGUNG

Bei den folgenden Personen möchte ich mich an dieser Stelle bedanken für Ihren jeweiligen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. T. Gasser für die Annahme als Doktorand und dessen stetiger Unterstützung in wissenschaftlichen Belangen.

Herrn Prof. Dr. G. Bornkamm, an dessen Institut ich meine Experimente durchführen konnte.

Herrn Dr. M. Ueffing für die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu können, für dessen stetige Bereitschaft meine Fragen und Ergebnisse zu diskutieren und zu strukturieren sowie für dessen unerschütterlichen Optimismus in das Gelingen meiner Arbeit.

Herrn Dr. M. Bauer für dessen kritische Betreuung während der gesamten Arbeit, für die geduldige Unterstützung zur Erlernung zahlreicher Methoden der Molekular- und Zellbiologie sowie für die Vermittelung der Bedeutung von exaktem und selbständigem Arbeiten.

Herrn Dr. M. Conrad für sein Interesse an den Themen meiner Arbeit, für die zahllosen, fruchtbaren Diskussionen und für seine zuverlässige Unterstützung innerhalb und außerhalb des Labors.

Frau C. Jakupoglu und Frau Dr. S. Suppmann für die freundschaftliche und kollegiale Unterstützung im Labor.

den vielen hilfsbereiten Mitarbeitern am Institut, insbesondere den Tierpflegern des 4. Stockwerks, Herrn R. Chapman, Herrn J.-M. Béchet, Herrn M. Hölzl, Frau U. Schultheiß, Frau A. Janz.

10 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, die dem Fachbereich Humanmedizin München zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Optimierung eines Lipid-vermittelten Gentransfers für primäre, mesencephale Vorläuferneuronen *in vitro*

im Neurogenetischen Labor der Neurologischen Klinik, Klinikum Großhadern unter der Leitung von PD Dr. med. Thomas Gasser, sowie im Institut für Klinische Molekularbiologie, GSF München unter der Leitung von Prof. Dr. G. Bornkamm mit Betreuung durch Dr. M. Ueffing ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei dem Verfassen der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt zu haben.

Bisher habe ich an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

München, den 25. April 2003

11 LEBENSLAUF

23.10.1975	Geboren als erstes Kind von Sylvia Gramlich, geb. Chircu, und Dr. Rainer Gramlich in Immenstadt im Allgäu
1982-1986	Volksschule Blaichach
1986-1995	Julius Kunert Gymnasium Immenstadt
1995-1996	Zivildienst
1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der LMU München
1998	Ärztliche Vorprüfung
1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000-2002	Doktorarbeit an der Neurologischen Klinik / Poliklinik des Klinikums Großhadern, LMU München in Kooperation mit dem Institut für Klinische Molekularbiologie, GSF, München
2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung