

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik Großhadern der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Marianne Dieterich

in Kooperation mit

dem Max-Planck-Institut für Neurobiologie
Department Neuroimmunologie

Vorstand: Prof. Dr. med. Hartmut Wekerle

**Genetisch modifizierte Knochenmarkstammzellen
als Therapieansatz bei
Amyotropher Lateralsklerose –
lentivirale Transduktion von GDNF und BDNF**

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

vorgelegt von

Robert Stefan Stark

aus

Linz, Österreich

2013

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Johanna Anneser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dieter Edbauer
Prof. Dr. med. Jochen Herms

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

*Wer kämpft, kann verlieren.
Wer nicht kämpft, hat schon verloren.*

Bertholt Brecht

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Neurodegenerative Erkrankungen	1
Morbus Alzheimer	3
Epidemiologie	3
Pathologie	4
Klinik	6
Diagnostik	7
Therapie	8
Morbus Parkinson	9
Epidemiologie	9
Pathologie	10
Klinik	11
Diagnostik	13
Therapie	13
Amyotrophe Lateralsklerose	14
Epidemiologie	15
Klinik	15
Therapie	16
Pathomechanismen	17
Innovative Therapieversuche neurodegenerativer Erkrankun- gen	26
Neurotrophe Faktoren in der Therapie neurodege- nerativer Erkrankungen	26
Stammzelltherapie neurodegenerativer Erkrankun- gen	28

Das Konzept: Stammzellen als „Trojanische Pferde“ . . .	30
Zielsetzung	32
Material und Methoden	33
Laborausrüstung	33
Molekularbiologische Methoden	34
Verwendete Materialien	34
Bakterienaufbewahrung	34
DNA-Lagerung	35
Hitze-Schock-Transformation von kompetenten Bak- terien	35
Plasmidpräparationen	35
Anwendung von Restriktionsenzymen	37
Anwendung des Klenow-Fragments	38
DNA-Dephosphorylierung	38
DNA-Ligation	39
Polymerasekettenreaktion	39
Gel-Extraktion von DNA-Proben	40
DNA-Aufreinigung nach PCR und Anwendung von Restriktionsenzymen	41
DNA-Konzentrationsbestimmung	41
DNA-Analyse mittels Agarose-Gel-Elektro- phorese	42
Plasmid-DNA-Kontrollen	42
Zellkulturen	43
Verwendete Materialien	43
Inkubationsbedingungen	44
Auftauen der <i>Packaging</i> -Zellen	44
Passagieren der <i>Packaging</i> -Zellen	44
Zählen der <i>Packaging</i> -Zellen	45
Einfrieren der <i>Packaging</i> -Zellen	45
Virusproduktion	46
Verwendete Materialien	46
Vorbereitungen	47
Ablauf der Virusproduktion	47
Aufbereitung der Viren	49
Transduktion	50

Ergebnisse	52
Transfervektoren mit BDNF und GDNF	52
PGK-Promotor	53
Plasmidkontrolle	56
CMV-Promotor	58
Plasmidkontrolle	58
<i>Packaging</i> -Plasmide	60
Plasmidherzeugung für die Transfektion der <i>Packaging</i> -Zellen	62
Transfektion der <i>Packaging</i> -Zellen	63
Transduktion der <i>Packaging</i> -Zellen	63
Diskussion	67
Aufbau der Plasmide	67
Promotoren	67
IRES-eGFP	68
WPRE	68
BDNF	69
GDNF	70
Gentransfersysteme	71
Vor- und Nachteile der Strategie	74
Ausblick	79
Danksagung	83
Zusammenfassung	80
Literaturverzeichnis	84
Eidesstattliche Versicherung	82

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AB	Antibiotikum
AD	Alzheimer-Demenz
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANG	Angiogenin
ApoE4	Apolipoprotein-E4
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bp	Basenpaar(e)
CCS	Kupfer-Chaperone für SOD1
cCT	Computertomographie des Gehirns
CM	Zellmedium
CMV	Cytomegalie-Virus
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EAAT2	Excitatory amino-acid transporter 2
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalogramm
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
fALS	familiäre ALS
FBS	fetales bovines Serum
FMC	Gefriermedium
FTLD	frontotemporale Demenz
FUS	Fused in Sarcoma
g	Gramm
GDNF	Glia cell line-derived neurotrophic factor
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IRES	Internal Ribosome Entry Site
kb	Kilobasen
MCS	Multiple Cloning Site
MEM	Minimum Essential Medium
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NEP	Nepilysin
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	Parkinson-Krankheit
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PGK	X-chromosomale Phosphoglyceratkinase 1
rpm	Umdrehungen pro Minute
sALS	sporadische ALS
SOD1	Kupfer/Zink Superoxiddismutase 1
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie
TDP-43	TAR DNA-bindendes Protein 43kD (TARDBP)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIM	Ventraler intermediärer Thalamuskern
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element
x G	Vielfaches der Gravitationskraft
ZNS	Zentrale Nervensystem
µg	Mikrogramm

Abbildungsverzeichnis

1	Multiple Amyloid-Plaques in der Bielschowsky-Silberimprägnation	4
2	<i>Neurofibrilläre Tangles</i> nach Anfärbung mit der Bielschowsky-Silberfärbung	5
3	Immunhistochemische Färbung von phosphoryliertem Protein τ	5
4	Mögliche Mechanismen, welche der α -Synuclein-vermittelten Toxizität im Rahmen der PD zugrunde liegen	12
5	Mögliche Mechanismen, welche der SOD1-vermittelten Toxizität im Rahmen der ALS zugrunde liegen	21
6	Schematische Darstellung über den Einsatz von Stammzellen in der Therapie der ALS	30
7	Titrationsschema	51
9	GDNF-Ursprungsvektor	53
8	Ergebnisse der Kontrollsequenzierung nach Insertion von BDNF in pJET1.2	54
10	PGK-Zielvektor	55
11	Gel-Elektrophorese des Konstruktes PGK- <i>BDNF</i> -IRES-eGFP	56
12	Gel-Elektrophorese des Konstruktes PGK- <i>GDNF</i> -IRES-eGFP	57
13	CMV-Zielvektor	58

14	Gel-Elektrophorese des Konstruktes CMV- <i>BDNF</i> -IRES-eGFP	59
15	Gel-Elektrophorese des Konstruktes CMV- <i>GDNF</i> -IRES-eGFP	60
16	<i>Packaging</i> -Plasmide	61
17	<i>Envelope</i> -Plasmid	62
18	DNA-Konzentration nach Plasmidpräparation . .	63
19	Transfektion von CMV- <i>BDNF</i> -IRES-eGFP . . .	64
20	Transduktion von PGK- <i>BDNF</i> -IRES-eGFP . . .	66

Einleitung

Neurodegenerative Erkrankungen

Als „neurodegenerativ“ bezeichnete Erkrankungen zeichnen sich durch drei wesentliche Merkmale aus: Sie befallen bevorzugt spezifische Teile oder funktionale Systeme des Nervensystems. Sie beginnen schleichend, nach einer langen Periode normaler Funktion des Nervensystems und haben einen fortschreitenden Verlauf über viele Jahre, ein Jahrzehnt oder länger.

Die Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen umfasst klinisch, pathologisch und pathophysiologisch heterogene Entitäten. Bei einem Teil der Patienten wird eine genetische Ursache gefunden, oder es stellt sich heraus, dass mehr als ein Mitglied einer Familie betroffen ist. Bei diesen Patienten könnte man treffender von heredodegenerativen Erkrankungen sprechen. Die Zahl der sporadisch auftretenden Krankheiten ist jedoch deutlich in der Überzahl. Der Umstand, dass diese Erkrankungen klinisch und pathologisch so große Ähnlichkeit besitzen und sowohl als unabhängige Erkrankungen wie auch im Rahmen familiärer Häufungen auftreten, ist für die Forschung von ganz entscheidender Bedeutung. Die Degeneration oder Atrophie – zwei in diesem Zusammenhang nicht strikt getrennt verwendete Begriffe – ist die Folge pathologischer Prozesse. Diese sind bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen noch nicht abschließend geklärt. Es sei darauf verwiesen, dass der Begriff Atrophie einen eher langsamer fortschreitenden Prozess beschreibt, während sich die Dege-

neration auf rascher verlaufende Vorgänge, häufig metabolischen Ursprungs, bezieht. Mittlerweile konnte man bei einigen, in der Vergangenheit als neurodegenerativ bezeichneten Erkrankungen, metabolische, toxische oder übertragbare nicht-virale Agentien als Ursache identifizieren. Beispiele hierfür sind die funikuläre Myelose, Adrenoleukodystrophie und Neurolues¹.

Betrachtet man die Lebensspanne eines Menschen, so ist festzustellen, dass mehr als die Hälfte der Zeit durch einen langsam fortschreitenden Verfall organischer Funktionen charakterisiert ist. Dies wird unter anderem augenscheinlich, wenn man das motorische, sensorische oder andere höheren Hirnleistungen betreffende System betrachtet. Eine besondere Schwierigkeit bei vielen dieser Erkrankungen ist nun die Unterscheidung zwischen noch in der Altersnorm liegenden Veränderungen und bereits pathologischen Prozessen. Im fortgeschrittenen Alter, dem üblichen Erkrankungszeitraum, ist die korrekte Zuordnung zu noch in der Altersnorm liegenden physiologischen und bereits pathologischen und deshalb therapiebedürftigen Veränderungen zusätzlich erschwert.

Der Anschein eines klar definierten Beginns der Symptomatik wird häufig lediglich durch die Koinzidenz mit einem Ereignis, etwa einem Unfall oder einer anderen Erkrankung, suggeriert. Die letztlich vorhandenen Symptome sind Ausdruck des bereits weit fortgeschrittenen Neuronenuntergangs, welcher die kritische Zellzahl, die einen reibungslosen Ablauf ermöglicht, bereits unterschritten hat. Der unwiederbringliche Verlust bestimmter Funktionen stellt somit ein charakteristisches Merkmal aller neurodegenerativen Erkrankungen dar. Die den Erkrankungen zugrunde liegenden Ursachen, wenn bislang auch weitestgehend unbekannt, bleiben bestehen, was den unaufhaltsam fortschreitenden Verlauf begründet [107].

In der Patientenversorgung ist die seelische und emotionale Unterstützung des Patienten sowie der Angehörigen eine Hauptaufgabe des behandelnden Arztes.

Nachfolgend soll eine Übersicht über die häufigsten neuro-

¹Information von Ropper, Allan H., M.D.

degenerativen Erkrankungen geliefert werden. Das im Rahmen dieser Dissertation geschilderte Therapieprinzip scheint aufgrund pathophysiologischer Überlegungen zudem für selbige aus heutiger Sicht am geeignetsten. Die Vorstellung der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) ist umfassender, da das hier vorgestellte Konzept ursprünglich im Zusammenhang mit dieser entwickelt wurde. Auch in den nachfolgenden Abschnitten findet sich ein Schwerpunkt auf der ALS, wobei auf wesentliche Punkte, welche die Anwendbarkeit auf andere Erkrankungen betreffen, ebenfalls eingegangen wird.

Morbus Alzheimer

Der Morbus Alzheimer, auch bekannt als Alzheimer-Demenz (AD), stellt quantitativ die häufigste Erkrankung aus dem Kreis der neurodegenerativen Erkrankungen dar. Unter allen Formen der Demenz sind degenerative (vor allem AD) und vaskuläre Demenzen in der westlichen Welt etwa gleich häufig vertreten [55]. Aufgrund der hohen Invalidisierung durch die Erkrankung, der großen Häufigkeit und der damit verbundenen enormen sozioökonomische Relevanz ist die AD zu einem besonders aktiven Forschungsgebiet geworden.

Die Erkrankung erhielt ihren Namen nach dem Erstbeschreiber Alois Alzheimer. Dieser beschrieb im Jahre 1907 den Fall einer 51-jährigen Patientin, die nach einem 5-jährigen Krankheitsverlauf progressiver Demenz verstarb [3]. Bereits im Jahre 1892 wurden von Blocqu und Marinesco sogenannte *Herdchen* in senilen Gehirnen gefunden, die 1910 von Simchowicz *senile Plaques* getauft wurden [107].

Epidemiologie

Die Mehrheit der Patienten ist älter als 60 Jahre, obwohl Krankheitsfälle in fast jedem Alter beschrieben wurden. Die Studienlage zeigt eine Inzidenz von 4,8% für mittelschwere und schwere Demenzen in der Gruppe der über 60-Jährigen. In der Altersgruppen von 60 bis 69 Jahren beträgt die Prävalenz 300 pro

100.000 Einwohner, während sie in der Gruppe der 70 bis 79-Jährigen bereits auf 3.200 pro 100.000 ansteigt. Bei über 80-Jährigen beträgt sie 10.800 pro 100.000. Die Prävalenz, die auch von der Gesamtmortalität abhängt, ist bei Frauen etwa auf Dreifache gesteigert, obwohl die Inzidenz im Vergleich zum männlichen Kollektiv nur geringfügig erhöht ist. Die Überlebensrate von Alzheimer-Patienten ist um 50% reduziert [55].

Zirka 25% der Fälle treten familiär gehäuft auf. Das bedeutet, dass zwei oder mehr Mitglieder einer Familie betroffen sind. In Summe beruht jedoch weniger als 1% der Erkrankungen auf einem dominanten Vererbungsmuster. Der Rest scheint keinem monogenetischen Vererbungsmuster zu folgen. Bei den restlichen 75% konnten noch keine eindeutigen Auslöser identifiziert werden, sodass weiterhin genetische Störungen oder etwa Umwelteinflüsse, oder eine Kombination von beidem, zur Diskussion stehen [107].

Pathologie

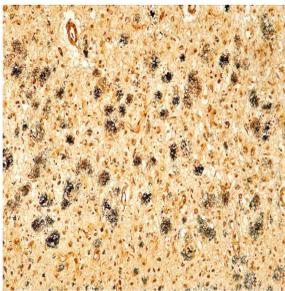


Abbildung 1: Multiple Amyloid-Plaques in der Bielschowsky-Silberimprägnation. Diese Technik wurde von A. Alzheimer bei der Beschreibung des Falles von Auguste D. verwendet [28].

Makroskopisch imponiert eine Atrophie des Gehirns mit Betonung des Frontal-, Parietal- und Temporalcortex. In fortgeschrittenen Stadien schrumpft auch das Marklager mit daraus resultierender Vergrößerung der inneren und äußeren Liquorräume. Die erste mikroskopische Veränderung besteht in einer Reduktion der Synapsendichte mit Schwerpunkt im frontalen und temporoparietalen Assoziationscortex, im entorhinalen Cortex und im Hippocampus. In späteren Stadien bilden sich intrazellulär gele-

gene, mit Silberfärbung darstellbare, sogenannte *neurofibrilläre Tangles*. Deren Hauptbestandteil bildet das mikrotubuläre Protein τ .

Extrazellulär gelegene Plaques aus vorwiegend Amyloid- β 42 sowie eine granulovakuoläre Degeneration von Neuronen vervollständigen das Bild. Im Rahmen der Amyloid-Ablagerungen entwickelt sich ebenfalls eine cerebrale Amyloidangiopathie. Die mikroskopischen Veränderungen korrelieren mit dem Stadium der Erkrankung. Die Bildung von Amyloid-Plaques eilt den Symptomen voraus, während die Entstehung der *neurofibrillären Tangles*, der Neuronenverlust und im Speziellen der Verlust von Synapsen parallel zum Krankheitsverlauf zunehmen.

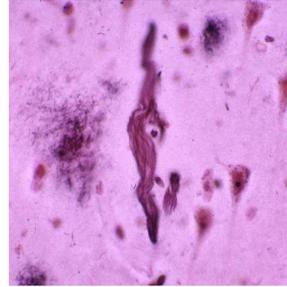


Abbildung 2: *Neurofibrilläre Tangles* nach Anfärbung mit der Bielschowsky-Silberfärbung. Diese Plaques wurden ursprünglich von A. Alzheimer charakterisiert [28].

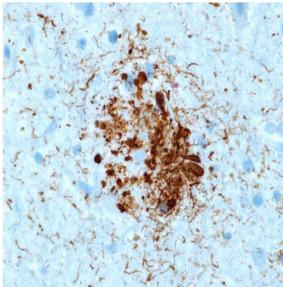


Abbildung 3: Diese Abbildung zeigt eine immunhistochemische Färbung von phosphoryliertem Protein τ [28].

Eine Schwierigkeit in der mikroskopischen Diagnostik bereitet die Tatsache, dass die beschriebenen Veränderungen auch bei kognitiv unauffälligen alten Menschen auftreten können und somit lediglich ein quantitativer Unterschied zu Patienten mit AD vorliegt [116, 55, 107].

Des Weiteren stellte man im Rahmen von genetischen Untersuchungen fest, dass das Amyloid-Vorläuferprotein auf

dem langen Arm von Chromosom 21 codiert ist. Hierin besteht möglicherweise die Erklärung, weshalb beinahe alle Down-Syndrom-Patienten (Trisomie 21) nach dem 40. Lebensjahr die neuropathologischen Kennzeichen einer AD aufweisen und bei etwas mehr als der Hälfte dieser Patienten eine Abnahme der kognitiven Fähigkeiten nachgewiesen werden kann [19]. Das Apolipoprotein-E4-Allel (ApoE4) befindet sich dagegen auf dem langen Arm von Chromosom 19. Wenn sich ApoE4 mit Amyloid- β assoziiert, beschleunigt dies die Plaque-Bildung. Somit handelt es sich hierbei zusammen mit genetischen Varianten von Presenilin-1, Presenilin-2 und dem Amyloid-Vorläuferprotein um mögliche Suszeptibilitätsfaktoren für das Auftreten einer AD. Entsprechende Befunde konnten anhand familiärer AD-Fälle erhoben werden [55].

Klinik

Das klinische Erscheinungsbild der AD ist sehr heterogen. In frühen Stadien klagen die Patienten häufig über unspezifische Symptome wie Kopfschmerzen, unsystematischen Schwindel oder allgemeine Leistungsschwäche. Unter diesen Umständen ist eine Diagnose noch nicht möglich. Sobald im weiteren Verlauf Gedächtnisstörungen auftreten, die jedoch noch nicht den Diagnosekriterien einer Demenz entsprechen, wird dies als *Mild Cognitive Impairment* bezeichnet. In diesem Stadium muss es allerdings nicht zwangsläufig zu einer weiteren Progression kommen. Das Hauptsymptom der AD stellt eine fortschreitende Vergesslichkeit dar, die initial leicht ausgeprägt ist, dennoch im Verlauf dazu führen kann, dass sich Patienten in gewohnten Umgebungen und Situationen nicht mehr zurechtfinden. Sie vergessen selten verwendete Vokabeln und können sich zunehmend Dinge des täglichen Lebens nicht mehr merken. Dies hat zur Folge, dass der Beruf nicht mehr ausgeübt werden kann oder die Führung des Haushalts unmöglich wird. Dieser kognitive Verfall führt zu einer weitestgehenden Abhängigkeit von Lebenspartner und Angehörigen, zumal die Bewältigung eines selbständigen Alltags nicht mehr möglich ist [56, 55].

Zu den Gedächtnisstörungen gesellen sich weitere neuropsychologische Störungen wie aphasische Sprachstörungen, bilaterale Apraxien, räumlich-konstruktive Störungen und räumliche Orientierungsstörungen. Die Persönlichkeit ist anfangs noch weitestgehend unbeeinträchtigt, sodass lange Zeit eine intakte Fassade aufrecht erhalten werden kann. In späteren Stadien machen sich auch hier Probleme bemerkbar. Es imponieren Antriebsmangel, psychomotorische Unruhe, Schlafstörungen, sozialer Rückzug, Depressionen und Halluzinationen. Die Patienten werden misstrauisch und vermuten manchmal, von ihren Angehörigen bestohlen zu werden, werfen ihren Ehegatten Untreue vor und sind in beständiger Sorge, verlassen zu werden. Im finalen Stadium erlöschen die kognitiven Leistungen vollständig. Zu diesem Zeitpunkt sind die Patienten bettlägerig, sprachlich isoliert und auf umfassende Pflege angewiesen [28, 55].

Diagnostik

Die Diagnosekriterien der Alzheimer-Demenz setzen einen Gedächtnisverlust und den Verlust einer weiteren höheren kognitiven Leistung, wie etwa der Sprachfunktion, Wahrnehmung, Praxie oder räumlichen Orientierung voraus. Entscheidend bei all diesen Veränderungen ist jedoch, dass diese eine soziale Relevanz haben müssen. Zudem wird gefordert, dass ein schleicher Beginn mit progressivem Verlauf unter Ausschluss anderer Ursachen vorliegt.

Die kognitiven Störungen werden durch neuropsychologische Untersuchungen objektiviert. Weitere apparative Diagnostik wird veranlasst, um andere Ursachen für die klinischen Symptome auszuschließen. Im Elektroenzephalogramm (EEG) zeigen sich gegebenenfalls unspezifische Veränderungen im Sinne einer generalisierten Verlangsamung. In der Computertomographie des Gehirns (cCT) findet sich eine generalisierte Atrophie mit Betonung des Frontal-, Parietal- und Temporalcortex sowie einer Erweiterung der äußeren und inneren Liquorräume. Charakteristische, wenn auch nicht spezifische, Veränderungen weisen der *Hippocampus* und der *Nucleus basalis Meynert* auf. In der Positronen-

Emissions-Tomographie (PET) imponiert ein temporal und parietal charakteristisch veränderter Glukosestoffwechsel. Die Liquordiagnostik wird zum Ausschluss einer infektiösen Genese durchgeführt. Zusätzlich findet man im Liquor erhöhtes Protein τ , Amyloid-Vorläuferprotein und Amyloid β 1-40. Diese Befunde können bislang aufgrund noch unzureichender wissenschaftlicher Daten nicht zur Diagnosestellung herangezogen werden. Eine gesicherte Diagnose eines Morbus Alzheimer kann bis heute nur durch die mikroskopische Analyse von Hirngewebe, welche jedoch lediglich *post mortem* durchgeführt wird, gestellt werden. Im klinischen Alltag handelt es sich um eine klinische Diagnose aufgrund entsprechender kognitiver Veränderungen, welche durch neuropsychologische Testungen objektiviert werden können [55, 107].

Therapie

Basierend auf der funktionalen Theorie des Acetylcholin-Mangels etablierten sich mehrere Pharmaka, die an diesem Punkt angreifen. Hierbei handelt es sich um eine rein Symptom-orientierte Therapie, deren positiver Effekt jedoch gering ausgeprägt ist. Bei leichten bis mittelschweren Formen der Demenz werden reversible Cholinesterasehemmer wie Donepezil, Rivastigmin und Galantamin angewendet. Im weiteren Krankheitsverlauf wird neben den bereits genannten Medikamenten auch Memantine, ein *N-Methyl-D-Aspartat*(NMDA)-Antagonist, verabreicht. Keine dieser Therapien beeinflusst den progressiven Verlauf dieser Erkrankung [55].

Im Rahmen von Tierversuchen wurde eine Immunisierung gegen die pathophysiologisch auftretenden A β 42-Plaques angestrebt, um auf diese Weise den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen. Der Erfolg dieser Vorgehensweise führte zur Initiierung klinischer Studien an Menschen. Eine erste Phase 2a-Studie (AN1792) musste jedoch wegen schwerer Nebenwirkungen mit einer Meningoenzephalitisrate von 6% abgebrochen werden. Dennoch konnten Hinweise gesammelt werden, wonach der gewünschte Effekt, die Plaquereduktion, erzielt wurde (Gilman *et*

al.). Aktuell werden drei weitere Studien mit abgewandelter Formel durchgeführt [114, 96, 47, 90, 115].

Morbus Parkinson

Der Morbus Parkinson ist eine seit der Antike bekannte und von James Parkinson im Jahre 1817 erstmalig stichhaltig charakterisierte neurodegenerative Erkrankung mit den Kardinalsymptomen Rigor, Tremor, Hypokinese und posturale Instabilität [107]. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass es sich bei der Parkinson-Krankheit (PD) um eine Variante aus dem Kreis der Parkinson-Syndrome handelt. Innerhalb dieser Gruppe wird unterschieden zwischen [55]:

- idiopathischen Parkinson-Syndromen, entspricht dem Morbus Parkinson (PD),
- symptomatischen (sekundären) Parkinson-Syndromen und
- atypischen Parkinson-Syndromen.

Die folgenden Ausführungen behandeln vorwiegend das idiopathische Parkinson-Syndrom.

Epidemiologie

Aus epidemiologischer Sicht stellt die PD eine relativ häufige Erkrankung dar, deren Prävalenz mit zunehmendem Alter steigt. Während in der Gruppe der 60-Jährigen die Prävalenz bei 0,2% liegt, hat sie sich bei den 80-Jährigen bereits auf 2,5% gesteigert [55]. Die PD tritt in der Regel zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr auf. Es besteht ein Maximum in der sechsten Lebensdekade. Bezüglich der Verteilung zwischen Männern und Frauen gibt es unterschiedliche Angaben, wobei tendenziell das männliche Geschlecht geringfügig häufiger betroffen ist. Die PD findet sich in allen Ländern, ethnischen Gruppen und sozio-ökonomischen Klassen. Es fällt jedoch auf, dass in der Gruppe der Afroamerikaner die Inzidenz 25% und bei Asiaten 30-50% jener der kaukasischen Gruppe beträgt [107].

Bei 20-25% der Parkinson-Patienten ist mindestens ein Verwandter ersten Grades ebenfalls betroffen, was auf eine genetische Komponente schließen lässt. Es wird zwischen autosomal-dominant sowie autosomal-rezessiv vererbten genetischen Defekten unterschieden. Aktuell sind 13 Genloci (PARK 1-13) beschrieben, die mit dem Morbus Parkinson in Verbindung gebracht werden. In der Mehrzahl der Fälle nimmt man einen polygenen Erbgang an [55].

Pathologie

Das charakteristische Merkmal des Morbus Parkinson ist der Verlust pigmentierter Zellen in der *Substantia nigra* und anderen pigmentierten Kernen wie zum Beispiel dem *Locus coeruleus*. Diese Veränderung ist bereits makroskopisch erkennbar. Die *Substantia nigra* erscheint deutlich verblasst. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigt sich ein beträchtlicher Zellverlust mit reaktiver Gliose. Der Melaningehalt ist in den verbliebenen Zellen deutlich reduziert. Weiterhin finden sich in diesen Zellen sogenannte *Lewy-Bodies*. Dabei handelt es sich um eosinophile, cytoplasmatische Einschlüsse, die von einem schwachen Hof umgeben sind. Bei Untersuchungen von McGeer [79] wurde festgestellt, dass die Gesamtzellzahl der *Substantia nigra* von anfangs durchschnittlich 425.000 auf 200.000 im Alter von 80 Jahren abnahm. In ähnlicher Weise verhält es sich mit der Tyrosinhydroxylase, dem geschwindigkeitslimitierenden Enzym der Dopaminsynthese. Bei Parkinson-Patienten war dieser Wert im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Kontrollen auf ein Drittel reduziert [107].

Bei Drogenabhängigen wurde beobachtet, dass das Neurotoxin MPTP (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) irreversible Zeichen eines Parkinson-Syndroms hervorruft und diese mit einem selektiven Untergang der dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* einhergehen. Der exakte Mechanismus, der dieser Schädigung zugrunde liegt, konnte bislang noch nicht entschlüsselt werden. Dennoch wurden dadurch Thesen unterstützt, wonach umweltbedingte Einflüsse für das Auftreten der PD verantwortlich sein könnten [107].

Die bereits genannten *Lewy-Bodies* setzen sich größtenteils aus α -Synuclein zusammen und treten sowohl bei sporadischen als auch bei erblich bedingten Fällen auf. Weitere Bestandteile der *Lewy-Bodies* sind Ubiquitin und Protein τ . Im gesunden Gehirn ist α -Synuclein in ungefalteter, löslicher Form vorhanden, während sich bei höheren Konzentrationen Aggregate bilden. Bei hereditären Morbus Parkinson-Formen wurde festgestellt, dass die genetische Veränderung eine gesteigerte Aggregation von α -Synuclein zur Folge hat. Dies kann durch vermehrte Produktion oder gestörten Abbau bedingt sein. Diese Korrelation ist insofern bemerkenswert, als sich in diesem Prozess Ähnlichkeiten zur AD und den Aggregationen von Amyloid erkennen lassen. Abbildung 4 zeigt mögliche Mechanismen, die der Entstehung der *Lewy-Bodies* zugrunde liegen [107].

Neben den Veränderungen von α -Synuclein finden sich auch genetische Defekte des Parkins. Dabei handelt es sich um eine Ubiquitin-Proteinligase, welche für die Beseitigung abzubauen der Proteine durch die Proteasomen der Zelle essentiell ist. Mutationen des Parkin-Gens können somit zu einem Anstieg von α -Synuclein in den Zellen führen [91].

Klinik

Erste Symptome des Morbus Parkinson stellen häufig Schmerzen der Extremitäten dar, die jedoch oft als muskulo-skeletal bedingt, fehlinterpretiert werden. Bereits zu diesem Zeitpunkt fallen viele Patienten durch eine gedrückte Stimmung auf. Folgende klinische Zeichen sind für die frühzeitige Diagnosestellung hilfreich: eine reduzierte Blinzelfrequenz, ein unerschöpflicher Glabellareflex, verminderte Armmitbewegungen beim Gehen, plötzliche Unterbrechungen beim Durchführen rasch aufeinander folgender Bewegungen und ein bei kontralateraler Aktivierung einsetzender Rigor. Erst im weiteren Verlauf entwickelt sich das Vollbild eines Parkinson-Syndroms mit den typischen Symptomen Hypokinese, Rigor, Tremor und posturale Instabilität. Klassischerweise sind die Beschwerden zu Beginn einseitig ausgeprägt, nehmen langsam zu und greifen dann auf die andere

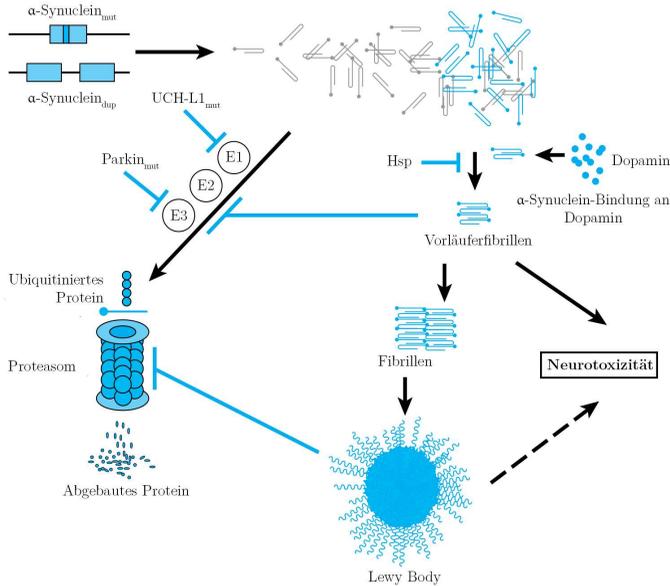


Abbildung 4: Schematische Darstellung möglicher Mechanismen, welche der α -Synuclein-vermittelten Toxizität im Rahmen der PD zugrunde liegen. In diesem Modell führen verschiedene Störungen zu erhöhten α -Synuclein-Spiegeln: (1) Punktmutationen im α -Synuclein-Gen und (2) Duplikation des α -Synuclein-Gens, die zu einer Akkumulation von α -Synuclein führen oder (3) Mutationen im Parkin-Gen oder der *Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase-L1* (UCH-L1), was eine verminderte Degradation des α -Synucleins durch die Proteasomen bedingt. Überschüssiges α -Synuclein assoziiert zu Vorläuferfibrillen, was durch Störungen der Hitze-Schock-Proteine (Hsp) oder in Kombination mit Dopamin beschleunigt wird. Hieraus resultieren *Lewy Bodies*. In diesem Modell wird die neurotoxische Wirkung den Vorläuferfibrillen oder *Lewy Bodies* zugeschrieben. (Aus Adams & Victor's Principles of Neurology, 2005, S.920 [107]).

Körperhälfte über. Viele Bereiche der Motorik verändern sich. Die Stimme wird leiser und heiser. Das Schlucken fällt zunehmend schwerer, was einen ausgeprägten Speichelfluss zur Folge hat. Das Schriftbild entwickelt sich zu einer typischen Mikrographie. Die Haltung der Patienten wird gebunden und leicht nach vorne über gebeugt. Die Schritte werden immer kürzer, bis der Gang einem Trippeln gleicht. Es treten Schwierigkeiten bei der Bewegungsinitiierung auf und das Wenden gelingt nur noch unter Anstrengung. Demenzen betreffen nur einen Teil (ca. 30% [56]) der Patienten, sodass diese meist ihr Leiden bei voller Einsicht miterleben, während Depressionen sehr häufig sind [55, 107].

Diagnostik

Eine zentrale Stellung bei der Diagnostik der PD bildet das sehr charakteristische klinische Erscheinungsbild. Mit Hilfe des L-Dopa-Tests wird überprüft, ob die Symptome auf eine L-Dopa-Gabe erwartungsgemäß positiv ansprechen. Anhand von Laboruntersuchungen sollte ein Morbus Wilson ausgeschlossen werden, der ähnliche Symptome verursacht, jedoch grundsätzlich therapierbar ist. Bei diagnostischen Schwierigkeiten oder zur diagnostischen Zuordnung können elektrophysiologische Untersuchungen angeschlossen werden. Eher zum Ausschluss behandelbarer Ursachen, etwa eines Normaldruckhydrozephalus, sollte eine CT oder Magnetresonanztomographie (MRT) des Schädels durchgeführt werden. Nuklearmedizinische Untersuchungen wie Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT) oder PET ermöglichen eine Beurteilung des nigro-striatalen dopaminergen Systems. Dadurch kann zwischen einer prä- und postsynaptischen Störung unterschieden werden. In Zusammenschau dieser Befunde kann in der großen Mehrzahl der Fälle die korrekte Diagnose einer PD gestellt werden [55, 107, 56].

Therapie

Das therapeutische Grundprinzip bei der PD strebt den Ausgleich des dopaminergen Defizits an. Das potenteste Medikament

in diesem Zusammenhang ist L-Dopa. Ein schwerwiegendes Problem stellen jedoch die im Verlauf auftretenden Wirkungsfluktuationen dar. Diese können nicht mehr mit L-Dopa therapiert werden und sind für die Patienten äußerst belastend. Bei jüngeren Patienten beginnt man die Therapie mit Dopaminagonisten, wie zum Beispiel Pramipexol und Ropinirol, um diese Nebenwirkungen hinauszuzögern. Diese Substanzen verlieren jedoch mit Fortschreiten der Erkrankung ihre Wirkung, sodass dennoch auf L-Dopa zurückgegriffen werden muss. Dieses wird wiederum stets mit einem peripheren Decarboxylase-Hemmer (zB.: Carbidopa) kombiniert, um den peripheren Abbau von L-Dopa zu verringern. Dadurch werden die Nebenwirkungen verringert und die Wirkstoffmenge im ZNS erhöht. Begleitend werden noch weitere Substanzgruppen eingesetzt, die in diesem Rahmen jedoch keiner Erwähnung bedürfen.

Neben der medikamentösen Therapie besteht auch noch die Möglichkeit der tiefen Hirnstimulation. Hierbei werden Stimulationselektroden bei Tremor in den *ventralen intermediären Thalamuskern* (VIM) und bei Akinese in den medialen Teil des *Globus pallidus internus* implantiert. Mittlerweile wird der *Nucleus subthalamicus* dem *Globus pallidus* bevorzugt.

Zusätzlich zu den bereits erwähnten therapeutischen Maßnahmen sollte stets auch noch Krankengymnastik zum Einsatz kommen, da diese nachhaltig positiven Einfluss auf die Erkrankung und das Wohlbefinden der Patienten ausübt. Leider stellt keine der aktuell verfügbaren Therapien eine Möglichkeit dar, den progredienten Verlauf der Krankheit zu stoppen oder gar umzukehren [55, 107, 56].

Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) wurde 1869 erstmals von Jean-Martin Charcot umfassend beschrieben [30]. Im französischen Sprachgebrauch findet sich dieser Umstand in der häufigen Bezeichnung als „Maladie de Charcot“ wieder, während in den USA, zu Ehren des erkrankten gleichnamigen Baseballspielers, von „Lou Gehrig’s Disease“ gesprochen wird. Im britischen

Sprachraum nennt man die ALS auch *Motor Neuron Disease* [81].

Epidemiologie

Unter den neurodegenerativen Erkrankungen ist die ALS die häufigste Erkrankung der Subgruppe der Motoneuronerkrankungen. Die Inzidenz beträgt ein bis zwei Neuerkrankungen pro 100.000 pro Jahr bei einer Prävalenz von circa sechs pro 100.000 [81]. Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter, insbesondere ab dem 60. Lebensjahr. Bei einer Krankheitsdauer von ein bis fünf Jahren und einem mittleren Überleben von drei Jahren ist die ALS für circa einen von 800 Todesfällen verantwortlich [32]. 90-95% der Erkrankungen treten spontan, ohne genetische oder anderweitige Ursache (sporadische ALS, sALS) auf, während die restlichen 5-10% genetische Ursachen haben (familiäre ALS, fALS). Innerhalb der fALS konnte eine Gruppe von circa 20% der Patienten identifiziert werden, deren Erkrankung auf Mutationen der Kupfer/Zink Superoxiddismutase 1 (SOD1) beruht [108, 109]. Aufbauend auf diese Entdeckung wurden Tiermodelle entwickelt, die bislang die beste Möglichkeit zur Erforschung dieser Erkrankung im Tierversuch bieten [54]. Die Geschlechtsverteilung unterscheidet sich zwischen der fALS und sALS. Die sALS befällt doppelt so viele Männer wie Frauen, während bei der fALS, bedingt durch das hauptsächlich autosomal-dominante Vererbungsmuster, keine geschlechtliche Bevorzugung anzutreffen ist. Es ist auch ein autosomal-rezessives Vererbungsmuster bekannt [107].

Klinik

Das klinische Bild zeigt Zeichen des Verlustes sowohl des ersten als auch des zweiten Motoneurons, der vom Cortex über die Hirnnervenkerne im Hirnstamm bis hin zu den Vorderhörnern im Rückenmark reicht. Typischerweise bedingt der Untergang des ersten Motoneurons spastische Paresen und gesteigerte Reflexe. Die Folge des Verlustes des zweiten Neurons sind schlaf-

fe Paresen, Atrophien sowie Faszikulationen. Je nach Befall des Cervikal- oder Lumbalmarks treten die Beschwerden an den Armen oder Beinen auf. Beginnt die Erkrankung mit Befall der im Hirnstamm lokalisierten motorischen Hirnnervenkerne leidet der Patient unter Dysarthrie, Dysphagie oder beidem. Eine Bulbärparalyse tritt bei Verlust des zweiten Motoneurons im Hirnstamm auf. Klinisch imponieren eine Schwäche der mimischen Muskulatur, Abnahme der Gaumenbewegungen und Atrophie sowie Schwäche und Faszikulationen der Zunge. Eine Pseudobulbärparalyse liegt beim Verlust des ersten Motoneurons vor. Diese ist durch emotionale Labilität, auch als pathologisches Lachen und Weinen bezeichnet, sowie durch spastische Kieferbewegungen und Dysarthrie charakterisiert [81].

Die kognitiven Fähigkeiten des Patienten sind typischerweise nicht beeinträchtigt, obwohl etwa 5% der ALS-Patienten ebenfalls an frontotemporaler Demenz (FTLD) erkranken [107]. Aufgrund neuer Studien liegt die Vermutung nahe, dass diese beiden Erkrankungen Bestandteil eines überlappenden klinisch-pathologischen Syndroms sind [11]. Im weiteren Krankheitsverlauf entwickelt sich eine generalisierte Schwäche, die durch den Befall der Atemmuskulatur zum Tod führt.

Therapie

Riluzol ist als einziges Medikament zur Behandlung der ALS zugelassen. Dieses bewirkt lediglich eine mittlere Lebensverlängerung von 3 Monaten in einem Behandlungszeitraum von zwei Jahren. Somit ist in Anbetracht einer fehlenden wirkungsvollen Therapie die umfassende Betreuung des Patienten von besonderer Bedeutung. Die Behandlung von ALS-Patienten sollte möglichst ganzheitlich, unter Berücksichtigung der Tragweite der Diagnose für das weitere Leben des Patienten, stattfinden. Psychologische Betreuung, spirituelle Begleitung und adäquate ärztliche sowie pflegerische Versorgung müssen gewährleistet werden. Der Patient sollte, entsprechend der von ihm vorgegebenen Geschwindigkeit, über den weiteren Verlauf und die damit einhergehenden Symptome und Schwierigkeiten aufgeklärt werden, um

die therapeutischen Möglichkeiten optimal auf dessen Wünsche abzustimmen. Ein besonderes Augenmerk ist auf die ergo- und physiotherapeutische Begleitung des Patienten zu legen und der Umgang mit den Symptomen des letzten Lebensabschnittes ist rechtzeitig zu besprechen. Durch die zunehmende Schwäche der Atemmuskulatur besteht die Angst des Patienten, qualvoll zu ersticken. Diese ist jedoch unbegründet. Wie in Studien gezeigt werden konnte, verstarben über 90% der Patienten friedvoll im Schlaf und kein einziger der 171 Patienten erstickte [89]. Zudem ist zu entscheiden, ob Patienten künstlich beatmet werden wollen oder eventuell lediglich eine Symptombehandlung mit Hilfe von Morphin erwünscht ist. Falls sich Patienten für eine invasive Beatmung entscheiden wollen, müssen sie darüber aufgeklärt werden, dass hierdurch der Krankheitsprogress nicht beeinflusst wird und sie letztendlich in einem Locked-in-Syndrom auf einer Intensivstation versterben [81].

Pathomechanismen

1993 wurden von D. Rosen *et al.* *mis-sense*-Mutationen im SOD1-Gen fALS Fälle entdeckt [108]. Die selektive Toxizität mutierter SOD1 auf Motoneuronen war umso verwunderlicher, als die physiologische Funktion des ubiquitär exprimierten zytoplasmatischen Enzyms in der Umwandlung von Superoxidanionen in Wasserstoffperoxid besteht. Erste Hypothesen vermuteten eine Akkumulation toxischer Superoxidradikale bedingt durch eine verringerte Aktivität der SOD1. Mehrere Versuchsreihen konnten diese Annahme jedoch widerlegen. So zeigte sich bei transgenen Mäusen, die verschiedene mit fALS assoziierte SOD-Mutanten, wie etwa SOD1^{G93A} (Glyzin ist an der Position 93 durch Alanin ersetzt), SOD1^{G37R} oder SOD1^{G85R} exprimierten, dass ein fortschreitender Verlust von Motoneuronen stattfand, obwohl die enzymatische Aktivität unverändert oder gar erhöht war. Darüber hinaus führte eine Depletion oder Überexpression von Wildtyp-SOD1 in mutierten Mäusen zu keiner Progressionsveränderung. Somit ist davon auszugehen, dass mutierte SOD1 toxische Eigenschaften besitzt, die unabhängig von der enzymatischen Aktivi-

tät sind. Aktuell diskutierte Pathomechanismen in diesem Zusammenhang sind [112, 20]:

Oxidativer Stress: Im Rahmen dieser Theorie wurden Ursachen untersucht, die zu einer Zunahme von Radikalen führen könnten. Die Grundannahme beruhte auf strukturellen Veränderungen mutierter SOD1, welche zur Folge hatten, dass die Region des aktiven Kupfers frei zugänglich ist und so unkontrolliert Wasserstoffperoxid in reaktive Wasserstoffradikale umgewandelt wird. Dies wiederum könnte den Anfang einer Kaskade oxidativen Stresses darstellen. Als möglicherweise weiteres Substrat wurde Peroxynitrit identifiziert, welches durch Nitrierung von Tyrosin-Resten wirken könnte. Dennoch konnten die Zielproteine noch nicht identifiziert werden [14, 130, 4, 26, 13].

Diese beiden Mechanismen beruhen auf einem Kupfervermittelten oxidativen Schaden. SOD1 erhält ihr Kupfer durch Kupfer-Chaperone für SOD1 (CCS). Dennoch hatte die Depletion von CCS keinen Effekt auf den Beginn und die Progression der Erkrankung bei SOD1-Mäusen. Diese Resultate lassen vermuten, dass Kupfer-vermittelter oxidativer Stress eine eher untergeordnete Rolle in der Pathogenese der ALS einnimmt [123].

Intrazelluläre Aggregate: Dieser bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen anzutreffende Befund, so neben der ALS auch bei der AD, PD, FTLD und dem Morbus Huntington, stellt eine weitere Möglichkeit dar, wie etwa mutierte SOD1 Motoneuronen schädigen könnte. Es bestehen jedoch unterschiedliche Definitionen und Zusammensetzungen intrazellulärer Aggregate. Zum einen bezeichnet man damit abnorme Ansammlungen von Intermediärfilamenten, inklusive Neurofilamenten und Peripherin. Andererseits wird dieser Begriff auch für Detergens-unlösliche Formen von Proteinen, zu denen SOD1-Aggregate oder Akkumulationen von TAR DNA-bindendem Protein 43kD (TARDBP/TDP-43) und *Fused in Sarcoma* (FUS) gehören, verwendet. Cytoplasmatische Proteinaggregate sind sowohl bei der sALS,

fALS als auch bei transgenen Mausmodellen mit mutierter SOD1 nachweisbar. Ein besonderes Detail ist die Spezifität, mit der SOD1-Aggregate ausschließlich in betroffenen Geweben vorhanden sind und hier lediglich in den Motoneuronen. Im Spinalganglion der Hinterwurzel sowie in hippocampalen Neuronen werden sie nicht gebildet. Interessanterweise entstehen diese Aggregate vor oder gleichzeitig zum Ausbruch der Symptome und akkumulieren mit dem Fortschreiten der Erkrankung. Dies legt die Vermutung nahe, dass SOD1-Aggregate ein frühzeitiges Ereignis in der Pathogenese darstellen [37].

Trotz des Nachweises dieser Aggregate ist nicht geklärt, ob sie einen toxischen Effekt ausüben. Es stehen mehrere Mechanismen zur Diskussion:

- verminderte Aktivität der Chaperone [25]
- Deregulation verschiedener Organellenfunktionen: Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien [27]
- Störung des axonalen Transports [20]
- Aggregat-vermittelte Hemmung des Ubiquitin-Proteasomenkomplexes [91]
- Störungen des RNA-Metabolismus (durch TDP-43, FUS) [112, 34]

Intrazelluläre Aggregate von ALS-Patienten sowie der Tiermodelle enthalten Ubiquitin, dessen physiologische Aufgabe darin besteht, Proteine, die durch Proteasomen abgebaut werden sollen, zu markieren. Wenn nun fehlgefaltete Proteine akkumulieren, führt dies zu einer Störung der Proteasomen und behindert somit den Abbau normaler Proteine. SOD1 wird normalerweise ebenfalls von Proteasomen abgebaut. Trotzdem ist bislang ungeklärt, ob SOD1-Aggregate die Ursache oder Folge der Proteasomenstörung sind. Da diese SOD1-Ubiquitin-Aggregate jedoch sowohl in fALS als auch in sALS auftreten, könnte es sich hierbei um

einen gemeinsamen pathophysiologischen Prozess handeln. Bei TDP-43 und FUS handelt es sich um RNA-bindende Proteine, wodurch weitere Aspekte zu den pathophysiologischen Überlegungen hinzugefügt werden. So können TDP-43 und FUS-Akkumulationen sowohl in ALS-Patienten als auch in Patienten mit frontotemporaler Demenz nachgewiesen werden, wodurch auch auf molekularer Ebene ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Erkrankungen besteht [120]. Diese beiden Pathologien treten typischerweise nicht gleichzeitig auf. Während FUS-Akkumulationen lediglich in wenigen ALS-Patienten, insbesondere bei juvenilen Fällen mit FUS-Mutationen [65], und in einer Subgruppe der FTLD-Patienten zu finden sind, ist eine TDP-43-Pathologie in beinahe allen ALS-Patienten (fALS und sALS [60]), vielen FTDL-Patienten und anderen neurodegenerativen Erkrankungen nachweisbar [34, 10, 11]. In jüngeren Studien wurde untersucht, auf welche Weise sich Störungen von TDP-43 und FUS auswirken. Zu diesem Zweck wurde sowohl TDP-43 als auch FUS depletiert, was jedoch keinen größeren Effekt bewirkte, als die Entfernung der einzelnen Proteine. Dies weist darauf hin, dass beide Proteine parallel agieren und sich eines gemeinsamen Mechanismus der Neurodegeneration bedienen. In diesem Fall könnte durch Manipulation der möglicherweise gemeinsamen Endstrecke Einfluss auf den Verlauf beider Pathologien genommen werden [48].

Mitochondriale Dysfunktion: Hierbei zeigen sich bereits in frühen, asymptomatischen Stadien Schwellungen und Vakuolenbildung in SOD1^{G37R}- und SOD1^{G93A}- Mäusen, während diese in SOD1^{G85R}- Mäusen ausbleiben. Trotzdem wurden mehrere Mechanismen diskutiert, wie verändertes SOD1 diese Schädigungen verursachen könnte: Unterbrechung des Energiemetabolismus, Störung des Proteinimportmechanismus (da das mitochondriale Genom für lediglich 13 der schätzungsweise 1500 Proteine kodiert und der Rest importiert werden muss) sowie gestörtes Calcium-Puffervermögen.

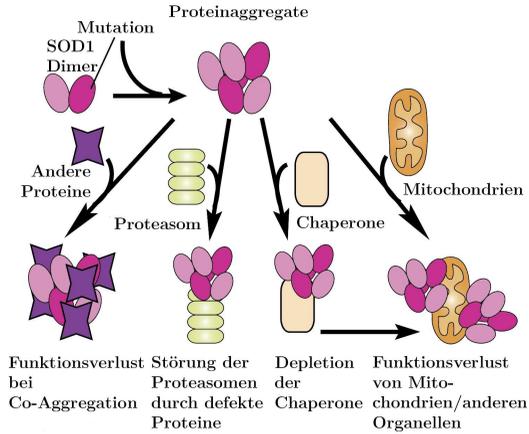


Abbildung 5: Mögliche Mechanismen, welche der SOD1-vermittelten Toxizität im Rahmen der ALS zugrunde liegen. Mutierte, fehlgefaltete SOD1 bildet Aggregate und stört auf diese Weise intrazelluläre Abläufe. Andere Proteine verlieren durch Co-Aggregation mit SOD1 ihre Funktion oder Proteasomen werden durch defekte Proteine behindert. Verminderte Funktionsfähigkeit der Chaperone führt zu fehlgefalteten Proteinen, was nachfolgend weitere Organellen beeinflusst. Mitochondriale Prozesse werden durch Anlagerung von SOD1-Aggregaten an die zytoplasmatische Membran gestört (aus [20]).

Der Einsatz von oralem Kreatinin, um den durch die Mitochondrienstörung bedingten Energiemangel auszugleichen, führte in SOD^{G93A}-Mäusen zu einem verzögerten Ausbruch der Symptome und einer verlängerten Überlebenszeit der Motoneuronen [24, 63]. Dieser Effekt konnte jedoch in klinischen Studien an Menschen nicht wiederholt werden [50, 117]. Zusätzlich könnte ein gestörter Transport von Mitochondrien entlang der Axone zur Degeneration der distalen Axone beitragen. Die gestörte Calcium-Pufferkapazität könnte besonders relevant sein, da sich hierdurch eine mög-

liche Schnittstelle mit dem Mechanismus der Exzitotoxizität ergibt.

Caspase-vermittelter Zelltod: Motoneuronen bei SOD1-mutierten-Mäusen sterben durch Apoptose, der eine Kaskade verschiedener Signale zugrunde liegt. Bei ALS-Mausmodellen ist Caspase-1, ein Startsignal der Kaskade, bereits vor Ausbruch der klinischen Symptome erhöht. Im Verlauf wird Caspase-3 aktiviert, die letztendlich für den Zelltod verantwortlich ist. Dies stellt somit einen weiteren Schnittpunkt mit der mitochondrialen Dysfunktion dar, da es sich bei dem aus Mitochondrien entweichenden Cytochrom C ebenfalls um einen Ursprung dieser Kaskade handelt. Durch Manipulation dieses Pfades wurde versucht, den Krankheitsverlauf zu verändern. Die intrathekale Applikation eines breit-wirkenden Caspase-Inhibitors führte zu einer Reduktion des mRNA-Levels von Caspase-1 und Caspase-3. Eine Untersuchung zeigte, dass die Gabe eines Caspase-Inhibitors verglichen mit einem Placebo einen verzögerten Krankheitsbeginn sowie eine langsamere Progression im Mausmodell bewirkte. In weiteren Experimenten verlängerte sich die Lebensspanne von SOD1^{G93A}-Mäusen, wenn das anti-apoptotische Protein *Bcl-2* überexprimiert oder das pro-apoptotische Protein *Bax* unterdrückt wurde. Somit scheint die von SOD1 ausgeübte Toxizität, zumindest teilweise, von Caspasen und anderen apoptotischen Faktoren vermittelt zu werden [99, 71, 32].

Eine Beobachtung aus dem Jahre 2006 legt zudem nahe, dass Caspase-3 Aktivierung in Gliazellen zu einer Inaktivierung des Glutamat-Transporters *Excitatory amino-acid transporter 2 (EAAT2)* führt, sodass hier abermals eine Querverbindung zum Mechanismus der Exzitotoxizität bestehen könnte [20].

Glutamat-Exzitotoxizität: Dieser Mechanismus beruht vermutlich entweder auf einer wiederholten Stimulation von Nervenzellen oder einem massiven Einstrom von Calcium

in die Zellen durch offene Glutamatrezeptoren. Erste Hinweise darauf waren erhöhte Glutamat Spiegel im Liquor von ALS-Patienten [111, 119].

Um Glutamat wieder aus dem synaptischen Spalt zu entfernen und somit eine repetitive Stimulation zu vermeiden, bedarf es effizienter Glutamattransporter. Ein reibungsloser Ablauf dieses Systems verhindert das Auftreten von Exzitotoxizität. Im Falle von Motoneuronen wird Glutamat durch einen von Astrozyten exprimierten Transporter (*EAAT2*) aus dem synaptischen Spalt entfernt. In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Funktionsverlust von *EAAT2* zu einer stärkeren Progression der Erkrankung führt, während ein Aktivitätszuwachs von *EAAT2* den Verlauf verlangsamt. Darüber hinaus gibt es Hinweise, wonach *EAAT2* ein Ziel der SOD1-Toxizität sein könnte. Ein weiterer Anhaltspunkt für eine möglicherweise selektive Störung von Motoneuronen im Rahmen der Glutamat-Exzitotoxizität ist das unterschiedliche Verteilungsmuster metabolischer Glutamatrezeptoren. Verschiedene Typen sind auf somatischen und autonomen Motoneuronen lokalisiert, wodurch sich der selektive Motoneuronenverlust eventuell erklären lässt [5, 7]. In der Summe unterstützen diese Resultate die These, wonach der Motoneuronenverlust durch Exzitotoxizität vermittelt wird. Der Umstand, dass in diesem Fall eine Störung der Gliazellen vorliegt, bestätigt zudem, dass es sich um keinen Motoneuron-autonomen Prozess handelt [110, 126, 113, 20].

Störungen des axonalen Transports: Neurofilamente sind das häufigste Protein des Zytoskeletts von Motoneuronen. Sie spielen eine Schlüsselrolle im Wachstum von Axonen und bestimmen den Durchmesser selbiger. Ein besonderes Charakteristikum der ALS sind die Akkumulationen von Neurofilamenten in den proximalen Axonen und den Zellkörpern der Motoneuronen. Bei prä-symptomatischen SOD1-Mäusen ist der langsame axonale Transport gestört. Die Überexpression von Neurofilamentuntereinheiten führ-

te bei SOD1^{G37R}- Mäusen zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf, wobei deren Verteilungsmuster verändert war. Die Akkumulationen waren in den Perikaria verstärkt, während sie in den Axonen schwächer ausgeprägt waren. In welcher Weise der axonale Transport zum Tod der Motoneuronen beiträgt, ist bislang nicht geklärt. Es könnte sich um einen gestörten antero- oder retrograden Transport von Mitochondrien handeln. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass der retrograde Transport von peripheren Wachstumsfaktoren beeinträchtigt wird [131, 83].

Pathologie der Gliazellen: In Anbetracht der bereits erwähnten Rolle von *EAAT2* wird deutlich, dass es sich bei der ALS sehr wahrscheinlich um einen Prozess handelt, der sich nicht auf Motoneuronen beschränkt, auch wenn deren Störung für das klinische Bild verantwortlich ist. So sind bei der fALS ubiquitär exprimierte Gene wie SOD1 oder Stoffe, die in mehreren Zelltypen exprimiert werden, wie die Wachstumsfaktoren *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder *Angiogenin* (ANG), gestört. In von Beers *et al.* und Boillée *et al.* veröffentlichten Arbeiten wird beschrieben, wie mutiertes SOD1 in Makrophagen und Mikrogliazellen den Krankheitsverlauf beschleunigt, während selbiges in Motoneuronen primär den Ausbruch sowie die frühe Phase der Erkrankung bedingt [21, 15]. Bei chimären Mäusen, die sowohl Wildtyp-Zellen als auch SOD1-mutierte Zellen besaßen, fand man pathologische Veränderungen und Zelltod von Wildtyp-Motoneuronen besonders in der Nähe von SOD1-mutierten nicht-neuronalen Zellen [59]. Zudem besteht aufgrund des *metabolischen Glutamat-rezeptor*-Verteilungsmusters und den daraus resultierenden Konsequenzen eine Querverbindung zur Glutamat-Exzitotoxizität [6].

Wachstumsfaktoren: Diese sind in den Blickpunkt der Forschung geraten, als man in einem transgenen Mausmodell, das eine gezielte Deletion des Hypoxie-responsiven

Elements des VEGF-Genes trug, eine ALS-ähnliche Klinik beobachtete. Bei den Tieren zeigte sich eine zunehmende Schwäche sowie Degeneration der Motoneuronen ab einem Alter von 5 Monaten [95]. Auf weitere Aspekte von Wachstumsfaktoren im Rahmen der ALS wird in den folgenden Abschnitten eingegangen.

Innovative Therapieversuche neurodegenerativer Erkrankungen

Alle bislang verfügbaren Therapien sind lediglich symptomatisch und beeinflussen nicht den chronisch progredienten Verlauf, der die neurodegenerativen Erkrankungen auszeichnet. Das organische Korrelat für die klinischen Symptome ist ein Neuronenverlust in umschriebenen Regionen oder zusammenhängenden Systemen. In den vergangenen 10 bis 15 Jahren untersuchte man zunehmend alternative, und durch das Fehlen geeigneter Tierversuchsmodelle davor auch nur schlecht erforschbare, Therapieverfahren. Die aktuelle Forschung konzentriert sich auf die Entwicklung ursächlicher Therapien, die den Zelluntergang stoppen oder gar umkehren sollen. Die zwei wesentlichen Standbeine dieser Entwicklung sind die Stammzellen- und Gentherapie, die sich verschiedener Substrate bedienen. Im Weiteren wird die Therapie mit neurotrophen Faktoren dargestellt.

Neurotrophe Faktoren in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen

Die Therapie mittels neurotropher Faktoren rückte für die ALS durch eine Untersuchung von Oosthuyse in den Blickpunkt der Forschung [95]. Bereits in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurden mehrere Therapieversuche mit Wachstumsfaktoren unternommen, die jedoch keine Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf bei Menschen ausüben konnten [22, 51, 52]. Die größte Herausforderung bei einer Therapie mit neurotrophen Faktoren besteht in der Auswahl einer geeigneten Darreichungsform, die zu ausreichenden Wirkstoffkonzentrationen in den gewünschten Arealen führt. Folgende Schwierigkeiten gilt es zu überwinden: Die Blut-Hirn-Schranke behindert bei peripherer Applikation das Übertreten der Wirksubstanz oder es erfolgt bereits eine periphere Degradation. Bei den Zielarealen handelt es sich um große und weitläufig verteilte Gebiete, zu denen unter Umständen kein einfacher anatomischer Zugang besteht. Darüber hin-

aus bedarf es einer möglichst kontinuierlichen Zufuhr, um die gewünschte Wirkung zu erzielen.

Eine Möglichkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, stellt die intrathekale Infusion dar. Dieser Ansatz zeigte mit dem Wachstumsfaktor *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) ein verlängertes Überleben bei Mäusen, während der Wachstumsfaktor *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) keinen positiven Effekt bewirkte. Ebenso konnte in einer klinischen Studie der Phase 1 ein leichter Vorteil durch intrathekale IGF-1-Gabe erzielt werden [88, 87].

Im Tierversuch stehen zwei Applikationswege zur Verfügung, die eine effektive Zufuhr von Wachstumsfaktoren ermöglichen. Zum einen, wie bereits erwähnt, durch direkte Infusion in den Liquorraum oder das Rückenmark/Gehirn, zum anderen durch Virus-vermittelten Gentransport, um Zielzellen in stete Quellen der Wachstumsfaktoren zu verwandeln. So wurde der Krankheitsverlauf durch intramuskuläre Injektion von IGF-1-kodierenden Adeno-assoziierten Viren (AAV) verlangsamt, selbst wenn diese Maßnahme erst nach Ausbruch der Symptomatik ergriffen worden war. Bemerkenswert an dieser Strategie waren der retrograde Transport der Viren zu den Motoneuronen und der Nachweis viraler Expressionen für mindestens 1 Jahr nach Injektion. Erfolgsunterschiede bestanden in Abhängigkeit von der verwendeten Substanz. Als nun dasselbe AAV-Konstrukt mit dem Wachstumsfaktor *Glia cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) kombiniert wurde, waren die Effekte geringer ausgeprägt [62]. Die Injektion von GDNF-kodierenden Viren (AAV oder Adenoviren) in den Muskel mit anschließendem retrograden Transport von GDNF in die Vorderhörner des Rückenmarks führte zu einer leichten Besserung der Klinik [127, 1].

Neben der Applikation in den Muskel besteht auch die Möglichkeit, die Viren direkt in den Liquorraum zu injizieren, was zur Folge hätte, dass direkt vor Ort die gewünschten Substanzen produziert würden. Auch mit dieser Strategie konnte eine Verbesserung der Klinik im Tierversuch erzielt werden [66, 35]. Eine besondere Schwierigkeit liegt aber auch hier in der Wahl der

richtigen Lokalisation. Die Viren müssten eventuell direkt in die Vorderhörner injiziert werden, um ihre Wirkung entsprechend entfalten zu können, doch geht dies mit großem Aufwand einher und stellt noch keine Lösung für die großflächige Versorgung mit der gewünschten Substanz dar.

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Substanzen IGF-1 und GDNF scheint VEGF ebenfalls ein interessanter Kandidat für die Therapie der ALS zu sein. Durch genetische Überexpression, intracerebroventrikuläre Zufuhr und intramuskuläre Injektion von VEGF-kodierenden Lentiviren konnte der Beginn und Verlauf der Erkrankung im Mausmodell positiv beeinflusst werden [128, 122, 9, 74, 20, 112].

In Bezug auf die PD ist die Anwendung von Wachstumsfaktoren in der Therapie ebenfalls ein vielversprechendes Forschungsgebiet. Hierbei stößt man jedoch auf ähnliche Schwierigkeiten, wie sie bei der ALS auftreten [104].

Stammzelltherapie neurodegenerativer Erkrankungen

Die Stammzelltherapie ist besonders für neurodegenerative Erkrankungen eine sehr vielversprechende Therapieoption, da durch sie zugrunde gegangene Neuronen ersetzt werden könnten. Hierdurch könnte die Funktionsfähigkeit erhalten oder wiederhergestellt werden. Neben dem Zellersatz werden Stammzellen auch als Möglichkeit gesehen, das Umfeld der Nervenzellen positiv zu beeinflussen. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass die von Stammzellen produzierten Substanzen GDNF, BDNF, IGF-1 oder VEGF das Überleben der Zellen verbessern und die klinische Symptomatik mildern [75, 74].

Die Umsetzung dieser Theorien bereitet jedoch beträchtliche Schwierigkeiten. Es existiert eine breite Palette verschiedener Stammzellen, angefangen bei den pluripotenten embryonalen Stammzellen über mesenchymale Stammzellen bis hin zu neuronalen Progenitorzellen. Deren Gewinnung gestaltet sich unter-

schiedlich aufwändig und ist mit eventuellen ethischen Hemmnissen verbunden. Eine relativ neue Option stellen die induzierten pluripotenten Stammzellen dar, die durch Reprogrammierung adulten somatischen Gewebes erzeugt werden. Die einzelnen Krankheiten aus der Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen sind durch den Zelltod charakterisiert, sodass man bei noch unbekannter Ursache eventuell von Erkrankung zu Erkrankung verschiedene Zelltypen auswählen muss, um das beste Resultat zu erzielen [75].

Bei der Anwendung embryonaler Stammzellen müssten die Patienten immunsupprimiert werden, während dies bei autolog transplantierten, mesenchymalen Stammzellen nicht notwendig wäre. Neben den Schwierigkeiten im Rahmen der Stammzellengewinnung stellen auch die unterschiedlichen Applikationswege viele Herausforderungen dar. Will man die Zellen in eng umschriebene Lokalisationen, wie etwa die *Substantia nigra* bei der PD, injizieren, scheint dies noch durchführbar. Bei der AD oder auch der ALS sind die betroffenen Areale jedoch so weitläufig, dass es operativ schwierig wäre, alle Gebiete ausreichend mit Stammzellen zu versorgen [75, 20].

Eine weitere Schwierigkeit liegt in der Komplexität des Nervensystems. Werden Stammzellen nun implantiert, um als neuronaler Zellersatz zu dienen, müssten sie erst die nötigen synaptischen Verbindungen eingehen, die für die Funktionstüchtigkeit absolut unerlässlich sind. Im Falle der ALS liegen große Distanzen zwischen den Vorderhörnern und den peripheren Muskeln, die korrekt überbrückt werden müssten. Eine besondere Herausforderung wird zudem der Transfer vom Tierversuch im Mausmodell in den Menschen darstellen, da sich die Größe beträchtlich unterscheidet [20, 74, 75].

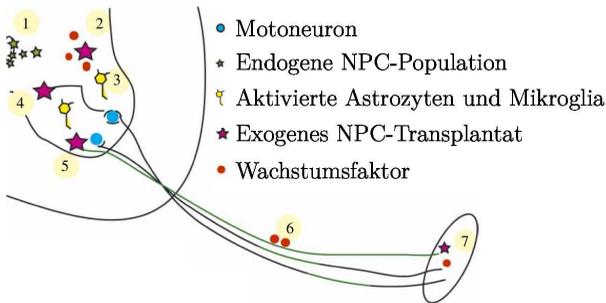


Abbildung 6: Schematische Darstellung über den Einsatz von Stammzellen in der Therapie der ALS: (1) Anregung der endogenen neuronalen Vorläuferzellen (NPC), das Rückenmark zu reparieren. (2) Wachstumsfaktorzufuhr durch NPCs, um die neurotrophe Unterstützung der vorhandenen Zellen zu steigern. (3) Ersatz von gestörten Astrozyten und Mikroglia. (4) Wiederherstellung der neuronalen Verschaltung innerhalb des Rückenmarks. (5) Motoneuron-Ersatz: NPC differenzieren zu Motoneuronen und bilden Axone in die Peripherie aus. (6) Unterstützung der Axone durch Wachstumsfaktoren, um Verbindungen in die Peripherie auszubilden. (7) Lokale Produktion von Wachstumsfaktoren im Muskel, um die neuromuskuläre Verbindung und die Axone zu schützen (aus [74]).

Das Konzept: Stammzellen als „Trojanische Pferde“

Die Zukunft der Therapie der neurodegenerativen Erkrankungen scheint trotz der genannten Herausforderungen in der Stammzelltherapie zu liegen. Die klinische Anwendung als Zellersatztherapie liegt noch in etwas entfernterer Zukunft. Das im Rahmen dieser Arbeit präsentierte Therapiekonzept mit den dargelegten Vorarbeiten scheint, entsprechend der vorliegenden Daten, vielversprechend für die Therapie der ALS und eventuell anderer

neurodegenerativen Erkrankungen zu sein. Dennoch lehrt die Vergangenheit, dass das wahre Potential auch im Tierversuch erfolgreicher Therapien erst in klinischen Studien abschließend beurteilt werden kann.

Die größten Schwierigkeiten der Therapie mit Wachstumsfaktoren liegen, wie bereits erwähnt, in der Sicherstellung einer anhaltenden, ausreichend hohen und zielgenauen Bereitstellung der neurotrophen Faktoren. Um diesen Herausforderungen zu begegnen, wird ein Vorschlag von Appel *et al.* aufgegriffen [8]. Es werden hämatopoetische Stammzellen als „Trojanische Pferde“ für die Bereitstellung der Wachstumsfaktoren verwendet. Wie gezeigt werden konnte, wandern die Stammzellen selbständig in die betroffenen Hirn- und Rückenmarksareale. Wenn man nun, durch genetische Veränderung der Stammzellen mittels lentiviraler Vektoren, diese in kleine, über lange Zeit produzierende und an den gewünschten Stellen ansässige „Minipumpen“ für neurotrophe Faktoren verwandelt, können mehrere Probleme gleichzeitig gelöst werden. Es bedürfte keines operativen Eingriffs im Rückenmark, der, um alle Areale zu erreichen, sehr großflächig ausfallen müsste. Die Wachstumsfaktoren würden über längere Zeit gleichbleibend produziert, sodass Wirkstoffschwankungen überwunden wären und den Halbwertszeiten nur noch nachrangige Bedeutung zukäme.

Zielsetzung

Die ALS ist eine unaufhaltsam fortschreitende neurodegenerative Erkrankung mit isoliertem Befall des motorischen Systems, für die bislang keine effektive Therapie existiert. Aktuelle Forschungen untersuchen die Anwendung von Stammzellen und (neurotrophen) Wachstumsfaktoren. Eine besondere Schwierigkeit für den Einsatz von Wachstumsfaktoren stellt deren zielgerichtete Applikation dar. Diese Dissertation behandelt die Vorarbeiten zu einem neuartigen Therapiekonzept, im Rahmen dessen hämatopoetische Stammzellen, welche gemäß Appel *et al.* in die betroffenen Areale einwandern, in lokal ansässige „Minipumpen“ für neurotrophe Faktoren verwandelt werden.

Die experimentelle Umsetzung gliedert sich in mehrere Abschnitte. Nach der Wahl geeigneter neurotropher Wachstumsfaktoren müssen Vektoren entwickelt werden, die diese beinhalten und für die Verwendung in lentiviralen Vektorsystemen geeignet sind. Anschliessend bedarf es der Amplifikation für die Virusproduktion ausreichender DNA-Mengen. Die produzierten Viren werden durch *in vitro* Transduktion auf ihre Funktionstüchtigkeit untersucht. Weitere Schritte, deren Durchführung jedoch nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit geplant war, dienen der Verifizierung des Konzepts in einem Mausmodell der ALS. Hierfür muss Knochenmark extrahiert und daraus hämatopoetische Stammzellen isoliert werden. Diese werden durch die Viren transduziert und anschließend in die Versuchstiere intravenös injiziert. Das Knochenmark dieser Mäuse wird vor Injektion der Zellen durch Bestrahlung depletiert. Die Versuchstiere werden bezüglich des primären Endpunktes „Überleben“ und des sekundären Endpunktes „Verlauf der motorischen Funktion“ überwacht.

Material und Methoden

Laborausrüstung

Inkubator für Zellkulturen (Heraeus, ThermoScientific)
Sterile Werkbank (Hera Safe, Heraeus Instruments)
Zentrifugen (Eppendorf, Hettich, Sorvall, Beckman-Coulter)
Fireboy (Integra Biosciences)
Pipetboy (Integra Biosciences)
Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
Wasserspender für de-ionisiertes H₂O, Milli-Q (Millipore)
Kühlschrank 4°C (Liebherr)
Kühlschrank -20°C (Liebherr)
Tiefkühltruhe -80°C
Spektrophotometer NanoDrop (ThermoScientific)
Zählkammer für Zellen (Reichert, Bright-Line)
Pipetten (Eppendorf)
Pipettenspitzen (10, 20, 200, 1000 µl) (Eppendorf)
Lichtmikroskop (Zeiss, Leica, Hund Wetzlar)
Bakterieninkubator
Bakterienschaker (Infors HT)
UV-Präparationstransluminator (Bachofer Laboratoriumsgeräte)
UV-Transluminator (Bio-Rad)
Gel-Analyse-Programm (Quantity One, Bio-Rad)
Autoklaven (Varioclav, ThermoScientific, Webeco)
Waage (Mettler-Toledo)
Spannungsregulator für Gelelektrophorese, Power Pac 3000 (Bio-Rad)

Temperaturregulatoren Thermocycler T3 (Biometra)/ Thermo-Stat plus (Eppendorf)

Molekularbiologische Methoden

Verwendete Materialien

Lysogeny broth-Medium (LB-Medium): 10.0 g Tryptone, 5.0 g Hefe-Extrakt, 10.0 g NaCl, 950ml H₂O, pH-Anpassung auf 7,0 mittels 5,0N NaOH falls erforderlich, H₂O auf 1 Liter ergänzen, Autoklavierung für 20 min; Antibiotikum hinzufügen entsprechend der benötigten Konzentration, z.B.: 100µg/ml Ampicillin.

Gefriermedium (FMB): 40% Glycol, 60% LB-Medium.

LB-Agar: 10.0 g Tryptone, 5.0 g Hefe-Extrakt, 10.0 g NaCl und 1.5% Agar in 950ml H₂O gelöst, pH-Anpassung auf 7,0 mittels 5,0N NaOH falls erforderlich, H₂O auf 1 Liter ergänzen, Autoklavierung für 20 min; Antibiotikum hinzufügen entsprechend der benötigten Konzentration, z.B.: 100µg/ml Ampicillin; Anschließend in Bakterienkulturplatten ausgegossen (ca. 25ml/100mm Platten).

SOC-Medium: 2% Tryptone, 0.5% Hefe-Extrakt, 10mM Natriumchlorid, 2.5mM Kaliumchlorid, 10mM Magnesiumchlorid, 10mM Magnesiumsulfat, 20mM Glukose.

10x TAE-Puffer: 242g Trizma-Base; 100ml 0,5M EDTA; pH 8,0; 57,2ml Eisessig und H₂O ad 1 Liter.

Bakterienaufbewahrung

Für die langfristige Aufbewahrung von Bakterien werden die Kulturen in LB-Medium mit FMB im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80°C gelagert.

DNA-Lagerung

DNA wurde bei -20°C gelagert und jeweils kurz vor der Anwendung auf Eis aufgetaut.

Hitze-Schock-Transformation von kompetenten Bakterien

One ShotStbl3 kompetente E.coli (Invitrogen) wurden entsprechend dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll transformiert. Hierzu wurde einem Reaktionsgefäß, das $5\mu\text{l}$ der aufgetauten Bakterien enthielt, die Ziel-DNA hinzugefügt und vorsichtig vermischt. Diese Mischung wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 45 Sekunden auf 42°C erwärmt. Danach wurde sie für 2 Minuten auf Eis gelagert, bevor $250\mu\text{l}$ SOC-Medium untergemischt wurden. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C und 225 rpm im Bakterienschaker. Im Anschluss wurde der Inhalt in unterschiedlichen Mengen ($25\text{-}100\mu\text{l}$) auf vorgewärmten und mit entsprechenden Antibiotika versetzten LB-Agarplatten verteilt. Nicht verbrauchtes Material wurde bei 4°C gelagert. Auf diese Weise bearbeitete Agarplatten wurden auf dem Deckel liegend bei 37°C über Nacht inkubiert.

Plasmidpräparationen

Plasmidpräparation im kleinen Maßstab

Um die Plasmide einzelner Bakterienkolonien untersuchen und weiter bearbeiten zu können, musste die entsprechende DNA in ausreichenden Mengen und guter Qualität gewonnen werden. Dazu wurden ausgewählte Kolonien in 4ml LB-Medium übertragen und nach Beimengung des entsprechenden Antibiotikums für 16 Stunden bei 37°C unter beständigem Schütteln (225rpm) inkubiert. Die Bakterien wurden geerntet, indem die Kulturen bei Raumtemperatur für 3 Minuten zentrifugiert wurden und anschließend der Überstand sorgfältig entsorgt wurde. Im Weiteren wurden kommerzielle Reagenzien (Qiagen) gemäß den Instruktionen des Herstellers verwendet. Das Pellet wurde mit $250\mu\text{l}$

des Puffers P1, dem RNase A und *LyseBlue* hinzugefügt worden war, resuspendiert und in ein Mikrozentrifugationsröhrchen (Eppendorf) übertragen. *LyseBlue* ist ein Indikator, der durch Farbumschlag anzeigt, ob die verwendeten Puffer optimal gemischt wurden und hilft so, die Effizienz zu steigern. Im nächsten Schritt wurden 250µl des Puffers P2 hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Zum Unterbrechen der Lyse wurden nach spätestens 5 Minuten 350µl des Neutralisationspuffers N3 hinzugefügt und abermals vorsichtig geschüttelt, bis sich die blaue Farbe vollständig zurückgebildet hatte. Die nun sichtbaren Ausfällungen wurden mit ca. 17000 x G für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand in eine Zentrifugationssäule überführt. Nach abermals 30-60 Sekunden Zentrifugation wurde der Durchfluss verworfen. Um einen hohen Reinheitsgrad zu erhalten, wurde die Säule zuerst mit 500µl des Puffers PB gewaschen, der Durchfluss verworfen und dieser Schritt mit 0.75ml des Puffers PE wiederholt. Anschließend wurde die Säule eine weitere Minute zentrifugiert, um sie von allen Pufferrückständen zu säubern. Um die im Filter enthaltene DNA zu extrahieren, wurden 50µl des Puffers EB appliziert und mit einem neuen Reaktionsgefäß für 1 Minute zentrifugiert.

Plasmidpräparation im großen Maßstab

Um für die Virusproduktion ausreichende Mengen der Plasmide in hoher Konzentration zu gewinnen, wurde auf das NucleoBond Xtra Maxi-Kit (Marcherey&Nagel) zur Endotoxin-freien Präparation zurückgegriffen. Zu Beginn wurde eine Vorkultur von bereits klassifizierten und kontrollierten Bakterienstämmen in 4ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angelegt und für 8 Stunden bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurde diese in 300ml LB-Medium überführt und für weitere 16 Stunden unter denselben Bedingungen inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 4°C und 6000 x G zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 12ml des Puffers RES-EF vollständig resuspendiert und unter Zugabe von 12ml des Puffers LYS-EF lysiert. Danach folgte eine

5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. In der Zwischenzeit wurden die Filtrationssäulen durch Äquilibration mit 35ml des Puffers EQU-EF vorbereitet. Um die Lyse zu unterbrechen, wurden 12ml des Puffers NEU-EF hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation auf Eis von 5 Minuten. Die gesamte Mixtur wurde anschließend in die vorbereiteten Säulen überführt. Nach der Waschung des Filters mit 10ml des Puffers FIL-EF konnte der NucleoBond Xtra Filter entfernt werden. Jetzt wurde die Säule mit 90ml des Puffers ENDO-EF gereinigt. Es folgte eine dritte Reinigung mit 45ml des Puffers WASH-EF. Die im Filter enthaltene DNA wurde mit 15ml des Puffers ELU extrahiert. Um eine höhere DNA-Konzentration zu erreichen, wurde dieses Extrakt mit 10.5ml Isopropanol vermischt, was zum Ausfallen der DNA führte. Nach Zentrifugation (15 000 x G, 4°C, 30 Min.) und Absinken der Präzipitate auf den Boden des Röhrchens wurde der Überstand verworfen. Um das verbliebene Isopropanol zu entfernen, wurde das DNA-Pellet mit 5ml 70%igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (15 000 x G, RT, 5 Min.). Das Ethanol wurde weitestgehend mit einer Pipette entfernt und der Rest bei Raumtemperatur für 15 Minuten vollständig verdunstet. Das DNA-Präzipitat wurde anschließend mit einer kleinen Menge sterilem H₂O gelöst, um eine möglichst hohe Konzentration zu erreichen. Durchschnittlich konnte das Präzipitat in ca 1.5ml H₂O resuspendiert werden. Auch diese DNA wurde zur Lagerung bei -20°C tiefgefroren.

Anwendung von Restriktionsenzymen

Um DNA an bestimmten Stellen zu schneiden, wurden der entsprechenden Sequenz angepasste Restriktionsenzyme (Fermentas, NEB) gemäß der Herstellerangaben eingesetzt. Dabei wurden ca. 5µl DNA, 1µl Enzym und, bei einem Zielvolumen von 30µl, 3µl 10x FastDigest (bei Verwendung der FastDigest-Enzyme, andernfalls entsprechende Puffer) Puffer verwendet und anschließend das Restvolumen mit de-ionisiertem Wasser aufgefüllt. Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurden die Restriktionsenzyme durch 5-minütiges Erhitzen auf 80°C inaktiviert. Wurden gleichzeitig

zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet, so wurde ein kompatibler Puffer verwendet.

Verwendete Restriktionsenzyme:

Enzym	BamHI	BglII
Zielsequenz	GGATCC	AGATCT
Enzym	Sall	SmaI
Zielsequenz	GTCGAC	CCCGGG
Enzym	EcoRI	XbaI
Zielsequenz	GAATTC	TCTAGA
Enzym	EcoRV	XhoI
Zielsequenz	GATATC	CTCGAG

Anwendung des Klenow-Fragments

Falls sich durch Restriktionsenzyme ausschließlich Enden mit einem 3' und/oder 5'-Überhang bilden ließen, jedoch stumpfe Enden notwendig waren, konnte dies durch die Anwendung des Klenow-Fragments (Fermentas) erreicht werden. Es wurde folgende Mixtur angesetzt: 10-15µl der Ziel-DNA, 2µl des 10x Puffers für Klenow-Fragmente, 0,5µl eines dNTP Mix, 0,1-0,5 µl Klenow-Fragment und ergänzte mit nuklease-freiem Wasser bis 20µl . Diese wurde für 15 Minuten bei 30°C inkubiert und anschließend die Reaktion durch Hitze-Inaktivierung (75°C, 10 min) gestoppt.

DNA-Dephosphorylierung

Falls sich im Rahmen der Anwendung von Restriktionsenzymen Enden bildeten, die aufgrund ihrer Kompatibilität bereits ohne die Zugabe einer Ligase religierten, entfernte man mit Hilfe der Antarctic Phosphatase (New England BioLabs) die 5' Phosphat-Gruppe der DNA. Dieses Vorgehen verhindert diesen Effekt, da ohne diese Phosphatgruppe keine Autoreligation möglich ist. Man mischt 5µl der Ziel-DNA mit 1µl Antarctic Phosphatase und

Antarctic Phosphatase Puffer und inkubiert dies für 15 Minuten bei 37°C um 5' Überhänge oder stumpfe Enden zu behandeln oder 60 Minuten, um auch 3' Überhänge effektiv zu dephosphorylieren. Durch 5-minütiges Erhitzen auf 65°C lässt sich dieses Enzym inaktivieren und der Prozess stoppen.

DNA-Ligation

Um DNA-Fragmente miteinander zu verbinden, wurde T4 DNA Ligase (Fermentas) verwendet und entsprechend der Herstellerangaben vorgegangen. Es wurden 2µl des Vektors und gegebenenfalls 5-6µl des Inserts, 1µl des 10x T4 DNA Ligase Puffers und 1µl T4 DNA Ligase verwendet. Diese Mischung wurde für eine Stunde bei 22°C inkubiert und anschließend für Transformationen verwendet.

Polymerasekettenreaktion

Zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Bei der Anwendung wurde sich an den Herstellerangaben der verwendeten Enzyme orientiert (New England Biolabs). Ein Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Menge	Substanz
2µl	DNA-Probe
5µl	10x EXT Puffer
2,5µl	sense Primer (10µM)
2,5µl	anti-sense Primer (10µM)
1µl	dNTP Mix (10mM/jeden Nukleotids)
0,5µl	EXT DNA-Polymerase
42,5µl	ddH ₂ O
50µl	Gesamtvolumen

Der Temperaturlauf hatte folgende Struktur [23]:

Temperatur	Dauer (sec)	Zyklen
94°C	120	1
94°C	30	6/20x
53/60°C	30	
72°C	45	
72°C	300	1
4°C	∞	1

Verwendete Primer:

Forward-PCR-Primer, 25-mer:

5'-ATGACCATCCTTTTCCTTACTATGG -3'

Reverse-PCR-Primer, 25-mer:

5'-CCCGGGCTATCTTCCCCTTTTAATG -3'

Gel-Extraktion von DNA-Proben

Für die Extraktion eines gewünschten DNA-Fragments aus einem Agarose-Gel, welches durch die nachfolgend beschriebene Gel-Elektrophorese separiert und identifiziert wurde, musste die entsprechende Bande ausgeschnitten und anschliessend unter Verwendung eines kommerziell erworbenen Kits wiederaufbereitet werden.

Zuerst wurde die ausgeschnittene Gel-Scheibe gewogen und anschließend die 3-fache Menge des Puffers QG aus dem Gel-Extraktionsset (Qiagen) hinzugefügt. Diese Mischung wurde für 10 Minuten bei 50°C inkubiert und in Intervallen von 2-3 Minuten mittels eines Vortex kräftig durchmischt. Nach dieser Behandlung sollte sich das gesamte Gel aufgelöst haben, sodass nun die einfache Menge Isopropanol zugegeben werden konnte. Der gesamte Inhalt wurde nun in ein QIAquick Spin-Röhrchen überführt und für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Filter anschliessend zweimal mit dem Puffer QC gewaschen. Um die nun im Filter enthaltene gereinigte DNA zu extrahieren, applizierte man 50µl des Puffers PE in die Mitte

des Filters, überführte das Röhrchen in ein neues Reaktionsgefäß und zentrifugierte abermals für 1 Minute. In dem Durchfluss war nun das DNA-Fragment enthalten und konnte für weitere Experimente verwendet werden.

DNA-Aufreinigung nach PCR und Anwendung von Restriktionsenzymen

Im Anschluss an eine PCR war es notwendig, die Primer sowie die Enzyme aus dem Gemisch zu entfernen. Ebenso wurde verfahren, wenn sich beim Einsatz von Restriktionsenzymen sehr kleine Fragmente bildeten oder sequenziell verschiedener Enzyme eingesetzt wurden. Um die DNA nun von diesen Kontaminanten zu befreien, wurde ein PCR-Purification-Kit (Qiagen) angewendet. Dieses Verfahren gleicht der Gel-Extraktion, jedoch ohne die Gel-Lyse.

Nach einer PCR wurde das 5-fache Volumen des Puffers PB hinzugefügt, nach der Anwendung von Restriktionsenzymen das 10-fache Volumen, ausgenommen die Fragmente waren $>100\text{bp}$. Dieser Ansatz wurde nun in eine QIAquick Spin-Säule übertragen und 1 Minute zentrifugiert. Der Filter wurde anschließend mit $0,75\text{ml}$ des Puffers PE gewaschen. Um alle Rückstände sicher zu entfernen, wurde die Säule nochmals 1 Minute zentrifugiert. Nach dem Transfer in ein neues Reaktionsgefäß wurde die in dem Filter enthaltene DNA mittels $50\mu\text{l}$ des Puffers EB eluiert.

DNA-Konzentrationsbestimmung

In den beschriebenen Verfahren kann die finale DNA-Gehalt nicht vorausgesagt werden. Aus diesem Grund wurde die DNA-Konzentration von Proben mit Hilfe eines Photospektrometers (Nanodrop, peqlab) bestimmt. Man applizierte $1\text{-}2\mu\text{l}$ der Testlösung auf den Sensor und ermittelte die darin enthaltene DNA-Konzentration bei einer Wellenlänge von 230nm .

DNA-Analyse mittels Agarose-Gel-Elektrophorese

Für die DNA-Gel-Elektrophorese wurde Agarose-Gel in Konzentrationen von 0,8 - 1,2 % mit 0,4µg/ml Ethidiumbromid in 1x TAE-Puffer verwendet. Welche Konzentration bei den einzelnen Untersuchungen zum Einsatz kam, hing von der erwarteten Größe der Fragmente ab. Je größer das Fragment war, desto geringer war die Agarosekonzentration und umgekehrt. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 *Loading Dye*-Puffer gemischt. Die Elektrophorese wurde in waagerechter Position durchgeführt, wobei das Gel von TAE-Puffer umgeben war. Als Bezugsgröße wurde in den meisten Fällen eine 1kb oder 2log Leiter (New England Biolabs) verwendet. Im Anschluss konnte die DNA entweder extrahiert und weiterverarbeitet werden, wie bereits beschrieben, oder das Bandenmuster wurde lediglich dokumentiert, um die Länge eines Fragments zu bestimmen. Dazu wurde unter Verwendung eines *Molecular Imager Gel Doc Systems* (Bio-Rad) ein Bild des mit Ethidiumbromid gefärbten Gels angefertigt.

Plasmid-DNA-Kontrollen

Plasmide wurden auf ihre Korrektheit der Sequenz entweder durch den enzymatischen Verdau mittels Restriktionsenzymen und anschließende Gel-Elektrophorese, oder durch Sequenzierung durch den institutsinternen Sequenzierungsservice geprüft.

Verwendete Primer:

pJET1.2 Forward Sequencing Primer, 23-mer:

5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC -3'

pJET1.2 Reverse Sequencing Primer, 24-mer:

5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG -3'

Zellkulturen

Verwendete Materialien

Für die Zellkulturen der *Packaging*-Zellen wurden kommerziell erworbene 293FT-*Human Embryonic Kidney*(HEK)-Zellen (Invitrogen) verwendet.

Zellmedium(CM): *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (D-MEM), 10% fetales bovines Serum (FBS), 2mM L-Glutamin, 0,1mM *Minimum Essential Medium* (MEM) nicht-essentielle Aminosäuren und 1mM MEM Natriumpyruvat. Das fertige Medium wurde mit einem Filter mit einer Porengröße von 0,45µm filtriert. Alle Substanzen wurden von Invitrogen bezogen.

CM+Antibiotika(AB): Um Medium mit Antibiotikum zu erhalten, wurde das ursprüngliche Zellmedium mit 500µg Geneticin (Invitrogen) pro ml Medium vermischt.

Gefriermedium(FMC): 90% Zellmedium, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO).

PBS: 8g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na₂HPO₄; 0,24g KH₂PO₄; pH auf 7,4 anpassen, ddH₂O ad 1 Liter. Durch Autoklavierung sterilisieren.

Trypan Blau: *Trypan Blue* 0,4 % Zellfärbemittel für die Zellzählung (Invitrogen)

Trypsin/EDTA: 0,05% Trypsin/0,02% EDTA-Lösung zur Dissoziation der *Packaging*-Zellen vom Untergrund (Invitrogen)

Gefrier Röhrchen: *CryoTube* 1.8ml (NUNC, Thermo Scientific)

Zentrifugationsgefäße: 15ml oder 50ml Falcon *Conical Tubes* (BD)

Zellkulturschalen: 100mm Falcon Petri-Schalen (BD)

Inkubationsbedingungen

Zur Kultivierung der *Packaging*-Zellen herrschten folgende Bedingungen: 37°C, 10% CO₂-Gehalt bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

Auftauen der *Packaging*-Zellen

Zellvorräte werden in Gefrierröhrchen mit 3×10^6 Zellen pro ml Gefriermedium bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurde das Gefrierröhrchen zügig in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Unmittelbar bevor der Inhalt vollständig aufgetaut war, wurde die Außenseite mit 70%-igem Ethanol dekontaminiert und anschliessend die Zellen in ein 15ml Zentrifugationsgefäß, das mit PBS gefüllt war, überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 8 Minuten bei 4°C und 1200 rpm. Das Pellet wurde anschließend in 2ml CM resuspendiert und auf einer 10cm Schale verteilt. Das Gesamtvolumen wurde durch Zugabe von CM auf 8ml erhöht und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium sorgfältig entfernt und durch CM+AB ersetzt. Unter täglicher Kontrolle wurde solange abgewartet bis 80-90% der Bodenfläche bewachsen war und die Zellen anschließend auf mehrere Schalen verteilt. Bevor aufgetaute Zellen weiterverarbeitet wurden, sollten sie mindestens drei dieser Zyklen durchlaufen haben.

Passagieren der *Packaging*-Zellen

Das gesamte Medium wurde sorgfältig abgesaugt und die adhärenten Zellen mit 10ml PBS gewaschen, um Rückstände von Medium und Serum zu entfernen. Es wurden 2ml von Trypsin/EDTA aufgebracht und die Schalen bei Raumtemperatur für 3-5 Minuten inkubiert, bis sich alle Zellen vom Untergrund gelöst hatten. Die Suspension wurde in ein 15ml Gefäß überführt, mit 13ml CM verdünnt und durch Zentrifugation (8 Minuten, 4°C, 1200rpm) gereinigt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml CM+AB resuspendiert. Die Zellzahl der Suspen-

sion wurde, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, bestimmt und entsprechend dieser Aliquote auf mehrere Zellkulturschalen verteilt, um eine Zelldichte von 2 bis 5×10^4 Zellen pro cm^2 zu erreichen. Das Volumen wurde durch vorgewärmtes CM+AB auf 8ml ergänzt.

Zählen der *Packaging*-Zellen

Das Zellwachstum ist nur bei optimaler Dichte gut. Deshalb ist es notwendig, die Zellzahl zu bestimmen. Es wurde aus diesem Grund eine kleine Menge der Zellsuspension in ein Reaktionsröhrchen überführt und soweit verdünnt, bis die erwartete Zellzahl zwischen 100-1000Zellen/0,1 μ l lag. Zu 1ml der Verdünnung mischte man 100 μ l Trypan Blau-Färbemittel. Nach 1-2 Minuten wurde mit Hilfe der Zählkammer die Anzahl der Zellen bestimmt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Gesamtzellzahl errechnet. Man konnte in der Zählkammer zwischen blau gefärbten und klaren Zellen unterscheiden, wobei sich die lebendigen Zellen klar darstellten. Unter Berücksichtigung dieser beiden Gruppen konnte der Prozentsatz der lebendigen Zellen berechnet werden:

$$\% \text{ lebendiger Zellen} = \left(1.00 - \frac{\text{Anzahl blau angefärbter Zellen}}{\text{Anzahl aller Zellen}} \right) \cdot 100$$

Es sollten mindestens 95% der Zellen keine Farbe aufnehmen, damit es sich um eine vitale Kolonie in der logarithmischen Wachstumsphase handelte.

Einfrieren der *Packaging*-Zellen

Um Vorräte von *Packaging*-Zellen anzulegen und somit jederzeit eine neue Kolonie starten zu können, mussten Zellen tiefgefroren werden. In den Gefrieröhrchen sollte eine Zelldichte von mindestens 3×10^6 Zellen herrschen. Wie in den letzten Abschnitten beschrieben, mussten die Zellen erst von der Unterlage losgelöst, gereinigt und gezählt werden, um dann im korrekten Verhältnis mit Gefriermedium gemischt zu werden. Das Gefriermedium

sollte stets frisch zubereitet und filtriert werden, um Verunreinigungen zu vermeiden. Die Aliquote wurden in Gefrier Röhrchen verteilt und zunächst in Styropor-Boxen auf -80°C abgekühlt, bevor sie in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt wurden.

Virusproduktion

Die Virusproduktion erfolgte gemäß eines Protokolls aus *Nature Protocols*, jedoch in abgewandelter Form [124]. Gemäß den geltenden Sicherheitsbestimmungen wurden alle Arbeiten in einem S2-Labor durchgeführt.

Verwendete Materialien

Hepes: HEPES (Invitrogen)

PolyLysin: PBS + 0,001% L-Lysin, filtriert mit $0,45\mu\text{m}$ Porengröße.

Opti-MEM: Opti-MEM *Reduced Serum Medium*, GlutaMAX (Invitrogen)

Lipofectamine: Lipofectamine 2000 *Transfection Reagent* (Invitrogen)

Sucrose: PBS+20% Sucrose

BSA: Rinder Serum Albumin (Invitrogen)

TCM: D-MEM, 2mM L-Glutamin, 0,27mM Asparagin, 0,1mM MEM nicht-essentielle Aminosäuren, 1mM Natriumpyruvat, 1% Penicillin-Streptomycin. 4 μl 2-Mercaptoethanol pro Liter.

TCM+10%FBS: 90% TCM; 10% nicht-inaktiviertes FBS (GIBCO)

150mm Schalen: 150mm x 20mm Petri-Schalen mit Nunclon Δ Oberfläche (NUNC, Thermo Scientific)

0.22µm-Filter: Stericup-Filter mit 0,22µm Porengröße (Millipore)

Rotor: SW-28 Swinging Bucket-Rotor (Beckman Coulter)

Vorbereitungen

Bevor mit der Virusproduktion begonnen werden konnte, mussten *Packaging*-Zellen entsprechend der vorangegangenen Erläuterungen vorbereitet werden. Darüber hinaus mussten ausreichende Mengen der benötigten Plasmide bereitstehen.

Ablauf der Virusproduktion

Tag 0

In Petri-Schalen mit 100mm Durchmesser sind circa 70% der Fläche mit 293FT-HEK-Zellen bewachsen. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden durch Beträufeln mit 2ml Trypsin/EDTA und Inkubation für 3-5 Minuten bei Raumtemperatur von der Bodenfläche vollständig abgelöst. Pro Milliliter Trypsin/EDTA werden 10ml Hepes hinzugefügt und diese Suspension in ein konisches Zentrifugationsröhrchen überführt. Dementsprechend konnte der Inhalt mehrerer Schalen in einem Röhrchen gesammelt und zentrifugiert (8 Minuten, 4°C, 1200rpm) werden.

In der Zwischenzeit wurde die gleiche Anzahl an Zellkulturplatten mit 150mm Durchmesser mit *PolyLysin* gespült und mindestens 30 Minuten unter UV-Bestrahlung getrocknet, bis keine feuchten Stellen mehr vorhanden waren. Nun wurden die Zellen in passenden CM-Volumina resuspendiert, sodass auf die 150mm Schalen gleiche Zellzahlen verteilt werden konnten. Anschließend wurde CM in dem Maße hinzugefügt, um das Zielvolumen von 20ml zu erreichen. Die *Packaging*-Zellen wurden entsprechend den bereits genannten Bedingungen für 24h inkubiert.

Tag 1

Nach einem Tag waren etwa 80% der Fläche der Petri-Schalen mit Zellen bedeckt. Dies stellte die ideale Zelldichte dar, da während der nachfolgenden Prozedur kein weiteres Aufteilen der Zellen mehr stattfinden würde. Die freien Flächen gaben den Zellen ausreichend Raum für die noch stattfindenden Zellteilungen.

Im Wasserbad wurde Opti-MEM auf 37°C aufgewärmt. Das CM von den 150mm Zellkulturplatten wurde vorsichtig abgesaugt und durch 14ml Opti-MEM ersetzt. Bevor nun die DNA hinzugefügt werden konnte, wurden die Zellen für 1 Stunde inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Plasmide wie folgt vorbereitet:

DNA-Ansatz	Lipofectamine-Ansatz
270µg der Ziel-DNA	1,218ml Lipofectamine
176µg pMDLg	+ OptiMEM
95µg pMD2G	
68µg pRSV	
+ OptiMEM	
Gesamtvolumen: 13,8ml	Gesamtvolumen: 13.8ml

Die beiden Ansätze wurden separat gründlich durchmischt und einzeln für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide zusammengefügt, abermals durchmischt und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von dieser Mixtur wurden nun 2,3ml pro Schale tröpfchenweise gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt.

Tag 2

Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt, in 50ml Falcon-Tubes abgefüllt und bei -80°C tiefgefroren. Die Schalen wurden mit je 14ml TCM+10% nicht - inaktiviertem FBS wieder aufgefüllt.

Tag3

Nach weiteren 24 Stunden wurde nun die gesamte Schale bei -80°C eingefroren. Der Zweck dieses Schrittes lag in der Zerstörung der *Packaging*-Zellen, sodass alle enthaltenen Viren freigesetzt wurden und die Verluste möglichst gering ausfielen.

Vor der Weiterverarbeitung mussten die Überstände beider Ernten noch mit einem $0,22\mu\text{m}$ Filter filtriert werden. Dank dieser Filtration konnten die Zelltrümmer effektiv entfernt werden, während die Virionen den Filter passieren konnten, da die hier verwendeten lentiviralen Virione einen Durchmesser von circa 110nm [103] aufweisen.

Aufbereitung der Viren

Obwohl man gemäß *Nature Protocols* [124] auch ohne weitere Arbeitsschritte die in den Überständen enthaltenen Viren verwenden könnte, wurde beschlossen, durch Zentrifugation die Konzentration zu erhöhen.

Tag 1

In die Rotorgefäße wurden zuerst 3ml Sucrose als Puffer eingefüllt und anschließend die Überstände der *Packaging*-Zellkulturen so aufgeteilt, dass sich gegenüberliegende Rotoren exakt aufwogen. Die Zentrifugation ($24\,000\text{rpm}$; $104\,000\times\text{G}$; 4°C ; 150min) wurde mit Hilfe einer Beckman Ultrazentrifuge L8-50M/E und einem Roter SW 28 unter Vakuum durchgeführt. Nach Abschluss dieses Vorgangs wurde der Überstand vorsichtig entfernt, sodass möglichst wenig überschüssiges Medium zurückblieb. Das Pellet wurde nun in $100\mu\text{l}$ PBS+ $0,5\%$ BSA je Probe resuspendiert und für 24 Stunden bei 4°C gelagert.

Tag 2

Am zweiten Tag wurden abermals $100\mu\text{l}$ PBS+ $0,5\%$ BSA je Ansatz hinzugefügt und gründlich durchmischt. Alle gelösten Virus-Pellets wurden anschließend in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt

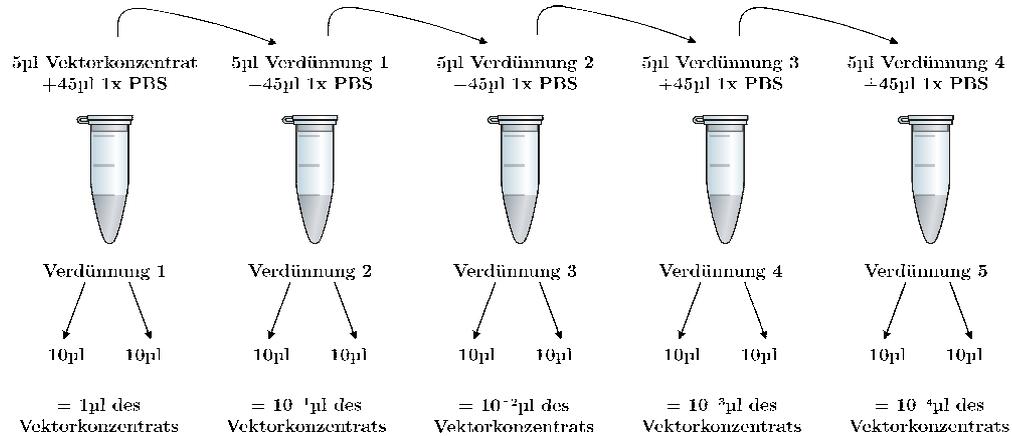
und bei -80°C gelagert. Um die Viruskonzentration zu ermitteln, wurden $75\mu\text{l}$ separat aufbewahrt. Anhand dieser konnte eine Verdünnungsreihe durchgeführt werden.

Transduktion

Um die Viruskonzentration zu bestimmen, wurden Titrationsen und Retransduktionen gemäß des Titrationsprotokolls von Tro-nolab durchgeführt². Dem entsprechend wurden 293FT-HEK-Zellen in 12-well Platten kultiviert und einem Titrationsverlauf folgend mit viralen Partikeln beimpft. Mit Hilfe des in den Konstrukten enthaltenen GFP-Gens kann die Menge der transduzierten Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt werden. Der Erfolg der Transduktion konnte darüber hinaus auch durch Fluoreszenzmikroskopie der Zellen dokumentiert werden.

Das beschriebene Verfahren ist sowohl für Viruskonzentrate als auch den unbehandelten Überstand geeignet.

²http://tcf.epfl.ch/files/content/sites/tcf/files/shared/LV_titration_FACS.pdf



51

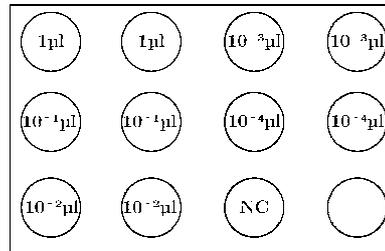


Abbildung 7: Titrationsschema (übersetzt und bearbeitet nach: *Tronolab Protocols*); NC: *negative control*

Ergebnisse

Dieser Abschnitt beschäftigt sich vorrangig mit der Herstellung der Zielpasmide, da diese die Basis für die Virusproduktion und somit die weiteren Experimente bilden. Anschließend werden die Ergebnisse der Virusproduktion und die Funktionsfähigkeit der Viren erläutert.

In dieser Arbeit wurde ein lentivirales HIV-1 Vektorsystem der dritten Generation verwendet, das sich aus vier Plasmiden zusammensetzt. Der Transfervektor enthält das Zielgen, während drei weitere sogenannte *Packaging*-Plasmide für die Virusbildung essentiell sind. Diese tragen aus Sicherheitsgründen die Gene für die Virushülle auf getrennten Plasmiden [103]. Nach erfolgreicher Transduktion mit den funktionstüchtigen Viren soll das Zielgen durch die transduzierten Zellen exprimiert werden.

Transfervektoren mit BDNF und GDNF

Es wurden zwei Ansätze mit unterschiedlichen Promotoren und den Wachstumsfaktoren BDNF und GDNF verfolgt. Beim Zielvektor mit PGK-Promotor handelte es sich um ein im Labor bereits vorhandenes, für den Einsatz in lentiviralen Vektorsystemen geeignetes Konstrukt. Es trug *Nephrilysin* (NEP) an jener Stelle, in die wahlweise entweder BDNF oder GDNF eingefügt wurde.

Jene Plasmide, die einen CMV-Promotor vor der Zielsequenz besaßen, trugen eine *Multiple Cloning Site* (MCS) an der ge-

wünschten Stelle.

BDNF wurde mit Hilfe einer PCR aus einem pMSCVneo-BDNF-Konstrukt isoliert und in einen pJET1.2-Vektor integriert. Hierbei handelt es sich um einen Vektor, welcher speziell für die Klonierung von PCR-Produkten geeignet ist. Die PCR produzierte beiderseits stumpfe Enden, sodass durch Sequenzierung die korrekte Insertion sowie die fehlerfreie Amplifikation nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 8).

GNDF wurde aus einem Ursprungsvektor gemäß Abbildung 9 isoliert und anschließend weiterverarbeitet.

Im Folgenden wird der Aufbau und die Herstellung der sechs Zielpasmide (Transfervektoren) dargelegt.

PGK-Promotor

Dieses Plasmid führt einen humanen X-chromosomalen Phosphoglyceratkinase 1 (PGK)-Promotor vor der Zielsequenz. Von diesem Promotor angeführte Gene werden stark exprimiert, sodass dieser für lentivirale Vektoren gut geeignet ist [103][102]. Zusätzlich beinhaltet dieses Plasmid eine *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) in Verbindung mit dem Reportergen *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) sowie das *Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element* (WPRE). Auf die Funktion dieser Bestandteile wird in der Diskussion eingegangen (siehe Seite 67ff).

Unter Verwendung dieses Promotors wurden drei Plasmide erstellt. Zuerst PGK-BDNF, bei dem anstelle von NEP BDNF

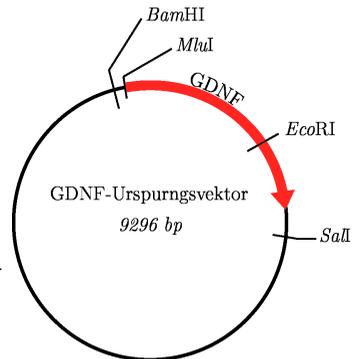
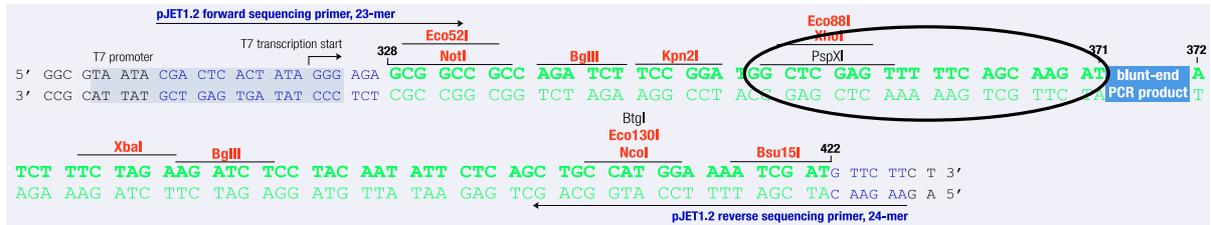
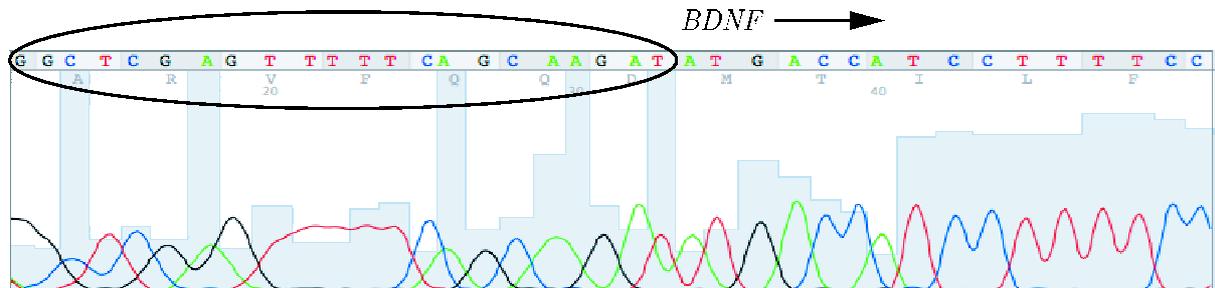


Abbildung 9: GDNF-Ursprungsvektor mit Angabe relevanter Schnittstellen für Restriktionsenzyme



(a) Herstellerangaben zur Sequenz und MCS von pJET1.2 angrenzend an die Insertionsstelle für PCR-Produkte.



(b) Ergebnis der Sequenzierung nach Insertion des PCR-Produktes BDNF in pJET1.2. Dargestellt ist der Beginn von BDNF inklusive des Start-Codons *ATG* im Anschluss an die Sequenz von pJET1.2.

Abbildung 8: Hierbei handelt es sich um die Gegenüberstellung der Herstellerangaben zu pJET1.2 und den Ergebnissen der Kontrollsequenzierung nach Insertion des PCR-Produktes von BDNF. Zur Veranschaulichung sind die korrespondierenden Sequenzen markiert. *ATG* stellt das Start-Codon von BDNF dar, wovon nur ein Fragment abgebildet ist.

eingefügt wurde. Dies war zuvor aus pJET1.2 entnommen worden.

In einem weiteren Konstrukt wurde NEP durch GDNF ersetzt.

Als Negativkontrolle wurde in einem weiteren Ansatz lediglich NEP entfernt und das Plasmid ohne Insert religiert. Auf diese Weise konnten drei Konstrukte erzeugt werden, die sich ausschließlich in den Zielgenen unterscheiden, wodurch die bestmögliche Vergleichbarkeit gewährleistet wird.

Bei beiden Varianten wurde der PGK-Zielvektor identisch vorbereitet: NEP wurde mit *Bam*HI und *Sma*I extrahiert. GDNF musste in zwei Schritten vorbereitet werden. Zuerst wurde mit *Bam*HI begonnen und das nun freie Ende mit Hilfe des Klenow-Fragments in ein stumpfes Ende umgewandelt. Im zweiten Schritt konnte das GDNF-Gen mit *Sal*I freigesetzt werden.

Zur Extraktion von BDNF aus pJET1.2 wurde nach der ersten Reaktion mit *Xba*I dieses Ende ebenfalls in ein stumpfes Ende umgewandelt, während die zweite Seite mit *Bgl*II geschnitten wurde.

Auf diese Weise konnte durch die Wahl der geeigneten Restriktionsenzyme für beide Varianten eine unidirektionale Insertion vorbereitet werden.

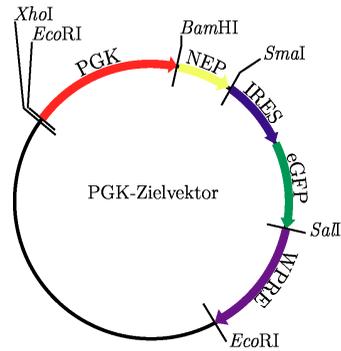


Abbildung 10: PGK-Zielvektor. Es sind zusätzlich relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme angegeben. Der Promotor PGK wird gefolgt von NEP, IRES, dem Reportergen eGFP und dem posttranskriptionellen Regulationselement WPRE. BDNF und GDNF werden anstelle von NEP eingefügt.

Plasmidkontrolle

Zur Validierung der Plasmide wurden Kontrolluntersuchungen mit den angegebenen Restriktionsenzymen und Sequenzierungen durchgeführt. Abbildung 11 zeigt die Restriktionsenzym-Analyse von PGK-*BDNF*-IRES-eGFP.

Die Negativkontrolle wurde mittels der Restriktionsenzyme *SalI*-*BamHI*, *BamHI* und *XhoI*-*SalI* überprüft.

- PGK-*BDNF*-IRES-eGFP: *XhoI*-*SalI* (erwartetes Fragment: ca. 470bp) und *XhoI* (erwartete Fragmente: ca. 2000bp und ca. 540bp)
- PGK-*GDNF*-IRES-eGFP: *EcoRI* und *EcoRI*-*BamHI* (In Abbildung 12 ist eine Gegenüberstellung des errechneten Bandenmusters und dem tatsächlichen Erscheinungsbild der Gel-Elektrophorese dargestellt.)

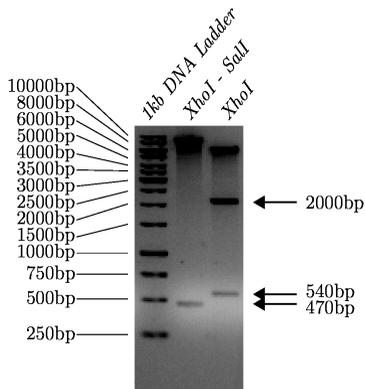
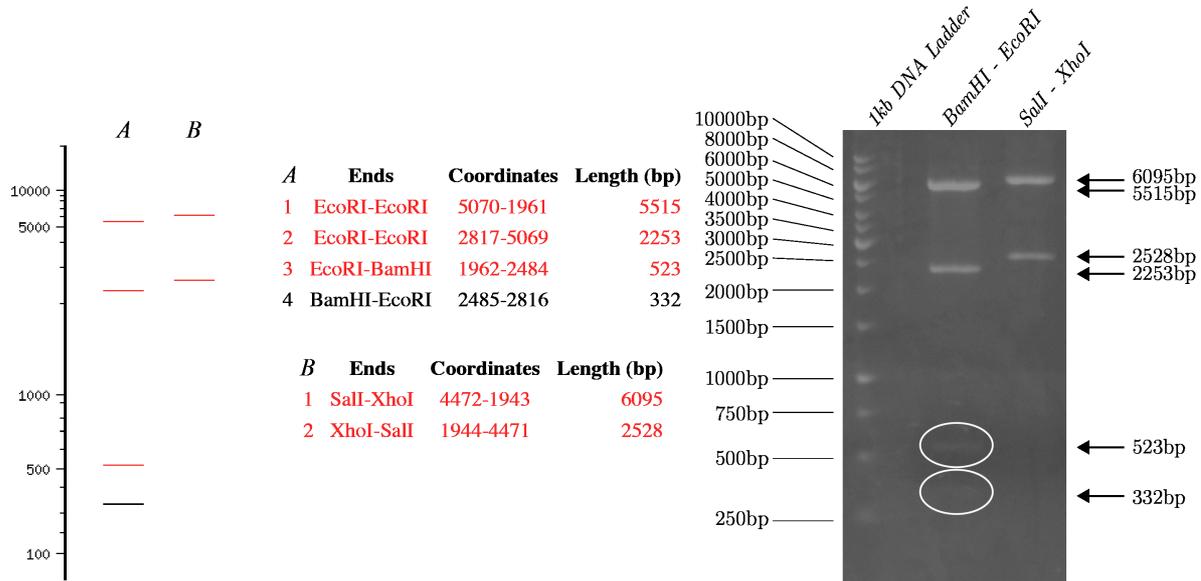


Abbildung 11: Gel-Elektrophorese des Konstruktes PGK-*BDNF*-IRES-eGFP zur Überprüfung der Korrektheit der Insertion. Die erwarteten Fragmente mit ca. 2000bp, 540bp und 470bp Größe sind markiert.



(a) Erwartetes Bandenmuster berechnet und dargestellt durch die Software NEB-Cutter

(b) Ergebnis der Gel-Elektrophorese

Abbildung 12: Gegenüberstellung des erwarteten Bandenmusters gemäß Software und des Ergebnisses der Gel-Elektrophorese von PGK-*GDNF*-IRES-eGFP. Es wurden die Restriktionsenzyme BamHI, EcoRI, SalI und XhoI verwendet.

CMV-Promotor

Bei diesen Konstrukten wurde analog zum Vektor mit PGK-Promotor verfahren. Der CMV-Promotor ist ein interner humaner Cytomegalie-Virus 'immediate early region enhancer-promotor'. Auch bei diesen Konstrukten wurde vor IRES-eGFP entweder GDNF oder BDNF eingefügt und mittels Kontrolluntersuchungen die Korrektheit überprüft.

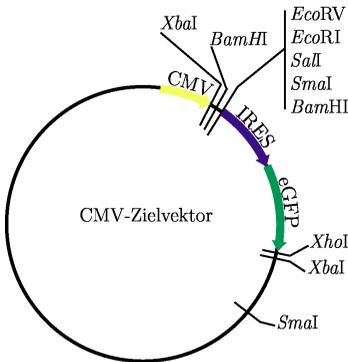


Abbildung 13: CMV-Zielvektor. Dieser Vektor enthält den Promotor CMV sowie vor IRES eine MCS. IRES wird gefolgt von dem Reportergen eGFP.

Vektor gewonnen. Der CMV-Zielvektor wurde mit *Sall* und *EcoRV* vorbereitet.

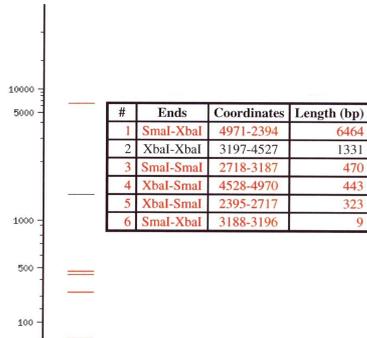
Plasmidkontrolle

Die Negativkontrolle des CMV-IRES-eGFP Plasmids wurde durch eine Reaktion mit dem Restriktionsenzym *XbaI* kontrolliert.

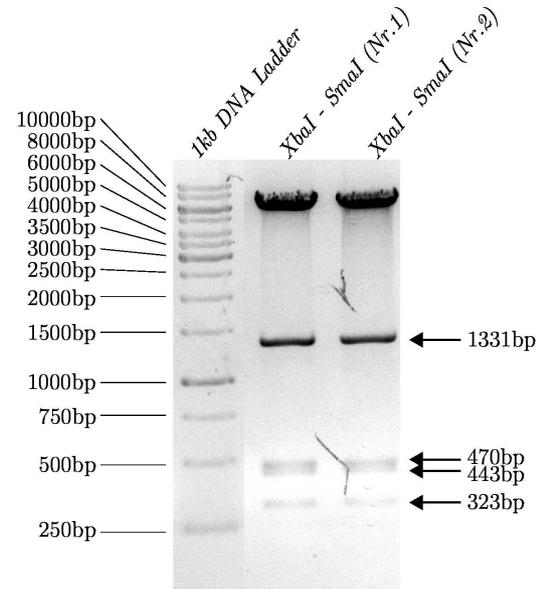
Ob im CMV-Zielvektor nach der Ligation und Transformation auch tatsächlich BDNF oder GDNF enthalten war, wurde

BDNF wurde mit Hilfe von *BglII* aus pJET1.2 gewonnen und in CMV-Zielvektor eingefügt. Dieses wurde zuvor mit *BamHI* linearisiert. Das freigesetzte, 83bp große Fragment wurde extrahiert und eine ungewollte Re-Ligation durch Dephosphorylierung verhindert. Dieses Vorgehen barg das Risiko, dass BDNF in falscher Orientierung integriert wurde. Anhand des Bandenmusters konnte jedoch zwischen beiden Fällen unterschieden werden.

GDNF wurde auf dieselbe Weise wie für den PGK-



(a) Erwartetes Bandenmuster berechnet und dargestellt durch die Software NEB-Cutter



(b) Ergebnis der Gel-Elektrophorese, 2 Proben

Abbildung 14: Gegenüberstellung des erwarteten Bandenmusters gemäß Software und des Ergebnisses der Gel-Elektrophorese von CMV-*BDNF*-IRES-eGFP. Es wurden die Restriktionsenzyme XbaI und SmaI verwendet. Es sind 2 Proben abgebildet, die identische Ergebnisse erbrachten.

wie folgt überprüft:

- CMV-*BDNF*-IRES-eGFP: *XbaI*–*SmaI* (siehe Abbildung 14)
- CMV-*GDNF*-IRES-eGFP: *XhoI*–*EcoRI* (erwartete Fragmentgröße: ca. 1600bp)

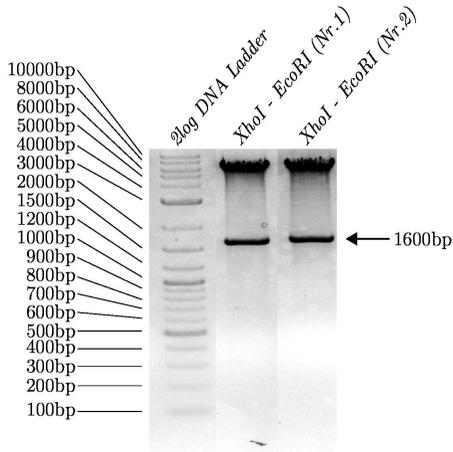
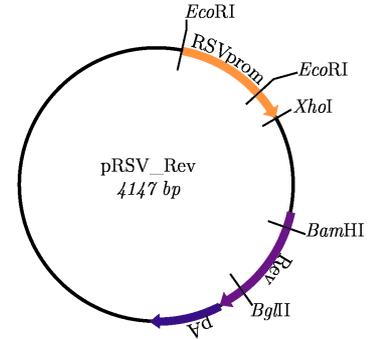
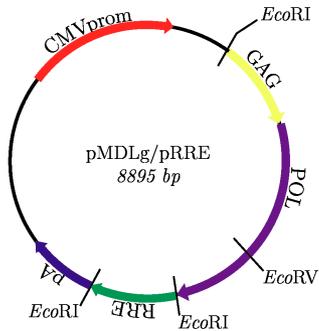


Abbildung 15: Gel-Elektrophorese von zwei Proben des Konstruktes CMV-*GDNF*-IRES-eGFP zur Überprüfung der Korrektheit der Insertion. Das erwartete Fragment mit ca. 1600bp ist markiert.

***Packaging*-Plasmide**

Bei diesen drei „*Packaging*-Plasmiden“ handelt es sich um zwei *Packaging*-Plasmide im engeren Sinn und ein *Envelope*-Plasmid. Deren Aufbau und wesentliche Bestandteile sind in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt [103].



61

(a) Dieses Konstrukt enthält einen CMV-Promotor (*CMVprom*) sowie das Gen *GAG*, das für die strukturellen Proteine Matrix, Capsid und Nucleocapsid codiert, welche an der Formung des viralen Partikels und an der Verpackung (*Packaging*) der viralen genomischen RNA beteiligt sind. *POL* wiederum codiert für die Replikationsenzyme Protease, reverse Transkriptase und Integrase. Das *Rev Response Element* (RRE) bewirkt in Verbindung mit *REV* einen effizienteren nukleären Export der mRNA. *pA* führt zur Polyadenylierung der RNA [103].

(b) In diesem Konstrukt liegt ein *Rous Sarcoma Virus long-term-repeat (LTR)-Promotor* (*RSVprom*) vor. *Rev* codiert für das regulatorische Protein *REV*, das in Verbindung mit RRE den nukleären Export der mRNA fördert [103].

Abbildung 16: *Packaging*-Plasmide

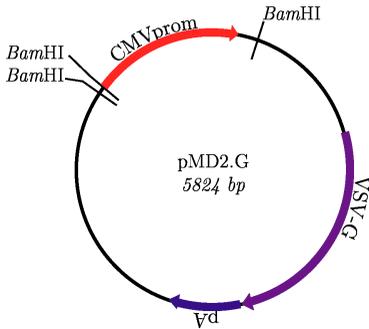


Abbildung 17: Unter der Kontrolle des CMV-Promotors (*CMVprom*) wird das *Envelope*-Gen *G-Glykoprotein* Gen des *Vesicular Stomatitis Virus* (*VSV-G*) transkribiert. Dies führt zur Ausbildung eines pseudotypisierten Virus mit *VSV-G-Envelope* [103].

Die Korrektheit dieser Plasmide wurde durch Reaktion mit entsprechenden Restriktionsenzymen und anschließender Gel-Elektrophorese überprüft. Das dabei entstandene Muster wurde mit dem erwarteten Muster verglichen und somit die Richtigkeit dokumentiert.

Alle in diesem Abschnitt besprochenen Plasmide wurden zur Vervielfältigung in *Stbl3*-kompetente Zellen transformiert.

Plasmiderzeugung für die Transfektion der *Packaging*-Zellen

Die für die Virusproduktion notwendigen großen DNA-Mengen wurden entsprechend der Angaben im Abschnitt über Plasmidpräparation (siehe Seite 36) hergestellt. In Abbildung 18 ist ein Messergebnis der erhaltenen DNA-Konzentrationen exemplarisch wiedergegeben. Ähnliche Konzentrationen wurden bei allen Plasmiden erreicht. Bei einem Gesamtvolumen von 1.5ml ergibt dies ca. 650µg DNA. Die Streubreite der Erträge der einzelnen Präparationen reichte von ca. 400µg bis 1900µg.

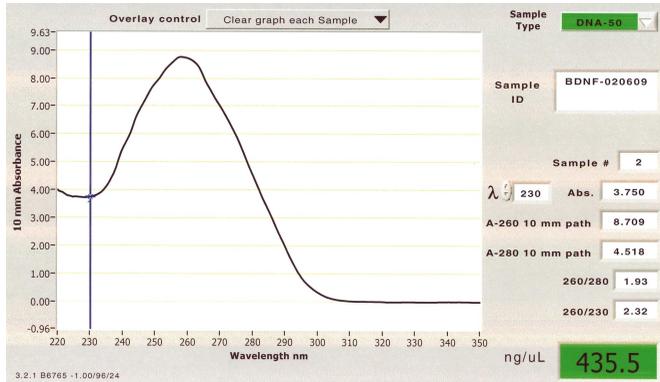


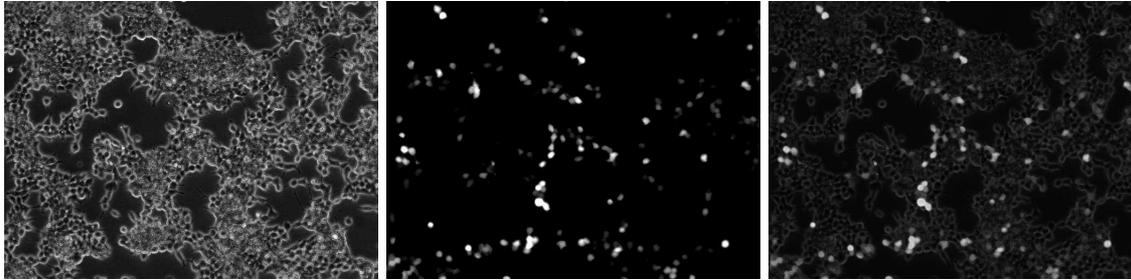
Abbildung 18: Photospektroskopische Analyse der DNA-Konzentration nach Plasmidpräparation mittels eines Xtra Maxi Kits; PGK-*BDNF*-IRES-eGFP

Transfektion der *Packaging*-Zellen

Zur Herstellung ausreichender Virusmengen wurden möglichst viele transfizierte *Packaging*-Zellen benötigt. Hiefür wurde gemäß dem bereits beschriebenen Verfahren (siehe Seite 46) vorgegangen. In Abbildung 19 sind zwei Bilder einer *Packaging*-Zellkultur nach Transfektion dargestellt. Es handelt sich hierbei um Aufnahmen einer Kultur als Phasenkontrast- und GFP-Fluoreszenzbild. Jene Zellen, die GFP enthalten, leuchten hell auf. Zur Veranschaulichung ist zudem ein *Overlay* beider Aufnahmen in Abbildung 19c wiedergegeben. Dies macht deutlich, dass die Transfektion erfolgreich war.

Transduktion der *Packaging*-Zellen

Die Funktionstüchtigkeit der Viren wurde durch Transduktion von *Packaging*-Zellen überprüft. Hierbei wurde zuvor eine Verdünnungsreihe der aufkonzentrierten Virenpräparation hergestellt



(a) Phasenkontrastdarstellung

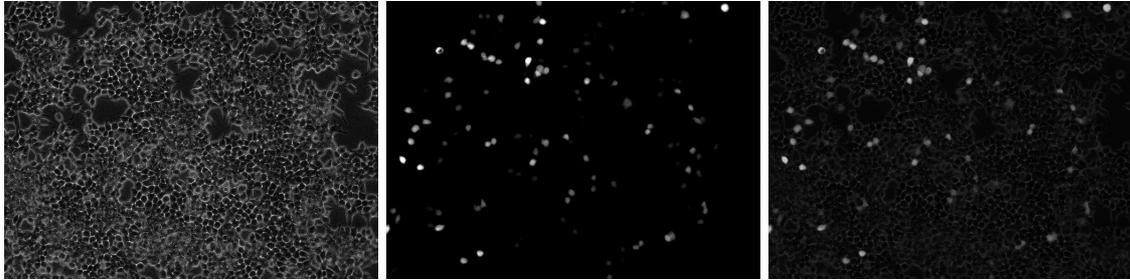
(b) Fluoreszenzmikroskopie GFP

(c) *Overlay* der Phasenkontrastdarstellung und der Fluoreszenzmikroskopie obiger mit *CMV-BDNF-IRES-GFP* transfizierter *Packaging*-Zellen

Abbildung 19: Diese Abbildung zeigt eine 293FT-HEK-Zellen *Packaging*-Kultur einen Tag nach Transfektion mit *CMV-BDNF-IRES-eGFP*. Die *Overlay*-Darstellung verdeutlicht den Transfektionserfolg, welcher anhand der fluoreszierenden Zellen nachweisbar ist.

(vgl. Abbildung 7). Abbildung 20 zeigt das Resultat einer Transduktion von *Packaging*-Zellen mit einer Verdünnung von 1:1000 (Bezogen auf die finale Konzentration im Zellkulturmedium). Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transduktion mikroskopisch untersucht.

In Abbildung 20 ist der Erfolg der Transduktion anhand der GFP-Expression jener Zellen zu erkennen. Diese sind nun durch die Integration der Virus-DNA in ihr Genom in der Lage, GFP zu produzieren. Hierbei handelt es sich abermals um eine Gegenüberstellung eines Phasenkontrastbildes und einer Fluoreszenzaufnahme sowie ein *Overlay* beider Darstellungen (siehe Abbildung 20c).



(a) Phasenkontrastaufnahme

(b) Fluoreszenzmikroskopie GFP

(c) *Overlay* der Phasenkontrastaufnahme und der Fluoreszenzmikroskopie obiger mit PKG-*BDNF*-IRES-GFP transduzierten *Packaging*-Zellen

Abbildung 20: Diese Abbildung zeigt eine 293FT-HEK-Zellen *Packaging*-Kultur einen Tag nach Transduktion mit PKG-*BDNF*-IRES-eGFP. Es wurden 20 μ l der ersten Verdünnung ($2 \times 10^{-1} \mu$ l) aufgebracht. Die *Overlay*-Darstellung verdeutlicht den Transfektionserfolg, welcher anhand der fluoreszierenden Zellen nachweisbar ist.

Diskussion

Aufbau der Plasmide

Promotoren

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden sechs Plasmide erstellt und untersucht, die für die zu untersuchenden neurotrophen Faktoren kodieren.

Es kamen zwei verschiedene Promotoren zum Einsatz, die beide zu den stärksten konstitutiven Promotoren gehören: ein *humaner Cytomegalie-Virus „immediate early region enhancer-promotor“* (CMV) und ein *humaner X-chromosomaler Phosphoglyceratkinase 1-Promotor* (PGK). Diese wurden ausgewählt, um eine möglichst hohe und robuste Expression der neurotrophen Faktoren zu gewährleisten [118]. Die Wahl liegt darin begründet, dass unterschiedliche Promotoren in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich stark aktiv sind, obwohl sie Teil derselben Gruppe sind [72, 92, 101, 102]. Da deren Aktivität nicht absolut vorhersehbar ist, ermöglicht die getroffene Wahl eine größere Flexibilität bei der Durchführung der Tierversuche und einen Vergleich beider Systeme. Es besteht im weiteren Verlauf die Möglichkeit, zu untersuchen, ob eventuell eine Dosis-Wirkung-Beziehung für das neuronale Überleben oder die Symptomatik vorliegt. Darüber hinaus ermöglicht dieser Ansatz, sich nach gründlicher Prüfung gegebenenfalls für den geeigneteren Promotor zu entscheiden.

IRES-eGFP

Alle Konstrukte enthalten eine *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) in Verbindung mit dem Reportergen *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP). IRES ermöglicht den Beginn der Translation in der Mitte der mRNA. Üblicherweise muss zuerst am 5'-Ende ein Initiationskomplex gebildet werden, bevor die Translation beginnen kann [58]. Somit bewirkt das *IRES-Element* die Co-Expression von eGFP neben dem zu untersuchenden Faktor (BDNF/GDNF). Das Reportergen eGFP codiert für ein Fluoreszenzprotein mit einem Exzitationsmaximum bei 395 nm und einem etwas schwächeren Maximum bei 470 nm. Üblicherweise kommt das Maximum bei 470 nm zum Einsatz, da andernfalls ein rasches Verblässen der Fluoreszenz beobachtet wird. Das Emissionsmaximum liegt bei 509 nm [133, 80, 29, 121, 33]. Mit Hilfe von eGFP lässt sich der Transfektions- sowie der Transduktionserfolg mittels Fluoreszenzmikroskopie dokumentieren. Zusätzlich besteht die Möglichkeit durch die Analyse mit *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) fluoreszierende von nicht-floureszierenden Zellen zu trennen. Dies wiederum kann verwendet werden, um in den nächsten Schritten möglichst viele transduzierte Knochenmarkstammzellen zu sammeln und anschließend in die Versuchstiere zu infundieren.

WPRE

Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element (WPRE) ist ein posttranskriptionelles Regulationselement, welches die Expression der von ihm kontrollierten Sequenzen steigert. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass seine Wirkung in Abhängigkeit der Zusammensetzung der lentiviralen Konstrukte (Promotor, weitere Cis-Elemente usw.) unterschiedlich ausfällt. Beispielsweise konnten im Zusammenspiel mit dem humanen *Ubiquitin C*-Promotor deutlich höhere Expressionslevel erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es verwendet, da durch die Verwendung von WPRE in verschiedenen Konstrukten eine signifikant erhöhte Transgenexpression beschrieben

wurde [36, 135, 102, 103, 105].

BDNF

Bei BDNF handelt es sich um einen neurotrophen Faktor, der im Jahre 1982 von Barde *et al.* charakterisiert wurde [12]. BDNF ist ein Mitglied der Neurotrophin-Familie, welche aus vier strukturell verwandten Faktoren besteht und die erste war, die entdeckt wurde. Zur Neurotrophin-Familie gehören weiterhin: *Nerve Growth Factor* (NGF; Levi-Montalcini und Hamburger [68]), *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF; Barde *et al.* [12]), *Neurotrophin-3* und *Neurotrophin-4/5*.

BDNF ist ein Wachstumsfaktor, der sich während der neuronalen Entwicklung durch vielfältige Effekte auszeichnet [69]. Seine Wirkung ist jedoch nicht auf das sich entwickelnde Gehirn beschränkt, sondern findet auch im adulten Gehirn statt [17, 134]. Neben dem Gehirn wird BDNF auch von Muskelzellen gebildet und von dort retrograd zum Rückenmark transportiert [82].

BDNF ist in vielfältiger Weise an Prozessen gesunder wie auch erkrankter Gehirne beteiligt. Durch Verwendung von BDNF können pathologische Prozesse möglicherweise positiv beeinflusst werden. Bei allen in der Einleitung erläuterten Erkrankungen besteht ein Zusammenhang mit BDNF. So ist beispielsweise die BDNF-Menge im Gehirn von AD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich reduziert [70]. Aufgrund der fundamentalen Rolle, die BDNF für die synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung spielt, stellt er ein vielversprechendes therapeutisches Ziel dar [44]. Im Rahmen der PD-Forschung wurde festgestellt, dass polymorphe Variationen im BDNF-Gen mit sowohl familiären als auch sporadischen Erkrankungen assoziiert sind und bei familiären Fällen zu einem früheren Ausbruch der Symptome führen [98, 84, 61]. Weiterhin weisen die Anwesenheit von BDNF-Rezeptoren auf dopaminergen Neuronen der Substantia nigra und der neurotrophe Effekt von BDNF auf einen pathophysiologischen Zusammenhang hin [45, 85]. Für die Amyotrophe Lateralsklerose scheint BDNF ebenfalls ein

geeigneter Kandidat zu sein, da er gegen Glutamat-induzierte Exzitotoxizität – ein möglicher Pathomechanismus bei der Entstehung der ALS – Wirkung zeigt [77].

GDNF

GDNF als möglicherweise therapeutisch einsetzbare Substanz wurde zuerst im Zusammenhang mit dem Morbus Parkinson entdeckt. Es war aufgefallen, dass GDNF bei dopaminergen Neuronen zu längeren Neuriten, größeren Zellkörpern, einer höheren Zellzahl und einer vermehrten Dopaminaufnahme *in vitro* führte [73]. In mehreren Untersuchungen konnte die trophische Potenz nun auch *in vivo* bestätigt werden [38, 46, 39, 125]. Bei der ALS fand sich im Liquor von Patienten ein erhöhter GDNF-Spiegel [53]. GDNF wird ebenso wie BDNF retrograd von produzierenden Muskelzellen zum Rückenmark transportiert [132]. Durch die Injektion von GDNF-produzierenden Myoblasten in die Muskulatur konnte ein verlängertes Überleben von Motoneuronen und ein verzögerter Krankheitsausbruch erreicht werden. Durch die Kombination mit einer zentralen Freisetzung verspricht das hier vorliegende Konzept eine stärkere positive Wirkung [42, 83].

Innerhalb der „GDNF-Familie der Liganden“ stellt GDNF einen von vier strukturell verwandten, trophischen Faktoren dar. *Neurturin*, *Artemin* und *Persephin* sind die restlichen drei Mitglieder dieser Familie.

GDNF und BDNF gehören unterschiedlichen Substanzgruppen an und wirken über unterschiedliche Rezeptoren (BDNF – Tyrosinkinase B Rezeptor; GDNF – GDNF-family Rezeptor α 1 (GFR α 1) in Verbindung mit der Rezeptor Tyrosinkinase (RET)). Für Neurone des ventralen Mesencephalons sind verschiedene Signalwege für BDNF und GDNF beschrieben [2, 41]. Dies lässt erkennen, dass es sich bei GDNF um eine grundlegend andere Substanz handelt, als bei BDNF. Wegen unterschiedlichen zugrundeliegenden Wirkmechanismen stellt die Verwendung beider Substanzen im Rahmen dieser Arbeit keine Redundanz dar [41].

Gentransfersysteme

Der DNA-Transfer in Zielzellen kann durch verschiedene non-virale und virale Systeme bewerkstelligt werden [94]:

Expressionskassette: Das therapeutische Transgen wird als dsDNA direkt in die Zelle übertragen. Die Effizienz ist jedoch sehr gering und durch fehlenden Kerntransfer der DNA ist eine langanhaltende Expression unwahrscheinlich.

Liposom + Plasmid: Die Ziel-DNA wird in Liposomen verpackt, wodurch der Übertritt durch die Zellmembran ins Zytoplasma erleichtert wird. Dies steigert die Effizienz, bewirkt aber weiterhin keinen Kerntransfer.

Adenoviraler Vektor: Hierbei handelt es sich um das erste auf Viren (Adenoviren) basierende Verfahren. Adenovirale DNA wurde dahingehend verändert, dass diese Vektoren DNA mit großer Effizienz zielgerichtet übertragen. Der Gentransfer war in den allermeisten Fällen nur transient. Zusätzlich traten beträchtliche Nebenwirkungen auf, da Adenoviren hoch immunogen sind und somit zu einer Aktivierung der angeborenen sowie der erworbenen Immunabwehr führen.

Adeno-assoziiertes Virusvektor(AAV): Der Vorteil dieser Vektoren liegt in der relativ langen Persistenz der zugeführten DNA in ruhenden oder sich langsam teilenden Zellen, wie etwa Kardiomyozyten, Neuronen usw. Der Nachteil besteht jedoch in einer beschränkten Transferkapazität von etwa 4500bp.

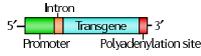
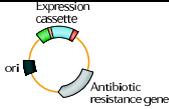
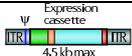
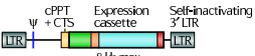
Retroviraler Vektor: Das erste Virus dieser Gruppe war das *Moloney Murines Leukämie-Retrovirus*. Dieses ist durch diverse Weiterentwicklungen nun in der Lage, unterschiedliche Zelltypen zu transduzieren. Die Langzeitexpression der Ziel-DNA sowie der nicht-humane Ursprung stellen seine Vorzüge dar. Die Langzeitexpression basiert auf der Integration in die Wirts-DNA. Es besteht hierbei das Risiko der

Insertionsmutagenese. Ein weiterer Nachteil ist die Unfähigkeit des Retrovirus, ruhende Zellen zu transduzieren. Da in diesem Projekt Knochenmarkstammzellen transduziert werden sollen, bei denen es sich um ruhende Zellen mit geringer Zellteilungsaktivität handelt, konnte nicht auf dieses Verfahren zurückgegriffen werden.

Lentiviraler Vektor: Lentiviren gehören zwar der Familie der Retroviren an, unterscheiden sich jedoch von anderen Retroviren durch die Fähigkeit, nicht-teilende Zellen zu transduzieren. Durch Integration ins Wirtsgenom können sie eine Langzeitexpression gewährleisten, wobei auch hier die bereits erwähnte Gefahr der integrativen Mutagenese besteht. Da diese Vektorsysteme auf HI-Viren beruhen, besteht prinzipiell die Gefahr der Humanpathogenität, die durch mehrere Weiterentwicklungen zu reduzieren versucht worden ist. Es wurden mittlerweile drei Generationen der lentiviralen Vektoren entwickelt, in denen schrittweise immer mehr für die Transduktion überflüssige DNA-Abschnitte identifiziert und entfernt worden sind. Auf diese Weise konnte die Humanpathogenität reduziert und somit die Sicherheit erhöht werden. Es handelt sich nun um selbst-inaktivierende Lentiviren. Die Trennung der für die Virusproduktion benötigten Gene auf einzelne Plasmide verringert zusätzlich das Risiko unkontrollierter Replikation und erhöht auf diese Weise die Sicherheit dieses Systems. Bei Verwendung der dritten Generation kann die Virusproduktion bereits in S2-Laboratorien stattfinden [105, 124, 103].

Zusammenfassend sind die Argumente für das lentivirale Vektorsystem [94, 102]:

- die Langzeitexpression der transduzierten DNA
- die Fähigkeit ruhende Zellen zu transduzieren
- bei Verwendung der dritten Generation das geringste humane Risiko.

Typ und Kapazität	DNA-Aufbau	Vorteile	Nachteile
Expressionskassette <i>sehr groß</i>		sehr hohe Kapazität	geringe Effizienz, transiente Expression bei fehlendem Kernttransfer
Liposom+Plasmid <i>sehr groß</i>		sehr hohe Kapazität	Effizienz etwas höher, jedoch weiterhin gering kein Kernttransfer
Adenoviraler Vektor, 7-8kb		hohe Kapazität	transiente Expression bei fehlendem Kernttransfer, hohe Immunogenität
Adeno-assoziiierter Virusvektor <i>4,5kb</i>		Transduktion ruhender Zellen geringe Immunogenität	geringe Kapazität
Retroviraler Vektor, ca. 8kb		Langzeitexpression durch Kernintegration, nicht humaner Ursprung hohe Kapazität	fehlende Transduktion ruhender Zellen, Insertionsmutagenese möglich
Lentiviraler Vektor, ca. 8kb		Langzeitexpression durch Kernintegration, Transduktion ruhender Zellen hohe Kapazität	Humanpathogen, Insertionsmutagenese möglich

Vor- und Nachteile der Strategie

Bislang gibt es keine kausale Therapieoption für die ALS. Lediglich Riluzol ist für die Therapie zugelassen und hat einen nur geringen, progressionsverzögernden Effekt. Stammzell- und Gentherapien bieten trotz der weiterhin großen Herausforderungen zurecht Grund für bedingten Optimismus. Die vermutlich ideale Lösung im Bereich der Stammzelltherapie stellt die Zellersatztherapie der zugrunde gegangenen Motoneuronen dar. Anhand embryonaler Stammzellen wurde gezeigt, dass diese sich hin zu Motoneuronen differenzieren, in neuronales Gewebe integrieren und synaptische Kontakte eingehen können [129]. Dieses Vorgehen scheint für statische Erkrankungen bereits heutzutage realistisch. Für die ALS liegen hierfür keine Berichte vor, was in der progressiven Natur der Erkrankung begründet liegt. Um nach erfolgreicher Transplantation funktionstüchtige Synapsen mit Muskelzellen auszubilden, bedarf es mehr Zeit, als den Patienten bei einem durchschnittlichen Überleben von 2-5 Jahren nach Diagnosestellung zur Verfügung steht. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass auch andere neuronale Interaktionen therapeutischen Nutzen entfalten [76]. In einer tierexperimentellen Studie konnten Lepore *et al.* zeigen, dass die Transplantation nicht-neuronaler Zelltypen, wie Astrozyten, einen positiven Einfluss auf die Krankheitsprogression und das Überleben der Versuchstiere ausüben kann [67].

Die Zufuhr diverser neurotropher Faktoren durch intraparenchymale Implantation neuronaler Vorläuferzellen wurde experimentell beispielsweise für BDNF, GDNF, IGF-1 und VEGF untersucht. Hierdurch wurden Motoneuronen geschützt, jedoch ohne positive Wirkung auf die Überlebensdauer der Versuchstiere. Fortbestehende axonale Degeneration wurde hierfür verantwortlich gemacht [97]. Zudem können mit diesem Verfahren lediglich anatomisch eng umschriebene Bereiche erreicht werden, was auch den größten Nachteil dieses Konzepts darstellt. Durch intrathekale Injektion von humanen neuronalen Stammzellen, die VEGF überexprimierten, konnte im Tierversuch ein verzögerter Krankheitsbeginn und längeres Überleben erzielt werden [57].

Neben der Zufuhr von Wachstumsfaktoren mithilfe von Stammzellen liegen auch Daten vor, dass unter Verwendung des adenoassoziierten Virus 9 (AAV9) weitläufigere Areale transduziert werden können. Als Besonderheit dieses Vektors ist dessen Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke hervorzuheben [43]. Nach intrathekaler Applikation tritt eine robuste Transduktion von Motoneuronen bei Schweinen auf [40]. Ein Nachteil einer intravaskulären Zufuhr sind Nebenwirkungen außerhalb des Zielgewebes. Bei intrathekaler Zufuhr besteht die Gefahr einer Meningitis oder eines Hydrocephalus malresorptivus. Durch intramuskuläre Applikation von GDNF-kodierenden AAV konnte im Mausmodell der Krankheitsverlauf günstig beeinflusst werden. Ein Transfer in den klinischen Alltag scheint bislang aufgrund der räumlichen Ausdehnung der zu behandelnden Areale beim Menschen nicht möglich.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden nun die Vorarbeiten zu einem neuartigen Therapiekonzept für die Zufuhr der Wachstumsfaktoren GDNF und BDNF dargelegt, deren Wirksamkeit in anderen Untersuchungen bereits eingeschränkt gezeigt werden konnte (siehe S.69 und S.70). Aufgrund der enormen Schwierigkeiten, welche die zielgerechte Applikation bereitet, konnten Studien an Menschen bisher noch keine überzeugenden Resultate erbringen, obwohl jüngst in einer Phase 1 Studie keine Langzeitnebenwirkungen des chirurgischen Eingriffs oder der verabreichten neuronalen Vorläuferzellen nachgewiesen werden konnten [49, 106]. Die Größe des zentralen Nervensystems sowie die Verteilung der betroffenen Areale erschweren die direkte, operative Applikation der Wirksubstanzen an den gewünschten Orten. Eine systemische Zufuhr scheidet bislang entweder an der zu geringen Halbwertszeit der Substanzen, der Unüberwindbarkeit der Blut-Hirn-Schranke oder den zu großen Diffusionsstrecken, falls die Substanzen nicht ins Gefäßsystem, sondern in den Liquorraum appliziert wurden. Gemäß den Ergebnissen von Appel *et al.* [8] wandern hämatopoetische Stammzellen, welche ALS-Patienten infundiert werden, in die befallenen Regionen des zentralen Nervensystems, nämlich die Vorderhörner

des Rückenmarks und den Motorkortex. Sie weisen dort, verglichen mit anderen Arealen deutlich höhere Konzentrationen auf. Aus diesem Grund scheint die Verwendung von hämatopoetischen Stammzellen als „Trojanische Pferde“ ein vielversprechender Therapieansatz zu sein, der keine komplizierten chirurgischen Interventionen erfordert und somit für den Patienten schonend ausfällt. Die Gewinnung hämatopoetischer Stammzellen ist, verglichen mit anderen Stammzelltypen, unkompliziert. Eine autologe Therapie, die wiederum keine Immunsuppression erfordert, ist ebenfalls denkbar. Andererseits sind bei der fALS in 20% der Fälle genetische Veränderungen bekannt, sodass sich zumindest bei diesen Patienten die Frage stellt, ob ein Verzicht auf eine autologe Transplantation nicht sinnvoller wäre. Bei autologer Transplantation wären weiterhin die genetischen Veränderungen, wie SOD1-Mutationen, in den nun BDNF oder GDNF produzierenden Zellen vorhanden. Bei den übrigen ALS-Patienten ist ebenfalls Vorsicht geboten, auch wenn bei diesen noch keine genetischen Ursachen eindeutig bekannt sind. Es besteht die Gefahr, dass autologe Transplantationen einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf ausüben oder den therapeutischen Effekt der neurotrophen Faktoren schmälern. Der positive Effekt der zugeführten Wildtyp-Zellen beruht wahrscheinlich nicht nur auf der Wirkung sezernierter Wachstumsfaktoren, sondern auch auf dem Fehlen schädigender Substanzen [86].

Der Gebrauch der lentiviralen Vektoren birgt seinerseits das Risiko, Insertionsmutationen zu verursachen, die im weiteren Verlauf Tumore oder Leukämien verursachen könnten. Im Zusammenhang mit der ALS ist diese Gefahr jedoch aufgrund der geringen Lebenserwartung nach Diagnosestellung aktuell als nachrangig einzustufen. An Bedeutung würde diese Thematik gewinnen, wenn die Lebenserwartung durch die Therapie stark steigen würde.

Die Auswirkungen der Therapie mit Wachstumsfaktoren müssen in Tierversuchen differenziert evaluiert werden [16]. Im klinischen Alltag wird es nicht möglich sein, Patienten vor Ausbruch der Erkrankung zu therapieren. Aus diesem Grund muss auch

im Tierexperiment zwischen Interventionen vor Erkrankungsbeginn oder jenen nach Krankheitsausbruch unterschieden werden. Beim Auftreten der ersten Symptome ist bereits ein beträchtlicher Anteil der Neuronen zugrunde gegangen, die durch die hier diskutierte Therapie nicht ersetzt werden können. Inwiefern die neurotrophen Faktoren eine regenerative Wirkung entfalten, bleibt noch zu untersuchen. Denkbar ist jedoch eine Verzögerung der Krankheitsprogression und im Optimalfall ein Unterbinden selbiger. Im Verlauf könnte eine Kombination mit der intramuskulären Zufuhr von GDNF-kodierenden AAV gemäss Wang *et al.* sinnvoll sein, obwohl noch geklärt werden muss, welche Muskelgruppen bei individuellen Patienten therapiert werden sollen [127].

Zusammenfassend stellt dieses Konzept eine vielversprechende Therapieoption dar, da es für die Patienten mit geringen Eingriffen verbunden ist. Zudem handelt es sich bei der ALS um eine bislang therapeutisch nicht beherrschbare Erkrankung, sodass eine Steigerung der Lebenserwartung nach Diagnosestellung bereits als Erfolg zu verbuchen ist.

Mehrere Untersuchungen haben sich bislang der direkten Implantation von Stammzellen ins ZNS gewidmet. Beispielsweise wurden in zwei Studien humane Nabelschnurblutzellen intraventrikulär und intraspinal verabreicht [18, 64]. Aufgrund der Zellverteilung wird geschlossen, dass der therapeutische Effekt auf sezernierten neurotrophen oder neuroprotektiven Faktoren beruht. Mesenchymale Stammzellen wurden bereits in mehreren Tierversuchen aber auch am Menschen untersucht [78, 93]. Die Aussagekraft der humanen Studie ist jedoch aufgrund fehlender pathologischer Verlaufsuntersuchungen eingeschränkt [76]. Eine Vergleichsstudie zwischen mesenchymalen Stammzellen und Knochenmarkstammzellen zeigte eine leichte Überlegenheit der Knochenmarkstammzellen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass sich diese Stammzellen während des Aufenthalts im ZNS nicht weiter differenzieren [100].

Eine herausragende Stellung unter den Stammzellen nehmen die induzierten pluripotenten Stammzellen ein. Hierbei handelt

es sich um ursprünglich ausdifferenzierte somatische Zellen, welche durch Transduktion mit vier Transkriptionsfaktoren in Stammzellen umprogrammiert wurden. Dadurch wird die Wissenschaft von ethisch umstrittenen Stammzellenquellen unabhängig. Das Einsatzgebiet ist wiederum entweder die Therapie, obwohl hierfür noch genauere Charakterisierungen dieser Zellgattung notwendig sind. Andererseits können etwa auch somatische Zellen von ALS-Patienten durch dieses Verfahren in unterschiedlichste Zelltypen differenziert werden. Darauf basierend können zugrunde liegende Pathomechanismen untersucht oder neuartige Therapieverfahren getestet werden [76, 93].

Ausblick

Der nächste Schritt wird in der Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark bestehen. Diese müssen entsprechend aufgereinigt und im Anschluss durch die lentiviralen Vektoren mit GDNF, BDNF und den jeweiligen Promotoren transduziert werden. Nach kurzzeitiger Inkubation können mittels einer FACS-Sortierung jene Zellen, bei denen die erfolgreiche Transduktion an der GFP-Expression nachweisbar ist, isoliert werden [31]. Im Anschluss werden ausreichende Zellzahlen in präsymptomatische, junge Tiere sowie symptomatische Tiere intravasal transplantiert. In Untersuchungen der motorischen Fähigkeiten muss der klinische Verlauf überprüft werden. Das Überleben stellt den primären Endpunkt dar. Unter Umständen ist die Prüfung dieses Ansatzes mit verschiedenen Tiermodellen der ALS sinnvoll, um eventuell unterschiedliche Wirkungen charakterisieren zu können (SOD1, TDP-43).

In weiteren histologischen und histo-chemischen Untersuchungen kann *post mortem* die BDNF- und GDNF-Produktion in den entsprechenden Rückenmarksarealen untersucht und die Invasion der GFP-markierten Zellen dargestellt werden.

In Abhängigkeit von den tierexperimentellen Ergebnissen kann im Anschluss die Anwendbarkeit in klinischen Studien diskutiert werden.

Zusammenfassung

Die neurodegenerativen Erkrankungen stellen eine klinisch wie pathophysiologisch heterogene Gruppe dar, welche sich durch einen unweigerlich progredienten und letalen Verlauf auszeichnet. Bei keiner konnte bisher therapeutisch ein Durchbruch erzielt werden, sodass bislang lediglich eine begrenzte symptomatische Behandlung möglich ist. Die innovativen Therapiepläne mittels neurotropher Faktoren und Stammzellen sind mit hohen Erwartungshaltungen konfrontiert. Während der Zellersatz der zugrunde gegangenen Neuronen wahrscheinlich erst durch die Ausreifung der Stammzellentherapie relevant wird – und dieser Prozess wahrscheinlich noch mehrere Jahre bis Jahrzehnte in Anspruch nehmen wird [75] – ist der Einsatz von neurotrophen Faktoren in näherer Zukunft erfolgversprechender. Die grundlegende Schwierigkeit hierbei besteht jedoch in der Applikation der Therapeutika. Der periphere Abbau der Substanzen, die geringe Überwindbarkeit der Blut-Hirn-Schranke, die eingeschränkte Diffusion durch das Nervengewebe sowie die ausgedehnten anatomischen Zielareale stellen die Forschung vor bislang noch zu bewältigende Herausforderungen. Im Rahmen dieser Promotion wurde eine Strategie präsentiert, die unter Verwendung von hämatopoetischen Stammzellen als „Trojanische Pferde“, diese Hindernisse umschiffen möchte. Es wurden molekularbiologische und virologische Vorarbeiten durchgeführt, die durch Tierexperimente noch weiter untersucht werden müssen. Mit Hilfe von lentiviralen Vektorsystemen sollen hämatopoetische Stammzellen derart gentechnisch manipuliert werden, dass sie nach Einwanderung in die betroffenen Areale als zelluläre Pumpen lokal neurotrophe Wachstumsfaktoren produzieren. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit die therapeutischen Substanzen schonend und zielgerichtet über längere Zeit zu verabreichen.

Konkret wurden hierfür Plasmide entwickelt, die PGK- oder CMV-Promotor-gesteuert BDNF oder GDNF enthalten. Als weiteren Bestandteil beinhalten sie das Reporter-gen GFP, wodurch

eine direkte fluoreszenzmikroskopische Darstellung transduzierter Zellen möglich wird. Diese Plasmide wurden in ein lentivirales Vektorsystem integriert, um auf diesem Wege hämatopoetische Stammzellen zu transduzieren. Es konnten die Korrektheit der Plasmide sowie die Funktionstüchtigkeit der produzierten Viren nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung des beschriebenen therapeutischen Konzepts müssen im Rahmen weiterer Arbeiten hämatopoetische Stammzellen gewonnen, aufgereinigt, transduziert und in die Versuchstiere transplantiert werden. Der klinische Verlauf und das Überleben der Tiere sind die Parameter anhand derer über den Erfolg der Strategie zu entscheiden ist.

Eidesstattliche Versicherung

Robert Stefan Stark
Ödmühlweg 35
4040 Linz/Donau
Österreich

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende
Dissertation mit dem Thema

GENETISCH MODIFIZIERTE KNOCHENMARKSTAMMZELLEN ALS
THERAPIEANSATZ BEI AMYOTROPHER LATERALSKLEROSE –
LENTIVIRALE TRANSDUKTION VON GDNF UND BDNF

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner wei-
teren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem
Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche
kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung
der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation
nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle
zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

St.Gallen, 15. Jänner 2014

Robert Stefan Stark

Danksagung

Mein Dank gilt Frau PD Dr. J. Anneser für die umfassende Betreuung im Rahmen dieser spannenden Doktorarbeit und das stets rasche Korrekturlesen. Diese Arbeit verdanke ich Prof. Dr. A. Flügel, der mich auf dieses Thema aufmerksam machte und zuvor meine wissenschaftliche Neugierde während eines Laborpraktikums weckte.

Ich möchte mich außerdem ganz herzlich bei Dr. C. Giudici, Dr. F. Odoardi, Dr. D. Lodygin, Dr. V. Ulaganathan und Dr. I. Bartholomäus für die allzeitige Hilfsbereitschaft, freundliche Unterstützung und liebenswürdige Zusammenarbeit bedanken. Ohne sie wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.

Mit Ausnahme von pMSCVneo-BDNF, welches dankenswerterweise von Prof. Dr. A. Flügel bereitgestellt wurde, wurden sämtliche Ausgangskonstrukte freundlicherweise von Dr. C. Giudici zur Verfügung gestellt.

Ein ganz besonderes Dankeschön gebührt meiner Familie, meinen Eltern und Geschwistern, die mich stets mit aller Kraft unterstützten, seit ich vor fast acht Jahren auszog, um in München Medizin zu studieren. Dieser Lebensabschnitt findet mit dieser Dissertation nun sein Ende. Vielen Dank für die aufopfernde Unterstützung, die vielen guten Ratschläge und die hilfreichen Hinweise im Rahmen dieser Arbeit!

Literaturverzeichnis

- [1] Gyula Acsadi, Roumen A Anguelov, Huibin Yang, Gabor Toth, Ronald Thomas, Agnes Jani, Yuying Wang, Emilia Ianakova, Sulaiman Mohammad, Richard A Lewis, and Michael E Shy. Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum Gene Ther*, 13(9):1047–59, Jun 2002.
- [2] Matti S Airaksinen and Mart Saarma. The gdnf family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci*, 3(5):383–94, May 2002.
- [3] A. Alzheimer. Über einen eigenartigen schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde. *Neurologisches Centralblatt*, 25, 1906.
- [4] P K Andrus, T J Fleck, M E Gurney, and E D Hall. Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 71(5):2041–8, Nov 1998.
- [5] J M Anneser, G D Borasio, A Berthele, W Zieglgänsberger, and T R Tölle. Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors in rat spinal cord somatic and autonomic motoneurons: possible implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, 6(2):140–7, Apr 1999.

- [6] Johanna M H Anneser, Christine Chahli, Paul G Ince, Gian Domenico Borasio, and Pamela J Shaw. Glial proliferation and metabotropic glutamate receptor expression in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 63(8):831–40, Aug 2004.
- [7] Johanna M H Anneser, Paul G Ince, Pamela J Shaw, and Gian Domenico Borasio. Differential expression of mGluR5 in human lumbosacral motoneurons. *Neuroreport*, 15(2):271–3, Feb 2004.
- [8] S H Appel, J I Engelhardt, J S Henkel, L Siklos, D R Beers, A A Yen, E P Simpson, Y Luo, G Carrum, H E Heslop, M K Brenner, and U Popat. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 71(17):1326–34, Oct 2008.
- [9] Mimoun Azzouz, G Scott Ralph, Erik Storkebaum, Lucy E Walmsley, Kyriacos A Mitrophanous, Susan M Kingsman, Peter Carmeliet, and Nicholas D Mazarakis. VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model. *Nature*, 429(6990):413–7, May 2004.
- [10] Robert H Baloh. TDP-43: the relationship between protein aggregation and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *FEBS J*, 278(19):3539–49, Oct 2011.
- [11] Robert H Baloh. How do the RNA-binding proteins TDP-43 and FUS relate to amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal degeneration, and to each other? *Curr Opin Neurol*, 25(6):701–7, Dec 2012.
- [12] Y A Barde, D Edgar, and H Thoenen. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, 1(5):549–53, 1982.
- [13] M F Beal, R J Ferrante, S E Browne, R T Matthews, N W Kowall, and R H Brown, Jr. Increased 3-nitrotyrosine in

- both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 42(4):644–54, Oct 1997.
- [14] J S Beckman, M Carson, C D Smith, and W H Koppenol. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*, 364(6438):584, Aug 1993.
- [15] David R Beers, Jenny S Henkel, Qin Xiao, Weihua Zhao, Jinghong Wang, Albert A Yen, Laszlo Siklos, Scott R McKercher, and Stanley H Appel. Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(43):16021–6, Oct 2006.
- [16] Michael Benatar. Lost in translation: treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiol Dis*, 26(1):1–13, Apr 2007.
- [17] A Benraiss, E Chmielnicki, K Lerner, D Roh, and S A Goldman. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci*, 21(17):6718–31, Sep 2001.
- [18] P Bigini, P Veglianesi, G Andriolo, L Cova, G Grignaschi, I Caron, C Daleno, S Barbera, A Ottolina, C Calzarossa, L Lazzari, T Mennini, C Bendotti, and V Silani. Intracerebroventricular administration of human umbilical cord blood cells delays disease progression in two murine models of motor neuron degeneration. *Rejuvenation Res*, 14(6):623–39, Dec 2011.
- [19] Thomas D Bird. Alzheimer Disease Overview, 1993.
- [20] Séverine Boillée, Christine Vande Velde, and Don W Cleveland. ALS: a disease of motor neurons and their non-neuronal neighbors. *Neuron*, 52(1):39–59, Oct 2006.
- [21] Séverine Boillée, Koji Yamanaka, Christian S Lobsiger, Neal G Copeland, Nancy A Jenkins, George Kassiotis, George

Kollias, and Don W Cleveland. Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, 312(5778):1389–92, Jun 2006.

- [22] G D Borasio, W Robberecht, P N Leigh, J Emile, R J Guiloff, F Jerusalem, V Silani, P E Vos, J H Wokke, and T Dobbins. A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group. *Neurology*, 51(2):583–6, Aug 1998.
- [23] K J Breslau, R Frank, H Blöcker, and L A Marky. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83(11):3746–50, Jun 1986.
- [24] Susan E Browne, Lichuan Yang, Jon-Paul DiMauro, Sara W Fuller, Stephanie C Licata, and M Flint Beal. Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. *Neurobiol Dis*, 22(3):599–610, Jun 2006.
- [25] W Bruening, J Roy, B Giasson, D A Figlewicz, W E Mushynski, and H D Durham. Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 72(2):693–9, Feb 1999.
- [26] L I Bruijn, M F Beal, M W Becher, J B Schulz, P C Wong, D L Price, and D W Cleveland. Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(14):7606–11, Jul 1997.
- [27] L I Bruijn, M K Houseweart, S Kato, K L Anderson, S D Anderson, E Ohama, A G Reaume, R W Scott, and

- D W Cleveland. Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*, 281(5384):1851–4, Sep 1998.
- [28] Rudy J Castellani, Raj K Rolston, and Mark A Smith. Alzheimer disease. *Dis Mon*, 56(9):484–546, Sep 2010.
- [29] M Chalfie, Y Tu, G Euskirchen, W W Ward, and D C Prasher. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148):802–5, Feb 1994.
- [30] J.M. Charcot and A. Joffroy. Deux cas d’atrophie musculaire progressive avec lesion de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch. Physiol. Neurol. Path.*, 2:744–754, 1869.
- [31] Mi Ran Choi, Hyun Young Kim, Ji-Yoon Park, Tae Yong Lee, Cheong Soon Baik, Young Gyu Chai, Kyoung Hwa Jung, Kyoung Sun Park, Wonjae Roh, Kyung Suk Kim, and Seung Hyun Kim. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*, 472(2):94–8, Mar 2010.
- [32] D W Cleveland and J D Rothstein. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*, 2(11):806–19, Nov 2001.
- [33] A Coxon and T H Bestor. Proteins that glow in green and blue. *Chem Biol*, 2(3):119–21, Mar 1995.
- [34] Mamede de Carvalho and Michael Swash. Amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Curr Opin Neurol*, 24(5):497–503, Oct 2011.
- [35] James C Dodge, Amanda M Haidet, Wendy Yang, Marco A Passini, Mark Hester, Jennifer Clarke, Eric M Roskelley, Christopher M Treleaven, Liza Rizo, Heather Martin, Soo H Kim, Rita Kaspar, Tatyana V Taksir, Denise A Griffiths, Seng H Cheng, Lamya S Shihabuddin, and Brian K

- Kaspar. Delivery of AAV-IGF-1 to the CNS extends survival in ALS mice through modification of aberrant glial cell activity. *Mol Ther*, 16(6):1056–64, Jun 2008.
- [36] J E Donello, J E Loeb, and T J Hope. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol*, 72(6):5085–92, Jun 1998.
- [37] H D Durham, J Roy, L Dong, and D A Figlewicz. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56(5):523–30, May 1997.
- [38] Jamie L Eberling, Adrian P Kells, Philip Pivrotto, Janine Beyer, John Bringas, Howard J Federoff, John Forsayeth, and Krystof S Bankiewicz. Functional effects of AAV2-GDNF on the dopaminergic nigrostriatal pathway in parkinsonian rhesus monkeys. *Hum Gene Ther*, 20(5):511–8, May 2009.
- [39] Marina E Emborg, Allison D Ebert, Jeff Moirano, Sun Peng, Masatoshi Suzuki, Elizabeth Capowski, Valerie Joers, Ben Z Roitberg, Patrick Aebischer, and Clive N Svendsen. GDNF-secreting human neural progenitor cells increase tyrosine hydroxylase and VMAT2 expression in MPTP-treated cynomolgus monkeys. *Cell Transplant*, 17(4):383–95, 2008.
- [40] T Federici, J S Taub, G R Baum, S J Gray, J C Grieger, K A Matthews, C R Handy, M A Passini, R J Samulski, and N M Boulis. Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs. *Gene Ther*, 19(8):852–9, Aug 2012.
- [41] L Feng, C Y Wang, H Jiang, C Oho, M Dugich-Djordjevic, L Mei, and B Lu. Differential signaling of glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor in cultured ventral mesencephalic neurons. *Neuroscience*, 93(1):265–73, 1999.

- [42] Kevin D Foust, Terence R Flotte, Paul J Reier, and Ronald J Mandel. Recombinant adeno-associated virus-mediated global anterograde delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor to the spinal cord: comparison of rubrospinal and corticospinal tracts in the rat. *Hum Gene Ther*, 19(1):71–82, Jan 2008.
- [43] Kevin D Foust, Emily Nurre, Chrystal L Montgomery, Anna Hernandez, Curtis M Chan, and Brian K Kaspar. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes. *Nat Biotechnol*, 27(1):59–65, Jan 2009.
- [44] F Fumagalli, G Racagni, and M A Riva. The expanding role of BDNF: a therapeutic target for Alzheimer’s disease? *Pharmacogenomics J*, 6(1):8–15, 2006.
- [45] F Fumagalli, G Racagni, and M A Riva. Shedding light into the role of BDNF in the pharmacotherapy of Parkinson’s disease. *Pharmacogenomics J*, 6(2):95–104, 2006.
- [46] E Garbayo, C N Montero-Menei, E Ansorena, J L Lanciego, M S Aymerich, and M J Blanco-Prieto. Effective GDNF brain delivery using microspheres—a promising strategy for Parkinson’s disease. *J Control Release*, 135(2):119–26, Apr 2009.
- [47] S Gilman, M Koller, R S Black, L Jenkins, S G Griffith, N C Fox, L Eisner, L Kirby, M Boada Rovira, F Forette, J-M Orgogozo, and AN1792(QS-21)-201 Study Team. Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, 64(9):1553–62, May 2005.
- [48] Aaron D Gitler. TDP-43 and FUS/TLS yield a target-rich haul in ALS. *Nat Neurosci*, 15(11):1467–9, Nov 2012.
- [49] Jonathan D Glass, Nicholas M Boulis, Karl Johe, Seward B Rutkove, Thais Federici, Meraida Polak, Crystal Kelly, and Eva L Feldman. Lumbar intraspinal injection of neural

stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells*, 30(6):1144–51, Jun 2012.

- [50] G J Groeneveld, Jan H Veldink, Ingeborg van der Tweel, Sandra Kalmijn, Cornelis Beijer, Marianne de Visser, John H J Wokke, Hessel Franssen, and Leonard H van den Berg. A randomized sequential trial of creatine in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 53(4):437–45, Apr 2003.
- [51] ALS CNTF Treatment Study Group. A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. ALS CNTF Treatment Study Group. *Neurology*, 46(5):1244–9, May 1996.
- [52] BDNF Study Group. A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology*, 52(7):1427–33, Apr 1999.
- [53] E Grundström, D Lindholm, A Johansson, K Blennow, and H Askmark. GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, 11(8):1781–3, Jun 2000.
- [54] M E Gurney, H Pu, A Y Chiu, M C Dal Canto, C Y Polchow, D D Alexander, J Caliendo, A Hentati, Y W Kwon, and H X Deng. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*, 264(5166):1772–5, Jun 1994.
- [55] Werner Hacke. *Neurologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2006.
- [56] A. Hufschmidt and Lücking C.H. *Neurologie compact*. Thieme, 2009.
- [57] D H Hwang, H J Lee, I H Park, J I Seok, B G Kim, I S Joo, and S U Kim. Intrathecal transplantation of human

- neural stem cells overexpressing VEGF provide behavioral improvement, disease onset delay and survival extension in transgenic ALS mice. *Gene Ther*, 16(10):1234–44, Oct 2009.
- [58] S K Jang, T V Pestova, C U Hellen, G W Witherell, and E Wimmer. Cap-independent translation of picornavirus RNAs: structure and function of the internal ribosomal entry site. *Enzyme*, 44(1-4):292–309, 1990.
- [59] Jean-Pierre Julien. ALS: astrocytes move in as deadly neighbors. *Nat Neurosci*, 10(5):535–7, May 2007.
- [60] Edor Kabashi, Paul N Valdmanis, Patrick Dion, Dan Spiegelman, Brendan J McConkey, Christine Vande Velde, Jean-Pierre Bouchard, Lucette Lacomblez, Ksenia Pochigaeva, Francois Salachas, Pierre-Francois Pradat, William Camu, Vincent Meininger, Nicolas Dupre, and Guy A Rouleau. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet*, 40(5):572–4, May 2008.
- [61] S Karamohamed, J C Latourelle, B A Racette, J S Perlmutter, G F Wooten, M Lew, C Klein, H Shill, L I Golbe, M H Mark, M Guttman, G Nicholson, J B Wilk, M Saint-Hilaire, A L DeStefano, R Prakash, S Tobin, J Williamson, O Suchowersky, N Labell, B N J Growdon, C Singer, R Watts, S Goldwurm, G Pezzoli, K B Baker, M L Giroux, P P Pramstaller, D J Burn, P Chinnery, S Sherman, P Vieregge, I Litvan, J F Gusella, R H Myers, and A Parsian. BDNF genetic variants are associated with onset age of familial Parkinson disease: GenePD Study. *Neurology*, 65(11):1823–5, Dec 2005.
- [62] Brian K Kaspar, Jerònia Lladó, Nushin Sherkat, Jeffrey D Rothstein, and Fred H Gage. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science*, 301(5634):839–42, Aug 2003.

- [63] P Klivenyi, R J Ferrante, R T Matthews, M B Bogdanov, A M Klein, O A Andreassen, G Mueller, M Wermer, R Kaddurah-Daouk, and M F Beal. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med*, 5(3):347–50, Mar 1999.
- [64] Sarah Knippenberg, Nadine Thau, Kerstin Schwabe, Reinhard Dengler, Axel Schambach, Ralf Hass, and Susanne Petri. Intraspinal injection of human umbilical cord blood-derived cells is neuroprotective in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis*, 9(3):107–20, 2012.
- [65] T J Kwiatkowski, Jr, D A Bosco, A L Leclerc, E Tamrazian, C R Vanderburg, C Russ, A Davis, J Gilchrist, E J Kasarskis, T Munsat, P Valdmanis, G A Rouleau, B A Hosler, P Cortelli, P J de Jong, Y Yoshinaga, J L Haines, M A Pericak-Vance, J Yan, N Ticozzi, T Siddique, D McKenna-Yasek, P C Sapp, H R Horvitz, J E Landers, and R H Brown, Jr. Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 323(5918):1205–8, Feb 2009.
- [66] Angelo C Lepore, Christine Haenggeli, Mehdi Gasmi, Kathie M Bishop, Raymond T Bartus, Nicholas J Maragakis, and Jeffrey D Rothstein. Intraparenchymal spinal cord delivery of adeno-associated virus IGF-1 is protective in the SOD1G93A model of ALS. *Brain Res*, 1185:256–65, Dec 2007.
- [67] Angelo C Lepore, Britta Rauck, Christine Dejea, Andrea C Pardo, Mahendra S Rao, Jeffrey D Rothstein, and Nicholas J Maragakis. Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat Neurosci*, 11(11):1294–301, Nov 2008.
- [68] R Levi-Montalcini and V Hamburger. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and

- sympathetic nervous system of the chick embryo. *J Exp Zool*, 116(2):321–61, Mar 1951.
- [69] G R Lewin and Y A Barde. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*, 19:289–317, 1996.
- [70] Ge Li, Elaine R Peskind, Steven P Millard, Peter Chi, Izabela Sokal, Chang-En Yu, Lynn M Bekris, Murray A Raskind, Douglas R Galasko, and Thomas J Montine. Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. *PLoS One*, 4(5):e5424, 2009.
- [71] M Li, V O Ona, C Guégan, M Chen, V Jackson-Lewis, L J Andrews, A J Olszewski, P E Stieg, J P Lee, S Przedborski, and R M Friedlander. Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science*, 288(5464):335–9, Apr 2000.
- [72] Mingjie Li, Nada Husic, Ying Lin, Heather Christensen, Ibrahim Malik, Sally McIver, Christine M LaPash Daniels, David A Harris, Paul T Kotzbauer, Mark P Goldberg, and B Joy Snider. Optimal promoter usage for lentiviral vector-mediated transduction of cultured central nervous system cells. *J Neurosci Methods*, 189(1):56–64, May 2010.
- [73] L F Lin, D H Doherty, J D Lile, S Bektesh, and F Collins. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for mid-brain dopaminergic neurons. *Science*, 260(5111):1130–2, May 1993.
- [74] J Simon Lunn, Michael P Hefferan, Martin Marsala, and Eva L Feldman. Stem cells: comprehensive treatments for amyotrophic lateral sclerosis in conjunction with growth factor delivery. *Growth Factors*, 27(3):133–40, Jun 2009.
- [75] J Simon Lunn, Stacey A Sakowski, Junguk Hur, and Eva L Feldman. Stem cell technology for neurodegenerative diseases. *Ann Neurol*, 70(3):353–61, Sep 2011.

- [76] Nicholas J Maragakis. Stem cells and the ALS neurologist. *Amyotroph Lateral Scler*, 11(5):417–23, Oct 2010.
- [77] M P Mattson, M A Lovell, K Furukawa, and W R Markesbery. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem*, 65(4):1740–51, Oct 1995.
- [78] Letizia Mazzini, Katia Mareschi, Ivana Ferrero, Elena Vasallo, Giuseppe Oliveri, Nicola Nasuelli, Gaia Donata Oggioni, Lucia Testa, and Franca Fagioli. Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci*, 265(1-2):78–83, Feb 2008.
- [79] P L McGeer, E G McGeer, J Suzuki, C E Dolman, and T Nagai. Aging, Alzheimer’s disease, and the cholinergic system of the basal forebrain. *Neurology*, 34(6):741–5, Jun 1984.
- [80] T Misteli and D L Spector. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol*, 15(10):961–4, Oct 1997.
- [81] J D Mitchell and G D Borasio. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 369(9578):2031–41, Jun 2007.
- [82] A P Mizisin, P S DiStefano, X Liu, D N Garrett, and J R Tonra. Decreased accumulation of endogenous brain-derived neurotrophic factor against constricting sciatic nerve ligatures in streptozotocin-diabetic and galactose-fed rats. *Neurosci Lett*, 263(2-3):149–52, Mar 1999.
- [83] M H Mohajeri, D A Figlewicz, and M C Bohn. Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Gene Ther*, 10(11):1853–66, Jul 1999.

- [84] Yoshio Momose, Miho Murata, Kazuhiro Kobayashi, Masaji Tachikawa, Yuko Nakabayashi, Ichiro Kanazawa, and Tatsushi Toda. Association studies of multiple candidate genes for Parkinson's disease using single nucleotide polymorphisms. *Ann Neurol*, 51(1):133–6, Jan 2002.
- [85] M G Murer, Q Yan, and R Raisman-Vozari. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 63(1):71–124, Jan 2001.
- [86] Makiko Nagai, Diane B Re, Tetsuya Nagata, Alcmène Chazalonitis, Thomas M Jessell, Hynek Wichterle, and Serge Przedborski. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci*, 10(5):615–22, May 2007.
- [87] Isao Nagano, Hristelina Ilieva, Mito Shiote, Tetsuro Murakami, Masataka Yokoyama, Mikio Shoji, and Koji Abe. Therapeutic benefit of intrathecal injection of insulin-like growth factor-1 in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Neurol Sci*, 235(1-2):61–8, Aug 2005.
- [88] Isao Nagano, Mito Shiote, Tetsuro Murakami, Hiroshi Kamada, Yoshiyuki Hamakawa, Etsuro Matsubara, Masataka Yokoyama, Kiyoshi Moritaz, Mikio Shoji, and Koji Abe. Beneficial effects of intrathecal IGF-1 administration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res*, 27(7):768–72, Oct 2005.
- [89] C Neudert, D Oliver, M Wasner, and G D Borasio. The course of the terminal phase in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*, 248(7):612–6, Jul 2001.
- [90] William V Nikolic, Yun Bai, Demian Obregon, Huayan Hou, Takashi Mori, Jin Zeng, Jared Ehrhart, R Douglas Shytle, Brian Giunta, Dave Morgan, Terrence Town, and

Jun Tan. Transcutaneous beta-amyloid immunization reduces cerebral beta-amyloid deposits without T cell infiltration and microhemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(7):2507–12, Feb 2007.

- [91] Jun-Ichi Niwa, Shinsuke Ishigaki, Nozomi Hishikawa, Masahiko Yamamoto, Manabu Doyu, Shigeo Murata, Keiji Tanaka, Naoyuki Taniguchi, and Gen Sobue. Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem*, 277(39):36793–8, Sep 2002.
- [92] Karin Norrman, Yvonne Fischer, Blandine Bonnamy, Fredrik Wolfhagen Sand, Philippe Ravassard, and Henrik Semb. Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. *PLoS One*, 5(8):e12413, 2010.
- [93] Deirdre M O’Connor and Nicholas M Boulis. Cellular and molecular approaches to motor neuron therapy in amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy. *Neurosci Lett*, 527(2):78–84, Oct 2012.
- [94] Timothy P O’Connor and Ronald G Crystal. Genetic medicines: treatment strategies for hereditary disorders. *Nat Rev Genet*, 7(4):261–76, Apr 2006.
- [95] B Oosthuyse, L Moons, E Storkebaum, H Beck, D Nuyens, K Brusselmans, J Van Dorpe, P Hellings, M Gorselink, S Heymans, G Theilmeier, M Dewerchin, V Laudenbach, P Vermynen, H Raat, T Acker, V Vlemminckx, L Van Den Bosch, N Cashman, H Fujisawa, M R Drost, R Sciot, F Bruyninckx, D J Hicklin, C Ince, P Gressens, F Lupu, K H Plate, W Robberecht, J M Herbert, D Collen, and P Carmeliet. Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*, 28(2):131–8, Jun 2001.

- [96] J-M Orgogozo, S Gilman, J-F Dartigues, B Laurent, M Puel, L C Kirby, P Jouanny, B Dubois, L Eisner, S Flitman, B F Michel, M Boada, A Frank, and C Hock. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*, 61(1):46–54, Jul 2003.
- [97] Sungju Park, Hyoung-Tae Kim, Seokkwan Yun, Il-Sun Kim, Jiyeon Lee, Il-Shin Lee, and Kook In Park. Growth factor-expressing human neural progenitor cell grafts protect motor neurons but do not ameliorate motor performance and survival in als mice. *Exp Mol Med*, 41(7):487–500, Jul 2009.
- [98] Abbas Parsian, Rashmi Sinha, Brad Racette, Jing H Zhao, and Joel S Perlmutter. Association of a variation in the promoter region of the brain-derived neurotrophic factor gene with familial Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 10(4):213–9, Jun 2004.
- [99] P Pasinelli, M K Houseweart, R H Brown, Jr, and D W Cleveland. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25):13901–6, Dec 2000.
- [100] Diego Pastor, Mari Carmen Viso-León, Jonathan Jones, Jesus Jaramillo-Merchán, Juan José Toledo-Aral, Jose M Moraleda, and Salvador Martínez. Comparative effects between bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation in GDNF expression and motor function recovery in a motorneuron degenerative mouse model. *Stem Cell Rev*, 8(2):445–58, Jun 2012.
- [101] Jane Yuxia Qin, Li Zhang, Kayla L Clift, Imge Hulus, Andy Peng Xiang, Bing-Zhong Ren, and Bruce T Lahn. Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One*, 5(5):e10611, 2010.

- [102] A Ramezani, T S Hawley, and R G Hawley. Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. *Mol Ther*, 2(5):458–69, Nov 2000.
- [103] Ali Ramezani and Robert G Hawley. Overview of the HIV-1 Lentiviral Vector System. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 16:Unit 16.21, Nov 2002.
- [104] Suresh Babu Rangasamy, Katherine Soderstrom, Roy A E Bakay, and Jeffrey H Kordower. Neurotrophic factor therapy for Parkinson’s disease. *Prog Brain Res*, 184:237–64, 2010.
- [105] Gonçalo Real, Francisca Monteiro, Christa Burger, and Paula M Alves. Improvement of lentiviral transfer vectors using cis-acting regulatory elements for increased gene expression. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91(6):1581–91, Sep 2011.
- [106] Jonathan Riley, Thais Federici, Meraida Polak, Crystal Kelly, Jonathan Glass, Bethwel Raore, Jason Taub, Vita Kesner, Eva L Feldman, and Nicholas M Boulis. Intraspinal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I safety trial, technical note, and lumbar safety outcomes. *Neurosurgery*, 71(2):405–16; discussion 416, Aug 2012.
- [107] Allan H. Ropper and Robert H. Brown. *Adams & Victor’s Principles of Neurology*. McGraw-Hill, 2005.
- [108] D R Rosen. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 364(6435):362, Jul 1993.
- [109] D R Rosen, P Sapp, J O’Regan, D McKenna-Yasek, K S Schlumpf, J L Haines, J F Gusella, H R Horvitz, and R H Brown, Jr. Genetic linkage analysis of familial amyotrophic lateral sclerosis using human chromosome 21 microsatellite DNA markers. *Am J Med Genet*, 51(1):61–9, May 1994.

- [110] J D Rothstein, M Dykes-Hoberg, C A Pardo, L A Bristol, L Jin, R W Kuncl, Y Kanai, M A Hediger, Y Wang, J P Schielke, and D F Welty. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, 16(3):675–86, Mar 1996.
- [111] J D Rothstein, G Tsai, R W Kuncl, L Clawson, D R Cornblath, D B Drachman, A Pestronk, B L Stauch, and J T Coyle. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 28(1):18–25, Jul 1990.
- [112] Jeffrey D Rothstein. Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 65 Suppl 1:S3–9, Jan 2009.
- [113] Jeffrey D Rothstein, Sarjubhai Patel, Melissa R Regan, Christine Haenggeli, Yanhua H Huang, Dwight E Bergles, Lin Jin, Margaret Dykes Hoberg, Svetlana Vidensky, Dorothy S Chung, Shuy Vang Toan, Lucie I Bruijn, Zao-Zhong Su, Pankaj Gupta, and Paul B Fisher. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*, 433(7021):73–7, Jan 2005.
- [114] D Schenk, R Barbour, W Dunn, G Gordon, H Grajeda, T Guido, K Hu, J Huang, K Johnson-Wood, K Khan, D Kholodenko, M Lee, Z Liao, I Lieberburg, R Motter, L Mutter, F Soriano, G Shopp, N Vasquez, C Vandevent, S Walker, M Wogulis, T Yednock, D Games, and P Seubert. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400(6740):173–7, Jul 1999.
- [115] Dale Schenk, Guriqbal S Basi, and Menelas N Pangalos. Treatment strategies targeting amyloid β -protein. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(9):a006387, Sep 2012.

- [116] Alberto Serrano-Pozo, Matthew P Frosch, Eliezer Masliah, and Bradley T Hyman. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1):a006189, Sep 2011.
- [117] J M Shefner, M E Cudkowicz, D Schoenfeld, T Conrad, J Taft, M Chilton, L Urbinelli, M Qureshi, H Zhang, A Pestronk, J Caress, P Donofrio, E Sorenson, W Bradley, C Lomen-Hoerth, E Pioro, K Rezanian, M Ross, R Pascuzzi, T Heiman-Patterson, R Tandan, H Mitsumoto, J Rothstein, T Smith-Palmer, D MacDonald, D Burke, and NEALS Consortium. A clinical trial of creatine in ALS. *Neurology*, 63(9):1656–61, Nov 2004.
- [118] Yasushi Soda, Kenzaburo Tani, and Xiaojin Li. PGK and CMV Promoters Exert the Strongest Activity in Lentiviral Gene Transduction of Myeloid Cells Including Mature Neutrophils. *Molecular Therapy*, Volume 11, May 2005.
- [119] Odile Spreux-Varoquaux, Gilbert Bensimon, Lucette Lacomblez, François Salachas, Pierre François Pradat, Nadine Le Forestier, Abdellatif Marouan, Michel Dib, and Vincent Meininger. Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci*, 193(2):73–8, Jan 2002.
- [120] Jemeen Sreedharan, Ian P Blair, Vineeta B Tripathi, Xun Hu, Caroline Vance, Boris Rogelj, Steven Ackerley, Jennifer C Durnall, Kelly L Williams, Emanuele Buratti, Francisco Baralle, Jacqueline de Bellerocche, J Douglas Mitchell, P Nigel Leigh, Ammar Al-Chalabi, Christopher C Miller, Garth Nicholson, and Christopher E Shaw. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 319(5870):1668–72, Mar 2008.
- [121] T Stearns. Green fluorescent protein. The green revolution. *Curr Biol*, 5(3):262–4, Mar 1995.

- [122] Erik Storkebaum, Diether Lambrechts, Mieke Dewerchin, Maria-Paz Moreno-Murciano, Saskia Appelmans, Hideyasu Oh, Philip Van Damme, Bart Rutten, Wing Yan Man, Maria De Mol, Sabine Wyns, David Manka, Kristel Vermeulen, Ludo Van Den Bosch, Nico Mertens, Christoph Schmitz, Wim Robberecht, Edward M Conway, Désiré Colen, Lieve Moons, and Peter Carmeliet. Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS. *Nat Neurosci*, 8(1):85–92, Jan 2005.
- [123] Jamuna R Subramaniam, W Ernest Lyons, Jian Liu, Thomas B Bartnikas, Jeffrey Rothstein, Donald L Price, Don W Cleveland, Jonathan D Gitlin, and Philip C Wong. Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading. *Nat Neurosci*, 5(4):301–7, Apr 2002.
- [124] Gustavo Tiscornia, Oded Singer, and Inder M Verma. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc*, 1(1):241–5, 2006.
- [125] A Tomac, E Lindqvist, L F Lin, S O Ogren, D Young, B J Hoffer, and L Olson. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, 373(6512):335–9, Jan 1995.
- [126] D Trotti, A Rolfs, N C Danbolt, R H Brown, Jr, and M A Hediger. SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci*, 2(5):427–33, May 1999.
- [127] Li-Jun Wang, Yan-Yan Lu, Shin-ichi Muramatsu, Kuni-hiko Ikeguchi, Ken-ichi Fujimoto, Takashi Okada, Hiroaki Mizukami, Takashi Matsushita, Yutaka Hanazono, Akihiro Kume, Toshiharu Nagatsu, Keiya Ozawa, and Imaharu Nakano. Neuroprotective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor mediated by an adeno-associated virus

vector in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*, 22(16):6920–8, Aug 2002.

- [128] Yaoming Wang, Xiao Ou Mao, Lin Xie, Surita Banwait, Hugo H Marti, David A Greenberg, and Kunlin Jin. Vascular endothelial growth factor overexpression delays neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice. *J Neurosci*, 27(2):304–7, Jan 2007.
- [129] Hynek Wichterle, Ivo Lieberam, Jeffery A Porter, and Thomas M Jessell. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, 110(3):385–97, Aug 2002.
- [130] M Wiedau-Pazos, J J Goto, S Rabizadeh, E B Gralla, J A Roe, M K Lee, J S Valentine, and D E Bredesen. Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 271(5248):515–8, Jan 1996.
- [131] T L Williamson and D W Cleveland. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci*, 2(1):50–6, Jan 1999.
- [132] Q Yan, C Matheson, and O T Lopez. In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature*, 373(6512):341–4, Jan 1995.
- [133] G Zhang, V Gurtu, and S R Kain. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 227(3):707–11, Oct 1996.
- [134] T Zigova, V Pencea, S J Wiegand, and M B Luskin. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*, 11(4):234–45, Jul 1998.
- [135] R Zufferey, J E Donello, D Trono, and T J Hope. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory ele-

ment enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*, 73(4):2886–92, Apr 1999.