

**Entwicklung eines Zellkulturmodells
zur metachromatischen Leukodystrophie
durch Transduktion glialer Zellen
mit lentiviralen Vektoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Nina Weiler
aus Koblenz

2007

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Gieselmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Penka Pesheva

Tag der Mündlichen Prüfung: 16. April 2007

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn,
Direktor: Prof. Dr. Volkmar Gieselmann

Meinen Eltern und meinen Brüdern

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	5
II	Abkürzungen	9
III	Abbildungen	11
IV	Tabellen	12
1	Einleitung	13
1.1	Stoffwechsel der Sphingolipide	13
1.2	Die metachromatische Leukodystrophie	15
1.3	Myelinisierende Zellen	17
1.4	Pathophysiologie der metachromatischen Leukodystrophie	18
1.5	Mausmodell zur metachromatischen Leukodystrophie	19
1.6	Zellmodell zur metachromatischen Leukodystrophie	19
1.7	Lentivirale Vektoren	20
1.8	Problemstellung	21
2	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Chemikalien	24
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	26
2.1.4	Glasmaterial	26
2.1.5	Reagenzien für Zellkultur	27
2.1.6	Antikörper	28
2.1.7	Bakterienkultur	28
2.1.7.1	Kompetente Bakterien: JM 109	28
2.1.7.2	LB-Agar-Platten	29
2.1.7.3	LB-Medium	29
2.1.8	DNA: Plasmide	29
2.1.8.1	Transferplasmide	29
2.1.8.2	Verpackungsplasmid: pCMV Δ R8.93	31
2.1.8.3	Hüllplasmid: pMD.G	32
2.1.9	Zelllinien	33
2.1.9.1	HEK293T („Human embryonic kidney“)	33

2.1.9.2	CHO-K1 („Chinese hamster ovary“)	33
2.1.9.3	CHO-GaIT	33
2.1.9.4	CHO-SULF	33
2.1.9.5	Schwann-Zellen aus ASA-defizienten Mäusen	33
2.1.10	Versuchstiere	34
2.1.10.1	ASA-defiziente Mäuse	34
2.2	Methoden	34
2.2.1	Cäsiumchlorid-DNA-Präparation	34
2.2.1.1	Lösungen	34
2.2.1.2	DNA-Präparation	34
2.2.2	Zellkultur	36
2.2.2.1	Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
2.2.2.2	Kulturbedingungen	36
2.2.2.3	Arbeiten mit Zellen	37
2.2.2.4	Zellkulturmedien	37
2.2.2.5	Beschichten von Zellkulturschalen und -platten	38
2.2.2.6	Färbung von Zellkernen mit Bisbenzimid H	38
2.2.3	Präparation von Primärkulturen aus Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse	39
2.2.3.1	Lösungen	39
2.2.3.2	Anlegen einer Mischkultur	39
2.2.3.3	Separation der Oligodendrozyten	40
2.2.4	Immunfluoreszenzfärbung fixierter Zellen	41
2.2.5	Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung von lentiviralen Vektoren	43
2.2.5.1	Lösungen	43
2.2.5.2	Transfektionsprotokoll	43
2.2.5.3	Transduktion von Zellen mit lentiviralen Vektoren	44
2.2.6	Extraktion von Lipiden aus Zellen	45
2.2.6.1	Vorbereitung von LiChroprep [®] RP-18	45
2.2.6.2	Lipidextraktion	45
2.2.7	Dünnschichtchromatographie (DC)	46
2.2.7.1	Lösung zur Färbung von DC-Platten	46
2.2.7.2	Auftrennen von Lipiden auf DC-Platten	46

2.2.8	Immundetektion von Sulfatid auf DC-Aluminiumfolien	47
2.2.8.1	Lösungen	47
2.2.8.2	Immundetektion	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Primäre Zellkulturen	49
3.1.1	Oligodendrozyten	49
3.1.1.1	Präparation der Oligodendrozyten	49
3.1.1.2	Zellausbeute	51
3.1.1.3	Immunfluoreszenzfärbung der Oligodendrozyten	53
3.1.2	Astrozyten	55
3.1.3	Schwann-Zellen	56
3.2	Transfektion von 293T-Zellen zur Herstellung lentiviraler Vektoren	57
3.3	Transduktion mit lentiviralen Vektoren	59
3.3.1	HEK293T-Zellen	59
3.3.2	CHO-Zellen	61
3.3.2.1	Transduktion von CHO-Zellen	62
3.3.2.2	Lipidanalyse transduzierter CHO-Zellen	64
3.3.3	ZNS: Astrozyten und Oligodendrozyten	67
3.3.3.1	Transduktion von Astrozyten und Oligodendrozyten	68
3.3.3.2	Lipidanalyse transduzierter Oligodendrozyten	71
3.3.4	PNS: Schwann-Zellen	71
3.3.4.1	Transduktion von Schwann-Zellen	71
3.3.4.2	Lipidanalyse transduzierter Schwann-Zellen	74
4	Diskussion	81
4.1	Präparation primärer Oligodendrozyten aus Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse	81
4.2	Transfektion und Herstellung lentiviraler Vektoren	82
4.3	Transduktion verschiedener Zelllinien und primärer Zellen	82
4.4	Enzymaktivität der Ceramidgalaktosyltransferase aus LV-CGT-GFP und der Cerebrosidsulfotransferase aus LV-CST	83
4.5	Ein Zellmodell zur Untersuchung der metachromatischen Leukodystrophie: Sulfatid-speichernde Schwann-Zellen aus ASA-Knockout-Mäusen	84

5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88
7	Danksagung	93
8	Lebenslauf	94

II Abkürzungen

- AP: Alkalische Phosphatase
- ASA: Arylsulfatase A
- BME: „Basal medium eagle“
- BPE: „Bovine pituitary extract“, Extrakt aus Rinderhypophysen
- BSA: Bovines Serumalbumin
- CGT: Ceramidgalaktosyltransferase
- CHO: „Chinese hamster ovary“
- CHO-GalT-CST: Mit LV-CST transduzierte CHO-GalT-Zellen
- CHO-K1-CST-CGT: Mit LV-CST und LV-CGT transduzierte CHO-K1-Zellen
- CMV: Zytomegalie-Virus
- CST: Cerebrosidsulfotransferase
- DC: Dünnschichtchromatographie
- DMEM: „Dulbecco´s modified eagle medium“
- DMSO: Dimethylsulfoxid
- EDTA: „Ethylenediaminetetraacetic acid“
- FCS: „Fetal calf serum“, Serum fetaler Kälber
- GFAP: „Glial fibrillar acidic protein“
- GFP: „Green fluorescence protein“
- HBSS: „Hank´s balanced salt solution“
- HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
- HS: „Horse serum“, Pferdeserum
- IRES: „Internal ribosomal entry side“
- LB: Luria-Bertani
- LTR: „Long terminal repeat“
- LV: Lentiviraler Vektor
- LV-CGT-GFP: Lentiviraler Vektor zur Übertragung der cDNA-Sequenz der CGT und des GFP

- LV-CST: Lentiviraler Vektor zur Übertragung der cDNA-Sequenz der CST
- LV-GFP: Lentiviraler Vektor zur Übertragung der cDNA-Sequenz des GFP
- MBP: „Myelin basic protein“
- MLD: Metachromatische Leukodystrophie
- MPS: Monozytisches Phagozytensystem
- PBS: „Phosphat-buffered saline“
- PNS: Peripheres Nervensystem
- RIP: „Receptor interacting protein“
- rpm: „Rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
- SC Ko: Schwann-Zellen aus ASA-Knockout-Mäusen
- SIN: „Self-inactivating“, sich selbst inaktivierender Vektor
- SM: Sphingomyelin
- TIT: Trijodthyronin
- VSV: Virus der vesikulären Stomatitis
- ZNS: Zentrales Nervensystem

III Abbildungen

Abbildung 1: Sphingosin (Berg et al., 2003)	13
Abbildung 2: Sulfatid (Kolter und Sandhoff, 1999)	14
Abbildung 3: Patient mit juveniler MLD	16
Abbildung 4: pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18	30
Abbildung 5: pCMV Δ R8.91	31
Abbildung 6: pMD.G	32
Abbildung 7: Primärkultur aus den Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse	50
Abbildung 8: Oligodendrozyten (3 Tage nach Abschütteln)	51
Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung präparierter Oligodendrozyten	54
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung präparierter Oligodendrozyten – Auswertung	55
Abbildung 11: Astrozyten	56
Abbildung 12: Schwann-Zellen	57
Abbildung 13: Lentiviren-produzierende HEK293T-Zellen	58
Abbildung 14: Transduzierte HEK293T-Zellen	60
Abbildung 15: Transduktion von HEK293T-Zellen mit LV-GFP – Auswertung	61
Abbildung 16: Transduzierte CHO-Zellen	63
Abbildung 17: Dünnschichtchromatographie von Lipiden aus transduzierten CHO-Zellen	64
Abbildung 18: Dünnschichtchromatographie und Immundetektion von Sulfatid transduzierter CHO-Zellen	66
Abbildung 19: Transduzierte Primärkultur aus den Gehirnen neugeborener ASA-Knockout- Mäuse	68
Abbildung 20: Transduzierte Astrozyten	69
Abbildung 21: Transduzierte Oligodendrozyten	69
Abbildung 22: Transduktion von Astrozyten mit LV-GFP – Auswertung	70
Abbildung 23: Transduzierte Schwann-Zellen	72
Abbildung 24: Transduktion von Schwann-Zellen mit LV-GFP – Auswertung	73
Abbildung 25: Dünnschichtchromatographie von Lipiden aus transduzierten, ASA-defizienten Schwann-Zellen und transduzierten CHO-K1-Zellen	75
Abbildung 26: Dünnschichtchromatographie und Immundetektion von Sulfatid transduzierter, ASA-defizienter Schwann-Zellen	77

Abbildung 27: Immundetektion von Sulfatid transduzierter Schwann-Zellen und transduzierter CHO-K1-Zellen (untransduzierte Schwann-Zellen in Titration mit zunehmender Zellzahl als Kontrolle) 79

IV Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die für Primärkulturen präparierten ASA-Knockout-Mäuse und die aus den primären Mischkulturen abgeschüttelten Oligodendrozyten 52

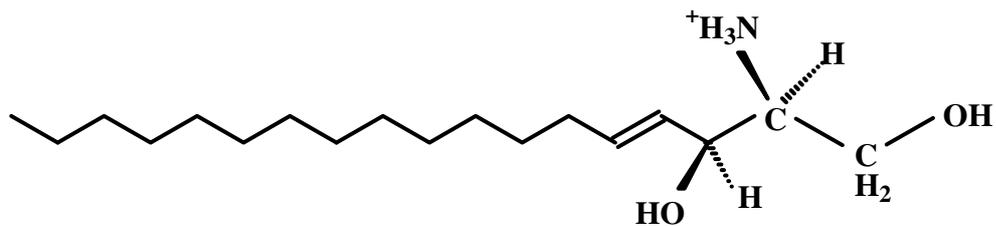
Tabelle 2: Oberflächenmarker von Oligodendrozyten (Baumann und Pham-Dinh, 2001) 53

1 Einleitung

1.1 Stoffwechsel der Sphingolipide

Sphingolipide sind Bausteine der Plasmamembran eukaryontischer Zellen. Sie verankern Kohlenhydrate durch ihren lipophilen Anteil in der Membran und bilden zusammen mit den Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen die Glykokalix. Des weiteren sind sie an der Transduktion extrazellulärer Signale in das Innere der Zelle beteiligt. Für den Aufbau der Myelinscheiden des Nervensystems sind Sphingolipide essentiell. Sie leiten sich vom Sphingosin ab (Kolter und Sandhoff, 1999).

Abbildung 1: Sphingosin (Berg et al., 2003)

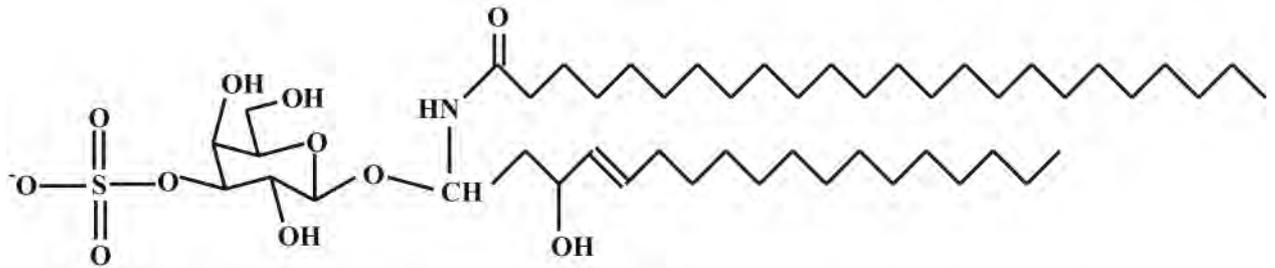


Der lipophile Anker der Sphingolipide in der Plasmamembran ist das Ceramid. Es wird im endoplasmatischen Retikulum der Zelle synthetisiert. Durch Kondensation von L-Serin mit einer Coenzym-A-aktivierten Fettsäure entsteht Sphinganin und reduziertes Sphinganin wird zu Ceramid acyliert (Kolter und Sandhoff, 1999).

Das Ceramid ist der Ausgangsstoff für den Aufbau von Glykosphingolipiden und Phosphosphingolipiden (Sphingomyelin). Die Hydroxylgruppe des Ceramids ist die Bindungsstelle für die diversen polaren Köpfe der Sphingolipide. Durch Reaktion von Ceramid mit Phosphatidylcholin entsteht Sphingomyelin, welches ein Bestandteil von Myelinscheiden und darüber hinaus ein ubiquitärer Baustein von Plasmamembranen ist. Durch Reaktion von Ceramid mit aktivierten Kohlenhydraten entstehen Glykosphingolipide mit mannigfaltigen Funktionen. Werden Oligosaccharide mit einem Ceramid verknüpft, entstehen Ganglioside, die auf der Zelloberfläche der Neuronen an der Wechselwirkung mit glialen Zellen beteiligt sind. Ist Galaktose oder Glukose der Substituent, entstehen

Cerebroside (Galaktosylceramide, Glukosylceramide). Wird ein Galaktosylceramid mit einem Sulfatrest verknüpft, entsteht Sulfatid (Berg et al., 2003; Kolter und Sandhoff, 1999).

Abbildung 2: Sulfatid (Kolter und Sandhoff, 1999)



Die Enzyme, die zur Sulfatidsynthese benötigt werden, sind die Ceramidgalaktosyltransferase (CGT) und die Cerebrosideulfotransferase (CST). Zunächst wird durch die Ceramidgalaktosyltransferase Nukleotid-aktivierte Galaktose β -glykosidisch mit einem Ceramid-Molekül verbunden (Galaktosylierung von Ceramid) (Kolter und Sandhoff, 1999). Das entstandene Galaktosylceramid wird durch die CST mit dem als 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) aktiviertem Sulfat zu Sulfatid (Galaktosylceramid-3-sulfat) umgewandelt (Kolter und Sandhoff, 1999). Sulfatid befindet sich vor allem im Myelin des zentralen und peripheren Nervensystems und in der Niere, aber auch in Geweben mit exkretorischer Funktion, wie z.B. der Magenmukosa oder dem Endometrium, und in Körperflüssigkeiten, wie z.B. Urin und Liquor cerebrospinalis (Figura et al., 2001). Sulfatid ist ein Membranlipid des äußeren Blattes der Plasmamembran und ein wichtiger Baustein der Myelinscheiden. Zusammen mit den Galaktosylceramiden „isoliert“ Sulfatid die Nerven elektrisch zur Erhöhung der Nervenleitgeschwindigkeit (Schmidt und Thews, 2000). Es wird diskutiert, dass Sulfatid auch beim aktiven Natrium-Transport als Co-Faktor der Natrium-Kalium-ATPase dient (Rintoul und Welti, 1989). Es gibt weiterhin Hinweise, dass Sulfatid an der Bindung von Opiaten, GABA und Serotonin an ihre Rezeptoren beteiligt ist (Craves et al., 1980; Ebadi und Chweh, 1980; Miyakawa und Ishitani, 1982).

1.2 Die metachromatische Leukodystrophie

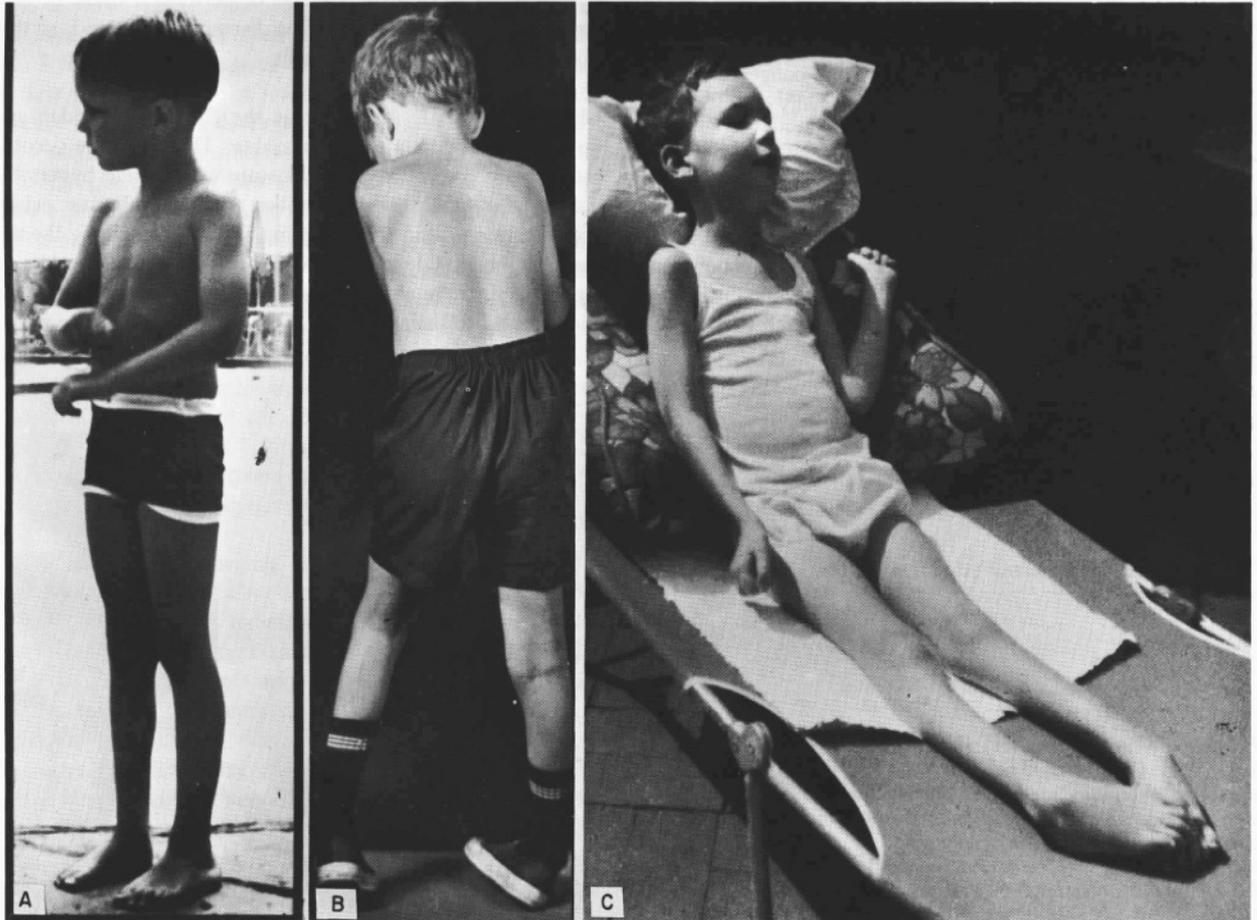
Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung aus der Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten. Ihre Inzidenz wird auf 1 von 40.000 bis 100.000 Neugeborenen geschätzt (Gustavson und Hagberg, 1971; Heim et al., 1997). Sie ist durch eine Akkumulation von Sulfatid in verschiedenen Organen gekennzeichnet, dazu gehören das zentrale und das periphere Nervensystem, die Gallenblase und Gallengänge, sowie die Niere (Figura et al., 2001; Jatzkewitz, 1958; Jatzkewitz et al., 1970;). Die Ursache liegt in einem Defekt im Abbau des Sulfatids. Der erste Schritt der Degradation dieses Lipids wird von der Arylsulfatase A (ASA) und deren Aktivatorprotein Saposin B katalysiert. Die metachromatische Leukodystrophie wird zumeist durch einen Defekt der Arylsulfatase A verursacht (Austin et al., 1963). Bis heute sind insgesamt über 80 verschiedene Mutationen bekannt, von denen wiederum 3 Mutationen für die meisten der Erkrankungen verantwortlich sind. In selteneren Fällen liegt ein Defekt des Saposin B vor (Shapiro et al., 1979).

Klinisch zeigen sich verschiedene Manifestationsformen der MLD, die sich im Zeitpunkt des Auftretens und dem Progress der Erkrankung unterscheiden. Dazu gehören die spät-infantile, die juvenile und die adulte Form.

Die spät-infantile Form tritt im Alter von 18 bis 24 Monaten auf. Die Kleinkinder erkranken mit dem Verlust des bereits erlernten Gehens und Stehens, Dysarthrie und mit zunehmendem Verlust der Sehfähigkeit. Es folgen Erblindung, Tetraplegie und schließlich das Stadium der Dezerebration (Enthirnungsstarre). Die Erkrankung endet mit dem Tod der Patienten, meist innerhalb von 5 Jahren nach Krankheitsbeginn (Figura et al., 2001).

Die juvenile Form tritt zwischen dem vierten und sechzehnten Lebensjahr auf. Die Kinder zeigen eine Verschlechterung der schulischen Leistungen, Gangstörungen, Inkontinenz und Persönlichkeitsveränderungen. Im weiteren Verlauf entwickeln die Patienten eine spastische Parese und eine zerebelläre Ataxie, und schließlich Tetraplegie und Dezerebration. Die Kinder versterben meist vor dem zwanzigsten Lebensjahr (Figura et al., 2001).

Abbildung 3: Patient mit juveniler MLD



A: Das Kind im Alter von 5½ Jahren, ein Jahr vor Auftreten der ersten Symptome; B: Das Kind im Alter von 6 Jahren und 11 Monaten, es besteht eine Gangstörung und das Kind ist nicht in der Lage, ohne Unterstützung zu stehen; C: Das Kind im Alter von 8 Jahren und 10 Monaten, es ist bettlägerig und hat Probleme mit dem Schlucken, so dass es über eine Sonde ernährt werden muss, des weiteren hat es die Fähigkeit zu sprechen verloren, erkennt jedoch die Familie und freut sich über Zuwendung (Figura et al., 2001).

Die adulte Form kann sich von der Pubertät bis zum Senium manifestieren. Die Patienten fallen durch Verschlechterung der Leistungen in Schule und Beruf, Veränderungen der Persönlichkeit, Gedächtnisstörungen und durch psychotische Symptome wie Halluzinationen und Wahn auf. Weiterhin zeigen sich Inkontinenz, eine zunehmende spastische Parese der Arme und Beine, Ataxie, choreaforme Bewegungen und Dystonie.

Die Erkrankung kann innerhalb einiger Jahre zum Tode führen, aber auch über Jahrzehnte andauern (Figura et al., 2001).

Die therapeutischen Möglichkeiten sind stark begrenzt. Symptomatisch werden Physiotherapie und der GABA-Transaminase-Inhibitor Vigabatrin angewandt. Letzterer mildert die Spastik und wirkt bei Patienten mit Krampfanfällen antiepileptisch (Figura et al., 2001). Bei wenigen Patienten wurden Knochenmark-Transplantationen versucht, da gezeigt wurde, dass Makrophagen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können (Krall et al., 1994). So ist es möglich, dass transplantierte Zellen mit funktionstüchtiger ASA in das ZNS gelangen und dort ASA sezernieren. Diese kann wiederum von ASA-defizienten Zellen aufgenommen werden. Eine abschließende Bewertung, auch in Abhängigkeit von der Verlaufsform und dem Zeitpunkt der Transplantation, steht zwar noch aus, jedoch scheint die Therapie bei Patienten mit fortgeschrittener Symptomatik nicht wirksam (Figura et al., 2001).

1.3 Myelinisierende Zellen

Bei der metachromatischen Leukodystrophie wird Sulfatid unter anderem in myelinisierenden Zellen gespeichert. Durch die Überladung mit Sulfatid gehen diese Zellen zugrunde und konsekutiv auch die Nervenzellen (Figura et al., 2001; Yamano et al., 1980). Es entsteht das Krankheitsbild der metachromatischen Leukodystrophie. Es handelt sich bei den myelinisierenden Zellen um die Oligodendrozyten des zentralen und die Schwann-Zellen des peripheren Nervensystems.

Histologisch unterscheidet man im ZNS Nerven- und Gliazellen. Die glialen Zellen sind weiter zu differenzieren in Mikro- und Makroglia (Baumann und Pham-Dinh, 2001). Die Mikroglia sind phagozytierende Zellen mit großer Beweglichkeit, die zur Präsentation von Antigenen fähig sind (zerebrale Makrophagen). Zur Makroglia zählt man Astrozyten und Oligodendrozyten, die sich aus gemeinsamen Vorläuferzellen entwickeln. Astrozyten sind die „Stützzellen“ des ZNS. Sie bilden Leitstrukturen für Neuroblasten und Axone und schaffen ein für Nervenzellen günstiges Milieu. Sie verstoffwechseln Transmitter und Metaboliten (Papst, 1994). Oligodendrozyten bilden mit ihren Fortsätzen die Myelinscheiden, die elektrische „Isolierung“ der Nervenzellen, die eine schnellere nervale Erregungsleitung ermöglicht. Der Verlust des Myelins und der myelinisierenden Zellen im

Rahmen einer demyelinisierenden Erkrankung führt wie oben beschrieben zur massiven funktionellen Beeinträchtigung des Nervengewebes. Im peripheren Nervensystem entsprechen Schwann-Zellen den Oligodendrozyten in Morphologie und Funktion, wobei dort eine Schwann-Zelle immer nur ein Axon umfasst (Papst, 1994).

1.4 Pathophysiologie der metachromatischen Leukodystrophie

Die Ursache der metachromatischen Leukodystrophie liegt zumeist in der Defizienz der Arylsulfatase A, selten in einem Defekt des Aktivatorproteins Saposin B (Austin et al., 1963; Shapiro et al., 1979). Dies hat in beiden Fällen einen gestörten Abbau der 3,0-Sulfogalactosyl-Glykolipide zur Folge. Hierzu gehört das Sulfatid. Dies wiederum führt zu deren Akkumulation und den typischen pathologischen Veränderungen im Nervengewebe. Bereits makroskopisch ist erkennbar, dass die weiße Substanz des zentralen Nervensystems reduziert ist, genauso das Myelin der peripheren Nerven (Figura et al., 2001). Bei der histologischen Untersuchung der Gehirne an MLD verstorbener Patienten zeigt sich eine lysosomale Speicherung metachromatisch anfärbbaren Materials, das bereits 1958 als Sulfatid identifiziert wurde (Figura et al., 2001, Jatzkewitz, 1958). Auch im peripheren Nervensystem findet sich metachromatisches Material, gespeichert in den Lysosomen der Schwann-Zellen und Makrophagen (Figura et al., 2001). Die Zahl der Oligodendrozyten und der Schwann-Zellen ist verringert.

Darüber hinaus ist die Zusammensetzung der weißen Substanz verändert. Der Anteil des Sulfatids ist erhöht, der Anteil der anderen Lipide (Cholesterin, Sphingomyelin) ist verringert. Die Konzentration des Lysosulfatids, der deacetylierten Form des Sulfatids, welche zytotoxisch wirkt, ist erhöht (Figura K. 2001).

Es ist unklar, wie die Akkumulation von Sulfatid, die Demyelinisierung der nervalen Leitungsbahnen und der Verlust der Glia- und Nervenzellen verknüpft sind (Gieselmann et al., 2003). Verschiedene Theorien werden diskutiert, unter anderem eine gestörte Resorption der Sulfatide in der innersten Schicht der Markscheide (Austin, 1973). Auch könnte der Verlust des Myelins durch eine veränderte und damit instabile Zusammensetzung des Myelins erklärt werden (Ginsberg und Gershfeld, 1991). Ein weiterer möglicher Mechanismus könnte das Auftreten des zytotoxischen Lysosulfatid sein

(Tanaka et al., 1988; Tanaka et al., 1989). Eine abschließende Klärung dieser Frage steht noch aus.

1.5 Mausmodell zur metachromatischen Leukodystrophie

Die metachromatische Leukodystrophie ist eine genetische Erkrankung, die natürlicherweise nur beim Menschen vorkommt. Es gibt in der Natur kein Tier mit metachromatischer Leukodystrophie (Gieselmann et al., 2003). Ein Mausmodell zur Erforschung der MLD wurde entwickelt (Hess et al., 1996). Diese generierten ASA-Knockout-Mäuse zeigen im Vergleich zum Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie einen milderen Phänotyp. Es wird zwar Sulfatid in ZNS und PNS, Niere und Gallengängen gespeichert, aber eine weitreichende Demyelinisierung im zentralen Nervensystem findet nicht statt. Eine Reduktion der Fasern im peripheren Nervensystem ist deutlich, aber nicht mit den Veränderung bei Patienten mit MLD zu vergleichen. Die Tiere zeigen Verhaltensänderungen und eine veränderte Neurologie mit Gangstörung und Verlangsamung der Bewegungen. Diese Symptome sind langsam progredient, aber die Lebensdauer der Tiere ist nicht verkürzt (Figura et al., 2001).

1.6 Zellmodell zur metachromatischen Leukodystrophie

Es ist nicht möglich, Zellen von Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie zu gewinnen und zu kultivieren (Gieselmann et al., 2003). Es ist möglich, myelinisierende Zellen aus ASA-Knockout-Mäusen zu präparieren. Auch wenn keine Demyelinisierung bei diesen Tieren stattfindet, ist eine Speicherung von Sulfatid mit zunehmenden Alter nachweisbar (Hess et al., 1996). Die Zellen werden jedoch aus Neugeborenen und Jungtieren präpariert (Komiya et al., 2003; Morganti et al., 1990). In diesem Alter ist die Sulfatid-Speicherung noch wenig ausgeprägt, so dass die isolierten Zellen nur geringe, pathogenetisch irrelevante Mengen an Sulfatid speichern. Zudem ist es schwierig, eine Akkumulation von Sulfatid in Kultur zu erreichen. Schwann-Zellen können zwar über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, da sie spontan immortalisieren, eine Pathologie, wie sie in vivo vorliegt, zeigt sich aber nicht (Eccleston et al., 1991). Es fehlt immer noch ein

etabliertes in vitro-Modell zur Untersuchung der Pathophysiologie der metachromatischen Leukodystrophie (Gieselmann et al., 2003).

1.7 Lentivirale Vektoren

Viren sind aus einer die genetische Information tragenden Nukleinsäure und aus einem Proteinmantel, dem Kapsid, welches die Nukleinsäure umgibt, aufgebaut (Eggers, 2001). Die Nukleinsäure und das Kapsid zusammen bilden das Nukleokapsid (englisch „core“). Dieses ist bei manchen Viren noch mit einer zusätzlichen Hülle (englisch „envelope“) umgeben. Diese besteht aus Lipiden, Proteinen und Kohlehydraten und ist von der Plasmamembran der vom Virus infizierten Zelle abgeleitet. Die zelltypischen Proteine der Zellmembran sind durch virusspezifische Glykoproteine ersetzt. Daneben enthalten Viren noch Proteine mit enzymatischer Aktivität (Eggers, 2001).

Viren enthalten nur eine Art Nukleinsäure, entweder DNA oder RNA. Zu den RNA-Viren gehört die Familie der Retroviren. Diese zeichnen sich durch den Besitz der reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, aus. Die reverse Transkriptase schreibt virale einsträngige RNA in doppelsträngige DNA um, die provirale DNA. Diese wird von den sogenannten „long terminal repeats“ flankiert, die für die Erkennung der proviralen DNA durch die Integrase notwendig sind und außerdem eine wichtige Rolle bei der Transkription der viralen Gene spielen. Die Integrase fügt die provirale DNA in das Genom der Wirtszellen ein. Nach Integration wird die provirale DNA als Provirus bezeichnet. Eine Untergruppe der Retroviren sind die Lentiviren, dazu zählen das HIV-1 und HIV-2 (Eggers, 2001).

Lentivirale Vektoren sind replikationsdefiziente, hybride virale Transportsysteme für genetische Informationen, die aus dem Kapsid („core“-Proteinen) und Enzymen von Lentiviren und Hüllproteinen („envelope“-Proteine) anderer Viren aufgebaut sind (Follenzi und Naldini, 2002). Die Hüllproteine stammen meist aus dem Virus der vesikulären Stomatitis (Dull et al., 1998).

Diese Vektoren können verschiedenste Zelltypen transduzieren, unabhängig von deren Proliferationsstatus, und dies sowohl ex vivo als auch in vivo (Blomer et al., 1997; Naldini et al., 1996a; Naldini et al., 1996b). Sie binden unspezifisch an Phospholipide in der Plasmamembran der Zelle, so dass sie eine Vielzahl verschiedener Zellen infizieren können

(Burns et al., 1993). Zum Schutz vor unkontrollierter Virusreplikation wurden verschiedene virale Gene zerstört. So sind bei dem in dieser Arbeit verwandten Vektor nur noch drei der neun HIV-1-Gene aktiv: gag, pol und rev (Zufferey et al., 1998). Außerdem wird durch eine Deletion in der U3-Region in der LTR am 3'Ende die transkriptionale Aktivität der LTR-Sequenz aufgehoben, so dass in den transduzierten Zellen keine vollständige Vektor-RNA erzeugt werden kann (Zufferey et al., 1998). Die Viruspartikel können nur die frühen Schritte der viralen Entwicklung nachvollziehen, Anhaftung (englisch „attachment“) und Eintritt (englisch „entry“) in die Zelle, Umschreibung der RNA in DNA (Reverse Transkription), Überführung der DNA in den Zellkern und Integration in das Genom. Bei „Infektion“ durch einen lentiviralen Vektor entsteht eine stabil transduzierte Zelle, d.h. die übertragene genetische Information bleibt auch bei Zellteilung im Genom der Zellen erhalten (Follenzi und Naldini, 2002).

Lentivirale Vektoren werden von Produzentenzellen hergestellt, die durch transiente Transfektion entstehen. Als Zelllinie dient HEK293T. Es werden drei Plasmide kointransfiziert. Dabei handelt es sich um ein Transferplasmid, ein Verpackungsplasmid und ein Hüllplasmid. Das Transferplasmid enthält die Information, die in das Genom der Zielzelle integriert werden soll. Dieses Gen steht unter der Kontrolle eines humanen CMV-Promotors und ist eingerahmt von LTR-Sequenzen mit einer Deletion in der U3-Region am 3'Ende (Dull et al., 1998). Das Verpackungsplasmid pCMV Δ R8.93 kodiert für die HIV 1-Gene gag, pol und rev, das tat-Gen ist durch zwei Mutationen defekt (Dull et al., 1998). Das Hüllplasmid kodiert für das VSVG-Protein, das Hüllprotein G des vesikulären Stomatitisvirus. Durch diese Komponenten entsteht ein unvollständiger Viruspartikel mit oben genannten Eigenschaften, der durch Knospung (englisch „budding“) aus der Zelle ins Medium übergeht.

1.8 Problemstellung

Die metachromatische Leukodystrophie ist eine autosomal-rezessiv vererbte, lysosomale Speicherkrankheit mit schwerwiegendem Verlust erworbener Fähigkeiten und infauster Prognose. Die Erkrankung ist unaufhaltsam progredient, die Patienten versterben im Stadium der Dezerebration. Ihr liegt zumeist eine Defizienz der Arylsulfatase A zugrunde, welche ein Schlüsselenzym im Abbau der 3,0-Sulfogalactosyl-Glykolipide, insbesondere

des Sulfatids, ist. Konsekutiv wird Sulfatid gespeichert, vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem, aber auch in Niere, Gallenblase und den Gallengangsepithelien der Leber. Die gliale Speicherung führt zur einer weitreichenden zentralen und peripheren Demyelinisierung und dem Untergang glialer und neuronaler Zellen und somit zum Krankheitsbild der metachromatischen Leukodystrophie. Der pathogenetische Zusammenhang zwischen Sulfatid-Speicherung, Demyelinisierung und dem Zellverlust ist nach wie vor ungeklärt. Ein Tiermodell zur Untersuchung der metachromatischen Leukodystrophie steht mit der von Hess et al. entwickelten ASA-Knockout-Maus zur Verfügung, ein etabliertes Zellmodell für die metachromatische Leukodystrophie gab es bisher nicht (Gieselmann et al., 2003; Hess et al., 1996).

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro*-Modell zur Untersuchung der metachromatischen Leukodystrophie zu etablieren. Es wurde versucht, die Speicherung von Sulfatid in kultivierten, ASA-defizienten Oligodendrozyten aus dem zentralen Nervensystem und Schwann-Zellen aus dem peripheren Nervensystem zu erhöhen. Dazu sollte die Sulfatid-Synthese in diesen kultivierten Zellen gesteigert werden. Wegen schlechter Transfektionseffizienz sollten die Zellen mit Hilfe lentiviraler Vektoren, die für die cDNAs der Cerebrosidsulfotransferase und der Ceramidgalaktosyltransferase kodieren, transduziert werden. Es wurde erwartet, dass eine erhöhte Lipidsynthese auch zu einer vermehrten Speicherung führt.

2 Material und Methoden

Alle Methoden, wenn nicht anders angegeben, wurden den „Current Protocols in Molecular Biology“ (2002) entnommen.

2.1 Material

2.1.1 Geräte

- Brutschrank Forma Scientific, Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
- Dampfsterilisator Varioklav EC, H+P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
- Digital-pH-Meter 646, Knick, Berlin, Deutschland
- Gefrierschrank –20°C Öko Arctis Super electronic, AEG , Nürnberg, Deutschland
- Gefriertruhe –80°C Sanyo Ultra low, Sanyo Scientific, Bensenville/ Illinois, USA
- Heizblock, Stuart Scientific, Newcastle, UK
- Kaltlichtlampe, Schott Duran, Mainz, Deutschland
- Kühlschrank Öko Santo Super electronic, AEG, Nürnberg, Deutschland
- Magnetrührer Ikamag RET, Ika-Werke, Staufen, Deutschland
- Mikroskope
 - Zeiss Axiovert 100M, AxioCam HRm, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
 - Zeiss Telaval 31, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
 - Zeiss Stemi SV 6, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
- Pipettierhilfen
 - Eppendorf Easypet 4421, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
 - Pipetman 1000µl, 200µl, 20µl, 10µl, Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich
- Präparierbesteck, neoLab, Heidelberg, Deutschland
- Reacti Therm „Heating and stirring module“, Pierce, Rockfort/ Illinois, USA
- Schüttelinkubator, New Brunswick Scientific, Edison/ New Jersey, USA
- Schweißgerät für QuickSeal-Röhrchen, Beckmann, München, Deutschland
- Sicherheitswerkbänke
 - BDk Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
 - Clean Air Technik bv, JA Woerden, Holland

- Spectrophotometer DU 640, Beckmann, München, Deutschland
- „TLC-Sampler“ 4, Camag, Berlin, Deutschland
- Ultraturrax, Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
- Ultraschallwasserbad Bransonic, Branson, Danbury/ Connecticut, USA
- UV-Handlampe, Konrad Benda Laborgeräte und UV-Strahler, Wiesloch, Deutschland
- Vakuumpumpe HCL-Haep Labor Consult MP 280, Bovenden, Deutschland
- Vortexer Unimag Zx3 Classic, UniEquip, Martinsried, Deutschland
- Waagen:
 - Mettler PC 4400, Giessen, Schweiz
 - Sartorius CP124S-0CE, Göttingen, Deutschland
- Wasserbad GFL 1083, Burgwedel, Deutschland
- Zentrifugen:
 - Eppendorf Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
 - Eppendorf Zentrifuge 5415 D, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
 - Eppendorf Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
 - Beckmann CPKR Zentrifuge, Beckmann, München, Deutschland
 - Beckmann Ultrazentrifuge Optima TLX 120000rpm, Rotor TLN 100, Beckmann, München, Deutschland
 - Heraeus Labofuge 400e (Zellkultur), Heraeus, Hannau, Deutschland
 - Sorvall RC 5C Plus, Rotor GS-3 mit GS-3-Zentrifugenbecher 9000rpm, Sorvall, Bad Homburg, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

- Agar, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Ampicillin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Bacto-Hefeextrakt, Difco, Detroit/ Michigan, USA
- Bovines Serum-Albumin, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Caesiumchlorid, ICM Biomedicals, Aurora/ Ohio, USA
- Calciumchlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Chloroform, JTBaker, Phillipsburg/ New Jersey, USA

- „Ethylenediaminetetraacetic acid“ (EDTA), Fluka, Buchs, Schweiz
- Essigsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glaswolle, Hasenmüller Labortechnik, Bonn, Deutschland
- Glucose, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Glycin, ICM Biomedicals, Aurora/ Ohio, USA
- HEPES, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- n-Hexan, Merck, Darmstadt, Deutschland
- LiChroprep[®] RP-18 (40-63 µm), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaisers Glyceringelatine, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Magnesiumchlorid, Fluka, Buchs, Schweiz
- Methanol, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumchlorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Natriumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydroxid, KMF Laborchemie, Lohmar, Deutschland
- NBT/ BCIP-Stocklösung, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
- Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Phenol, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- „Phosphate buffered saline“ (PBS) 10x, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Polyisobutylmethacrylat („Plexigum“), Polyscience, Warrington/ Pennsylvania, USA
- Salzsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Stickstoff, Linde Gas, Pullach, Deutschland
- Tris ultra pur, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Tryptone-Peptone, Difco, Detroit/ Michigan, USA
- Tween 20, Fluka, Buchs, Schweiz
- Wasser zur Chromatographie, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Zinkchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- DC-Aluminiumfolien 20x20cm Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt, Deutschland
- DC-Platten 20x20cm Kieselgel 60, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Einfrierröhrchen Cellstar Cryo, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- Einmalkanülen Neolus, Terumo, Eschborn, Deutschland
- Einmalskalpelle Feather, pfm Produkte für die Medizin, Köln, Deutschland
- Einwegspritzen 5ml, 10ml, 20ml, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Gewebekulturplatten mit 6 Vertiefungen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Parafilm M, Pechiney Plastic Packaging, Chicago/ Illinois, USA
- Petrischalen Cellstar 94/ 16mm, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- Petrischale für Bakterienkultur, Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
- Pipettenspitzen
 - Pipettenspitzen 10 µl, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
 - Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl, Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- QuickSeal-Röhrchen (Polyallomer 3,3 ml), Beckmann, München, Deutschland
- Reaktionsgefäße („E-Cup“), Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
- Röhre 15ml und 50ml, Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes/ New Jersey, USA
- Röhre 15ml und 50ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Sterile Einmalpipette 5ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Sterile Einmalpipette 10ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Sterilfilter 20µm- und 45µm-Poren, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Zellkulturflaschen, Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes/ New Jersey, USA
- Zellkulturschalen, Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes/ New Jersey, USA

2.1.4 Glasmaterial

- Bechergläser 50ml, 150ml und 400ml, Schott Duran, Mainz, Deutschland
- Chromatographie-Kammer, Desaga, Heidelberg, Deutschland
- Deckgläser, 12mm und 18mm, Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
- Glasfläschchen („Vial“) und Teflondeckel („Cap“) für Lipide, Chromacol, Herts, UK
- Glaspipetten 5ml, 10ml und 25ml, Brand, Wertheim, Deutschland

- Messzylinder 100ml, Brand, Wertheim, Deutschland
- Messzylinder 500ml und 1000ml, VITLAB, Seeheim-Jugenheim, Deutschland
- Objektträger ca.76x26mm, Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
- Pasteurpipetten aus Glas 5ml, 10ml und 25ml, Brand, Wertheim, Deutschland
- Pyrex-Glasröhrchen, Barloworld Scientific, Staffordshire, UK

2.1.5 Reagenzien für Zellkultur

- Bisbenzimid H 33258, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- „Bovine pituitary extract“ (BPE), upstate biotechnology, Lake Placid/ NY, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- DNase I, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Forskolin, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Gelatine, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- L-Glutamin 200 mM (100x), flüssig, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- „Hank´s balanced salt solution“ (HBSS), Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Insulin, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- „Phosphate-Buffered Saline“ (PBS) 10x, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Penicillin-Streptomycin-Lösung, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Pferdeserum, hitzeinaktiviert, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Poly-L-Lysin (MW> 300 000), Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Trypsin (10x), flüssig, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Zellkulturmedien
 - „Advanced DMEM“, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 - BME, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 - DMEM Nut-Mix F-12, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 - DMEM, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 - Sato-Medium
 - DMEM-Pulver, Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
 - Gentamycin, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland

- HEPES, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Natriumselenium, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Putrescin, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Progesteron, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- L-Thyroxin, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- apo-Transferrin, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Trijodthyronin, Serva, Heidelberg, Deutschland

2.1.6 Antikörper

- Anti-humanes MBP aus Mäusen, Biozol, München, Deutschland
- Anti-GFAP aus Mäusen, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Anti-SulphI-Antikörper aus Mäusen, P. Fredman, Göteborg University, Mölndal, Schweden
- Anti-RIP-Antikörper aus Kaninchen, Sigma-Alderich, Steinheim, Deutschland
- Anti-O4-Antikörper aus Mäusen, Chemicon, Hampshire, UK
- Alexa Fluor 568 anti-Maus-IgG-Antikörper aus Kaninchen, Molecular Probes, Eugene/Oregon, USA
- Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziegen, Molecular Probes, Eugene/Oregon, USA
- Polyklonaler anti-Maus-Antikörper, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

2.1.7 Bakterienkultur

2.1.7.1 Kompetente Bakterien: JM 109

Die kompetenten Bakterien wurden nach Hanahan vorbereitet (Hanahan et al., 1991). JM109 ist ein von E. coli abgeleiteter Bakterienstamm. Er ist bei Promega (Mannheim, Deutschland) erhältlich.

2.1.7.2 LB-Agar-Platten

Zum Giessen der LB-Agar-Platten wurde eine Lösung mit 1 Prozent (w/v) Tryptone-Peptide, 0,5 Prozent (w/v) Bacto-Hefeextrakt und 1 Prozent (w/v) Natriumchlorid angesetzt. Der pH-Wert dieser Lösung mit Natriumhydroxid auf 7,2 eingestellt und anschließend 1,5 Prozent (w/v) Agar zugesetzt. Diese Lösung wurde 20 Minuten dampfsterilisiert und auf 50°C abgekühlt. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 150mg/l hinzugegeben und diese Lösung in Bakterienkulturschalen gegossen.

2.1.7.3 LB-Medium

Das LB-Medium enthielt 1 Prozent (w/v) Tryptone-Peptide, 0,5 Prozent (w/v) Bacto-Hefeextrakt und 1 Prozent (w/v) Natriumchlorid. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid auf 7,2 eingestellt.

2.1.8 DNA: Plasmide

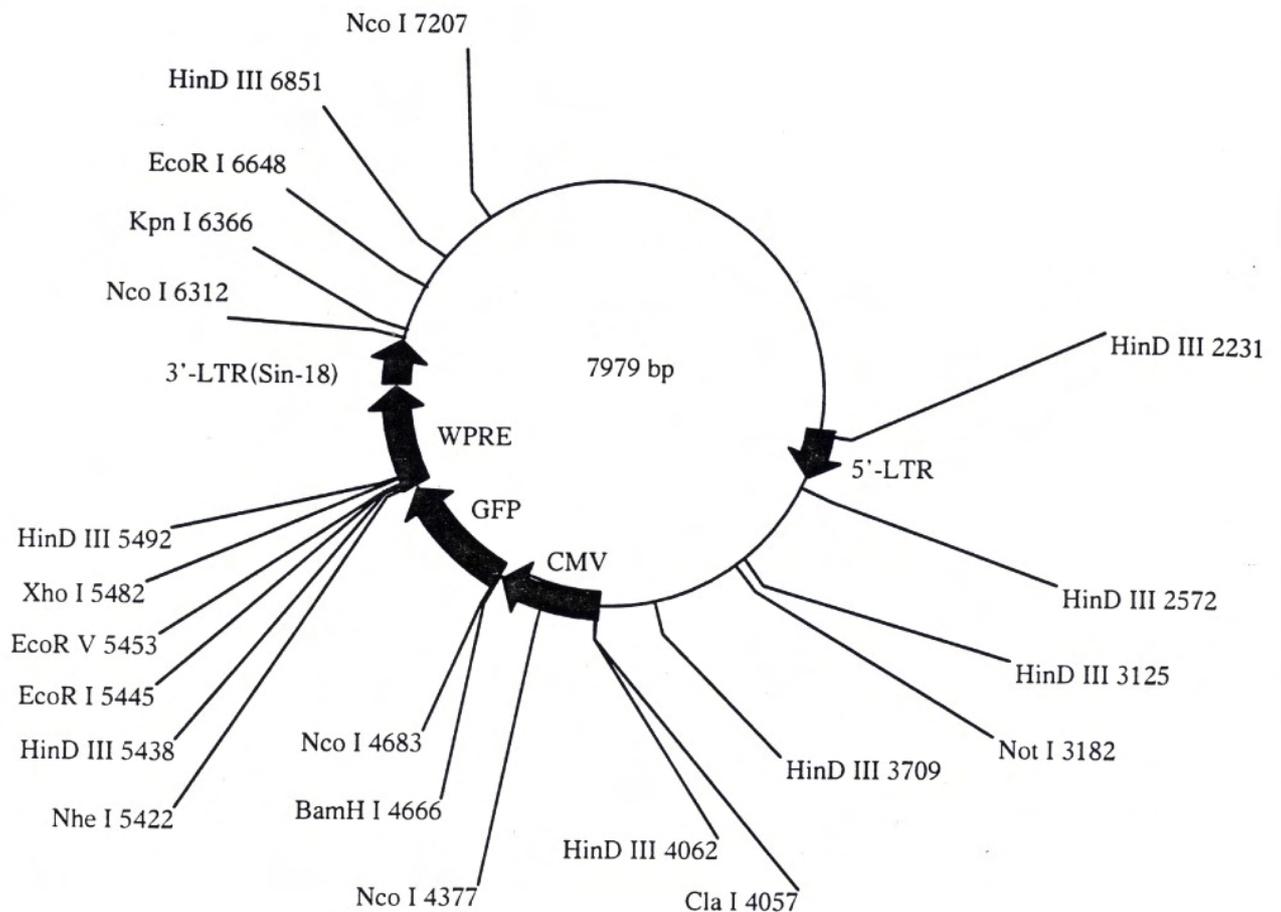
2.1.8.1 Transferplasmide

- pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18
- pRRL-CMV-CST-W-Sin-18
- pRRL-CMV-CGT-IRES-GFP-W-Sin-18

Das Transferplasmid enthielt die Information, die in das Genom der Zielzelle integriert werden sollte. Es wurden drei verschiedene Transferplasmide verwendet. Bei den zu übertragenden Genen handelte es sich dabei erstens um das Gen des „Green fluorescence protein“ (GFP) aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria*, zweitens um das Gen der Cerebrosidsulfotransferase (CST) aus der Maus und drittens um das Gen der Ceramidgalaktosyltransferase (CGT) aus der Ratte, an welches mittels einer IRES-Sequenz das Gen des GFP gekoppelt war (Eckhardt et al., 2002; Hirahara et al., 2000; Stahl et al., 1994). Diese Gene standen alle unter der Kontrolle eines humanen CMV-Promotors und waren eingerahmt von LTR-Sequenzen. pRRL-CMV-CST-W-Sin-18 und pRRL-CMV-CGT-IRES-GFP-W-Sin-18 waren von pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18 abgeleitet (Dull et al.,

1998; Eckardt, 2002, data unpublished). Die cDNA-Sequenz für GFP war entsprechend durch die für CST oder für CGT-IRES-GFP ersetzt.

Abbildung 4: pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18

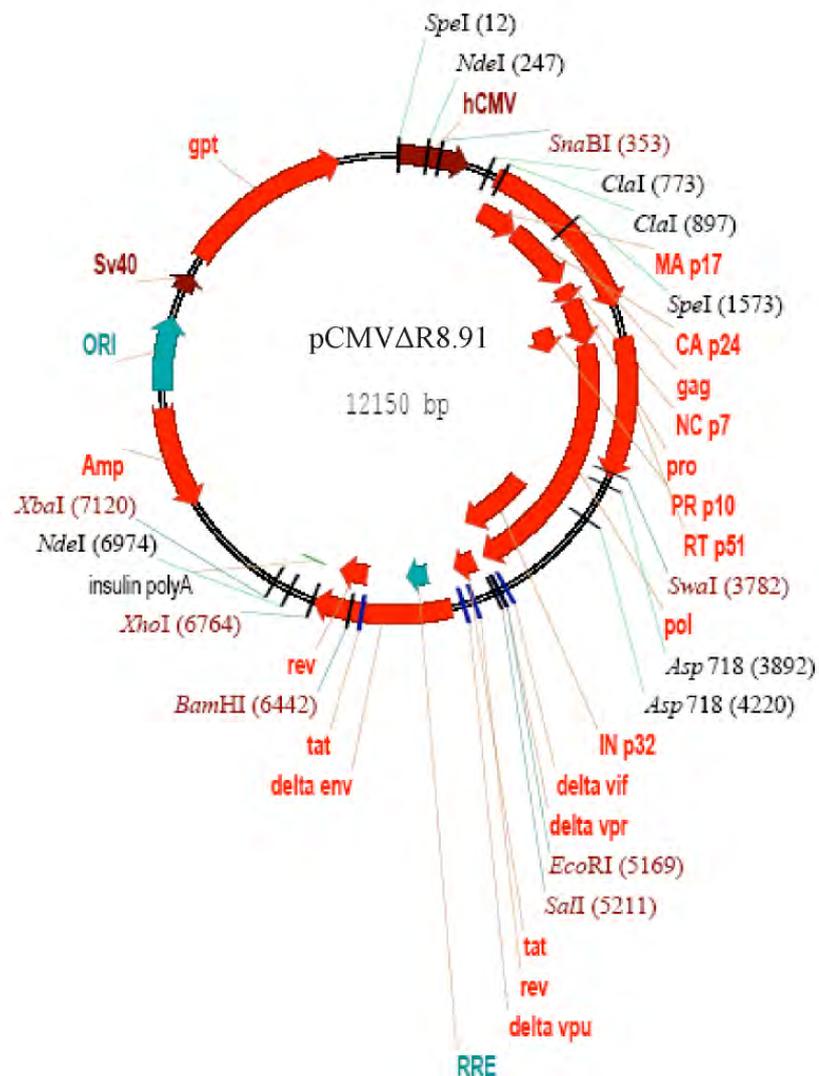


Das Plasmid pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18 kodiert für die cDNA des GFP, welche unter der Kontrolle eines CMV-Promotors steht. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Transferplasmide sind von pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18 abgeleitet. Die cDNA des GFP wurde durch entsprechende Sequenzen ersetzt.

2.1.8.2 Verpackungsplasmid: pCMV Δ R8.93

Das Verpackungsplasmid pCMV Δ R8.93 kodiert für die HIV1-Gene gag, pol und rev. Es war von pCMV Δ R8.91 abgeleitet. Das in pCMV Δ R8.91 vorhandene tat-Gen war in pCMV Δ R8.93 durch 2 Mutationen defekt (Dull et al., 1998).

Abbildung 5: pCMV Δ R8.91



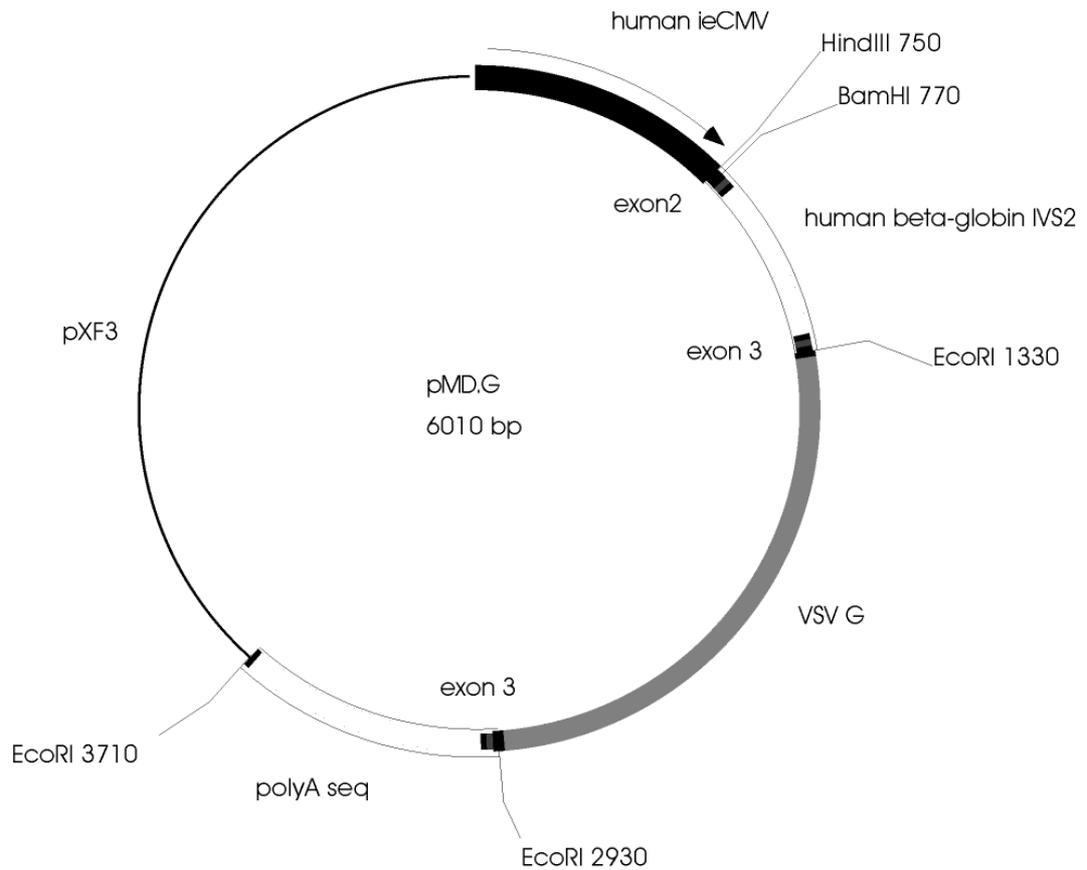
Das Plasmid pCMV Δ R8.93 ist von pCMV Δ R8.91 abgeleitet worden. Das in pCMV Δ R8.91 aktive tat-Gen war in pCMV Δ R8.93 durch Mutation defekt. Es wurden nur die HIV1-Gene gag, pol und rev übertragen und als lentivirale Proteine exprimiert.

2.1.8.3 Hüllplasmid: pMD.G

Das Hüllplasmid kodiert für das VSVG-Protein, das Hüllprotein G des vesikulären Stomatitisvirus. Die Expression wurde durch einen humanen CMV-Promoter kontrolliert.

Das Plasmid war von pXF3 abgeleitet (Blomer et al., 1997; Ory et al., 1996).

Abbildung 6: pMD.G



Das Hüllplasmid kodiert für die cDNA des Hüllproteins. Bei pMD.G handelt es sich um das Hüllprotein G des vesikulären Stomatitisvirus.

2.1.9 Zelllinien

2.1.9.1 HEK293T („Human embryonic kidney“)

HEK293T ist eine von humanen fetalen Nierenzellen abgeleitete Zelllinie. Sie ist bei ATCC (Wesel, Deutschland) erhältlich.

2.1.9.2 CHO-K1 („Chinese hamster ovary“)

CHO-K1 ist eine von Ovarien chinesischer Streifenhamster (*Cricetulus griseus*) abgeleitete Zelllinie (Puck et al., 1958). Sie ist bei ATCC (Wesel, Deutschland) erhältlich.

2.1.9.3 CHO-GalT

CHO-GalT ist eine von CHO-K1 abgeleitete Zelllinie. Sie ist stabil mit der Ceramidgalaktosyltransferase aus Ratten transfiziert und wurde der Arbeitsgruppe freundlicherweise von Brian Popko (Department of Neurology, University of Chicago, USA) zur Verfügung gestellt (Stahl et al., 1994).

2.1.9.4 CHO-SULF

CHO-SULF ist eine von CHO-GalT abgeleitete Zelllinie. Sie ist zusätzlich zur Ceramidgalaktosyltransferase aus Ratten stabil mit der Cerebrosidsulfotransferase aus Mäusen transfiziert und wurde von Matthias Eckhardt (Institut für physiologische Chemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn) freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Eckhardt et al., 2002) .

2.1.9.5 Schwann-Zellen aus ASA-defizienten Mäusen

Die Schwann-Zellen wurden aus dem Nervus ischiadicus Arylsulfatase A-defizienter Mäuse präpariert und von Saravanan Karumbayaram (Institut für physiologische Chemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn) freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Karumbayaram, 2006; Komiyama et al., 2003).

2.1.10 Versuchstiere

2.1.10.1 ASA-defiziente Mäuse

Die für die Primärkulturen verwendeten Mäuse stammen von der von Hess et al. generierten ASA-Knockout-Maus ab (Hess et al., 1996).

2.2 Methoden

2.2.1 Cäsiumchlorid-DNA-Präparation

2.2.1.1 Lösungen

2.2.1.1.1 GTE-Lösung

Die GTE-Lösung enthielt 50mM Glucose, 50mM Tris (pH 8) und 10mM EDTA (pH 8).

2.2.1.1.2 SDS-NaOH-Lösung

Die SDS-NaOH-Lösung enthielt 200mM NaOH und SDS 1-prozentig (w/v).

2.2.1.1.3 Kaliumacetat 5 M pH5,5

Die Kaliumacetat-Lösung enthielt 3M Kaliumacetat und 2M Essigsäure. Der pH-Wert wurde überprüft und mit Essigsäure auf 5,5 eingestellt.

2.2.1.1.4 Natriumchlorid-Tris-Lösung

Die Natriumchlorid-Tris-Lösung enthielt 0,5M Natriumchlorid und 10mM Tris (pH 7,5).

2.2.1.1.5 TE-Puffer

Der TE-Puffer enthielt 50mM Tris-HCl (pH 7,5) und 10mM EDTA.

2.2.1.2 DNA-Präparation

Es wurden 500ml Bakterienkultur für eine Cäsiumchlorid-DNA-Präparation verwendet. Zur Vorbereitung wurde eine Vorkultur mit 5ml LB-Medium mit 500µg Ampicillin und einem gepickten Klon des zu präparierenden Plasmids angelegt. Die Vorkultur wurde 8 Stunden

im Schüttelinkubator bei 37°C und Atmosphäre mit 5 Prozent CO₂ geschüttelt. Dann wurde eine Maxi-Kultur mit 500ml LB-Medium mit 50mg Ampicillin und 5ml Vorkultur angelegt. Die Kultur wurde 12-16 Stunden im Schüttelinkubator bei 37°C und Atmosphäre mit 5 Prozent CO₂ geschüttelt.

Danach wurde die Kultur auf Eis abgekühlt, in zwei GS-3-Becher überführt und mit der Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus (Rotor GS-3) bei 4°C und 7000rpm 15 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 25ml GTE-Lösung mit Lysozym 1mg/ml GTE resuspendiert. Die Suspension wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es wurden 50ml frisch präparierte SDS-NaOH-Lösung zugegeben und eine Minute kräftig geschüttelt bzw. gerüttelt. Dann wurden 37,5ml 5M Kaliumacetat pH 5,5 zugesetzt. Die Suspension wurde 15 Minuten auf Eis stehen gelassen und anschließend 10 Minuten mit der Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus (Rotor GS-3) bei 4°C und 7000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen und durch einen Filter vom Sediment getrennt. Zum Filtrat wurden 2 Volumen Ethanol hinzugegeben und die Lösung 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Danach wurde die Lösung 10 Minuten mit der Zentrifuge Sorvall RC 5C Plus (Rotor GS-3) bei 4°C und 6000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 8ml in Natriumchlorid-Tris-Lösung resuspendiert und in ein 50ml-Röhrchen (Sarstedt) überführt. Es wurde ein Volumen Phenol/ Chloroform (1:1) zugesetzt, geschüttelt und anschließend mit der Zentrifuge Eppendorf 5810 R bei Raumtemperatur und 3000rpm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in neues 50ml-Röhrchen (Sarstedt) überführt und mit einem Volumen Chloroform versetzt und extrahiert. Der Überstand wurde in ein neues 50ml-Röhrchen (Sarstedt) überführt und mit 2 Volumen Ethanol versetzt. Diese Lösung wurde 20 Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend mit der Zentrifuge Eppendorf 5810 R bei Raumtemperatur und 3000rpm 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in 2ml TE-Puffer gelöst.

Der Cäsiumchloridgradient wurde folgendermaßen präpariert:

In ein 15ml-Röhrchen wurden genau 6g Cäsiumchlorid abgewogen und die Waage auf 0 zurückgestellt. Dann wurde die DNA-Lösung hinzugegeben und das Gewicht bis 5,42g mit TE-Puffer aufgefüllt. Zuletzt wurden 0,5g Ethidiumbromid-Lösung mit 10mg/ml hinzugegeben und geschüttelt. Diese Lösung wurde auf 2 OptiSeal-Röhrchen verteilt und verschweißt. Es wurde mit der Beckmann Optima TLX Ultrazentrifuge (Rotor TLN 100)

bei 15°C und 100.000rpm (Dezeleration und Akzeleration 9) über Nacht (mindestens 8 Stunden) zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die Plasmidbande mit Hilfe einer UV-Handlampe sichtbar gemacht und mit einer Kanüle und Einwegspritze abgezogen und in ein 15ml-Röhrchen überführt. Die DNA-Lösung wurde mit einem Volumen destilliertem Wasser verdünnt, um eine Präzipitation des Cäsiumchlorids zu verhindern. Das Ethiumbromid wurde durch Extraktion mit H₂O-gesättigtem Butanol entfernt. Natriumchlorid-Lösung 5M, einem Zehntel des Volumen entsprechend, und 2 Volumen Ethanol wurden zugesetzt und es wurde 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit der Zentrifuge Eppendorf 5810 R bei 4°C und 12.000rpm 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300µl TE-Puffer gelöst und in ein E-Cup überführt. Es wurden vorsichtig 2 Volumen Ethanol hinzugegeben und das E-Cup einmal mit dem Kopf nach unten gekippt. Die ausgefallene DNA wurde mit einer Kanüle „gefischt“, mit 70-prozentigem (v/v) Ethanol gewaschen und in 300µl TE-Puffer aufgenommen.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eingefrorene Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Einfrieren wurden die Zellen pelletiert, in Einfriermedium (siehe 2.2.2.4) aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden über Nacht bei -80°C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff umgelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und kurz im 37°C-Wasserbad inkubiert und entnommen, solange noch ein Teil des Mediums gefroren war. Dann wurden die Zellen mit Medium aus dem Einfrierröhrchen gespült und sedimentiert. Das Zellpellet wurde dann in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturschale ausgesät.

2.2.2.2 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden bei 37°C und wassergesättigter Atmosphäre mit 5 Prozent CO₂ kultiviert.

2.2.2.3 Arbeiten mit Zellen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Die in der Zellkultur verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden alle entweder mit einem Autoklaven sterilisiert oder durch einen Sterilfilter filtriert und stets vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

Vor jedem Passagieren der Zellen wurden diese mit einem Puffer gewaschen. Für alle Zelllinien wurde PBS-Puffer verwendet, für alle primären Zellen HBSS-Puffer. Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA-Lösung mit 0,5g/l Trypsin und 0,2g/l EDTA von den Zellkulturgefäßen gelöst.

2.2.2.4 Zellkulturmedien

Allen Zellkulturmedien wurde L-Glutamin 2mM, Penicillin 100IE/ ml und Streptomycin 100µg/ ml zugesetzt.

Für folgende Zelllinien wurde DMEM Nut-Mix 12 mit 5 Prozent (v/v) FCS als Nährlösung verwendet: HEK 293T, CHO-K1, CHO-GalT und CHO-SULF.

Für primäre Mischkulturen aus Mausgehirnen wurde DMEM mit 10 Prozent bzw. 5 Prozent (v/v) HS als Nährlösung verwendet.

Für primäre Oligodendrozyten wurde Sato-Medium als Nährlösung verwendet, das sich wie folgt zusammensetzte (Trotter et al., 1989):

- | | |
|--------------------------|-------------------|
| • DMEM-Pulver ohne HEPES | 1-prozentig (w/v) |
| • Gentamycin | 25µg/ml |
| • L-Glutamin | 2mM |
| • HEPES | 25mM |
| • Insulin | 10µg/ml |
| • Natriumselenium | 0,22µM |
| • Penicillin | 100IE/ml |
| • Progesteron | 0,2µM |
| • Putrescin | 0,1mM |
| • Streptomycin | 100µg/ml |
| • L-Thyroxin | 0,52µM |
| • apo-Transferrin | 0,1mg/ml |

- Trijodthyronin 0,4 μ M

Für Schwann-Zellen wurde „Advanced DMEM“ mit 10 Prozent FCS (v/v), mit Forskolin in einer Konzentration von 1 μ g/ ml und mit Extrakt aus Rinderhypophysen 67 μ g/ ml Medium als Nährlösung verwendet.

Zum Einfrieren von Zellen wurde Einfriermedium mit folgender Zusammensetzung verwandt:

- 70 Prozent DMEM (v/v)
- 20 Prozent FCS (v/v)
- 10 Prozent DMSO (w/v)

2.2.2.5 Beschichten von Zellkulturschalen und -platten

Bei Kultur primärer Zellen wurden die Zellkulturgefäße beschichtet, um die Haftung der Zellen auf der Oberfläche der Kulturschale zu verbessern. Für primäre Zellen aus Mausgehirnen wurden die Gefäße mit Poly-L-Lysin-Lösung mit einer Konzentration von 0,1mg/ml ungefähr 20 Minuten beschichtet, das Gefäß anschließend zweimal mit destilliertem Wasser und einmal mit HBSS-Puffer gewaschen. Für Schwann-Zellen wurden die Gefäße mit Gelatine-Lösung in einer Konzentration von 0,1 Prozent (w/v) ungefähr 20 Minuten beschichtet, das Gefäß anschließend zweimal mit destilliertem Wasser und einmal mit HBSS-Puffer gewaschen.

2.2.2.6 Färbung von Zellkernen mit Bisbenzimid H

Diese Färbung wurde bei vitalen Zellen eingesetzt. Es wurde eine Stocklösung mit 1mg/ml Bisbenzimid H in destilliertem Wasser vorbereitet. Diese wurde vor Gebrauch 1: 1000 in Medium verdünnt. Die Zellen wurden 20 Minuten mit der Färbelösung inkubiert und dann dreimal mit entsprechendem Puffer gewaschen.

2.2.3 Präparation von Primärkulturen aus Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse

Die Präparation primärer Oligodendrozyten aus den Gehirnen 0 bis 2 Tage alter Mäuse wurde nach dem Protokoll von Penka Pesheva (Klinik für Nuklearmedizin, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn) durchgeführt (Pesheva et al., 1997; Trotter et al., 1989).

Aus den Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse wurden primäre Zellkulturen gewonnen, die zunächst verschiedene Zellarten des zentralen Nervensystems enthielten: Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Nervenzellen überlebten die Prozedur der Präparation nicht (McCarthy und de Vellis, 1980). Diese gemischte Zellkultur wurde durch Schütteln in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia differenziert.

2.2.3.1 Lösungen

2.2.3.1.1 Trypsin-Lösung

Die Trypsin-Lösung setzte sich wie folgt zusammen: Trypsin 1-prozentig (w/v), DNase I 0,1-prozentig (w/v), 1mM EDTA, 0,8mM MgSO₄, 10mM HEPES in HBSS.

2.2.3.1.2 DNase-Lösung

Die DNase-Lösung setzte sich wie folgt zusammen: DNase I 0,05-prozentig (w/v), Glucose 0,25-prozentig (w/v), 10mM HEPES in BME-Medium.

2.2.3.2 Anlegen einer Mischkultur

Vor der Präparation wurde das Präparierbesteck in 70-prozentigem (v/v) Ethanol gelegt. Die Köpfe von neugeborenen, 0 bis 2 Tage alten ASA-Knockout-Mäusen wurden mit einer Schere vom Rumpf abgetrennt, in einer Zellkulturschale gesammelt und zur Desinfektion mit reichlich 70-prozentigem (v/v) Alkohol eingesprüht.

Die Gehirne wurden folgendermaßen aus dem Schädel herauspräpariert:

Zunächst wurde die Kopfhaut kreisrund ausgeschnitten, so dass die noch weiche Schädeldecke und Dura mater frei lag. Die Schädeldecke wurde mit einer Schere in der Mitte aufgetrennt und mit einer Pinzette zur Seite gezupft, so dass das Gehirn sichtbar wurde. Dann wurde das Gehirn mit einem Löffel oder Spatel aus dem Schädel

herausgehoben. Die weiche Hirnhaut wurde unter Lupenkontrolle und mit Kaltlichtlampe abpräpariert. Durch die Lupe waren die Gefäße zu erkennen, die in der Pia mater verlaufen. Durch leichtes Zupfen ließen sich die Gefäße entfernen und die anhängende Pia mater. Die Gehirne wurden in einer Petrischale mit HBSS auf Eis gelagert, bis alle Mäuse präpariert waren.

Anschließend wurden die Kleinhirne abgetrennt und die Großhirne in eine neue Petrischale mit HBSS auf Eis überführt. Dann wurden sie mit einem Skalpell zerkleinert und in ein 15ml-Röhrchen überführt. Die Gewebestücke setzten sich am Boden ab. Der Überstand wurde verworfen und das sedimentierte Gewebe in 1ml 1-prozentiger (w/v) Trypsin-Lösung 12 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 7ml HBSS wurde die Gewebesuspension 8 Minuten bei 600g bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810 R). Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Sediment wurde mit 1ml DNase-Lösung versetzt und durch Auf- und Abpipettieren zunächst mit einer Pasteur-Pipette mit großem Durchmesser, dann mit mittlerem Durchmesser und zum Schluss mit abgeflammter Spitze und kleinem Durchmesser weiter zerkleinert. Das Gemisch stand einige Minuten auf Eis. Die Zellsuspension wurde in ein neues 15ml-Röhrchen überführt, die sedimentierten Gewebestücke wurden nochmals mit 1ml DNase-Lösung versetzt und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden zweimal in DMEM mit 10 Prozent (v/v) HS suspendiert und sedimentiert. Schließlich wurden die gesammelten Zellen in DMEM mit 10 Prozent (v/v) HS aufgenommen, in eine mit Poly-L-Lysin beschichtete Flasche ausgesät und über 7 Tage kultiviert. Das Medium wurde nach 3 und nach 5 Tagen gewechselt. Ab dem 5. Tag war DMEM mit 5 Prozent (v/v) HS ausreichend.

2.2.3.3 Separation der Oligodendrozyten

Nach 7-8 Tagen wurden die Oligodendrozyten von den übrigen Zellen durch Schütteln abgetrennt. Durch kräftiges, 2- oder 3-maliges Klopfen lösten sich die Mikroglia, die von allen Zellen als oberstes auf der Mischkultur saßen. Das Medium mit den Mikroglia wurde verworfen. Danach wurden die Zellen mit 4°C kaltem HBSS in der Zellkulturflasche gewaschen und nach Zugabe von frischem, 4°C kaltem DMEM mit 10 Prozent (v/v) HS 30mal kräftig geschüttelt. Dabei wurde die Flasche leicht schräg gehalten. Die Oligodendrozyten, die sich in der Mischkultur auf den Astrozyten ansiedeln, und auch einige Astrozyten lösten sich und konnten mit dem Medium abgenommen werden. In der

Kulturschale verblieben vor allem die Astrozyten, die in einer konfluenten Schicht auf dem Boden der Schale wuchsen, und auch einige Oligodendrozyten. Die abgeschüttelten, „schwimmenden“ Oligodendrozyten wurden mit dem Medium abgenommen und durch Zentrifugation mit der Heraeus Labofuge 400e, 8 Minuten bei 600rpm, sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in DMEM mit 10 Prozent (v/v) HS aufgenommen und 15-30 Minuten in einer unbeschichteten Zellkulturschale bei 37°C und 5 Prozent CO₂ inkubiert, um im Medium enthaltene Astrozyten von den Oligodendrozyten abzutrennen. Die im Medium schwimmenden Oligodendrozyten wurden dann wiederum abzentrifugiert (8 Minuten bei 600rpm, Heraeus Labofuge 400e) und in Sato-Medium aufgenommen. Dann wurden die Zellen in Poly-L-Lysin-beschichteten Schalen oder Platten, mit oder ohne Deckgläser (Durchmesser 12mm) mit einer Zellzahl von 100.000 bis 200.000 Zellen pro ml Medium ausgesät.

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung fixierter Zellen

Die Zellen wurden auf Deckgläsern in Zellkulturplatten ausgesät und für ein bis mehrere Tage kultiviert. Dann wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1ml 3-prozentigem (w/v) Paraformaldehyd und Inkubation 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit 2ml PBS gewaschen und 10 Minuten mit 2ml 50mM Ammoniumchlorid in PBS inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals zweimal mit 2ml PBS gewaschen.

Unspezifische Proteinbindungstellen der fixierten Zellen wurden durch Inkubation entweder 30 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit 2ml 1-prozentigem (w/v) BSA in PBS blockiert.

Für intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbungen (GFAP, MBP und RIP) wurden die Zellen permeabilisiert. Hierbei wurden die Zellen zweimal exakt 5 Minuten mit 1ml 0,3-prozentigem (v/v) Triton X-100 bei Raumtemperatur inkubiert und zweimal mit 2ml PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen dreimal je 5 Minuten in 2ml 1-prozentigem (w/v) BSA in PBS inkubiert. Bei Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen der Zellmembran (Sulfatid und O4) wurde nicht permeabilisiert.

Zur Bindung des ersten Antikörpers wurde dieser in 1-prozentigem (w/v) BSA in PBS verdünnt. Für die einzelnen Primärantikörper galt folgendes:

- anti-O4-Antikörper 1: 100
- anti-RIP-Antikörper 1: 100
- anti-MPB-Antikörper 1: 100
- anti-SulphI-Antikörper 1: 100
- anti-GFAP-Antikörper 1: 400.

Diese Lösung wurde 5 Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C in der Zentrifuge Eppendorf 5417 R zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte in einer „feuchten Kammer“: Parafilm wurde auf feuchtem Zellstoff in einer Petrischale ausgelegt, 50µl der Antikörperlösung wurde auf den Parafilm pipettiert und das Deckglas mit den fixierten Zellen nach unten auf den Tropfen Antikörperlösung gelegt. Die Petrischale wurde zum Schutz vor Verdunstung geschlossen. Die Inkubation erfolgte 3 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Deckgläser zurück in die Zellkulturplatte gelegt und dreimal je 5 Minuten mit 2ml 1-prozentiger (w/v) BSA in PBS inkubiert.

Zur Bindung des zweiten Antikörpers wurde dieser in 1-prozentigem (w/v) BSA in PBS verdünnt. Für die einzelnen Sekundärantikörper galt folgendes:

- Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen-IgG-Antikörper aus Ziegen 1: 200
- Alexa Fluor 568 anti-Maus-IgG-Antikörper aus Kaninchen 1: 200

Diese Lösung wurde 5 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C in der Zentrifuge Eppendorf 5417 R zentrifugiert. Die Inkubation erfolgte wieder in der „feuchten Kammer“. Zum Schutz der Sekundärantikörper vor Verblässen wurde die Petrischale zusätzlich mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Inkubation erfolgte 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Deckgläser zurück in die Zellkulturplatte gelegt und dreimal je 5 Minuten mit 2ml 1-prozentiger (w/v) BSA in PBS inkubiert.

Abschließend wurden die Deckgläser zweimal je 5 Minuten mit 2ml PBS inkubiert und dreimal in destilliertes Wasser getaucht. Die Deckgläser wurden getrocknet und dann mit Kaisers Gelatine eingebettet. Dazu wurde die Gelatine auf 45°C erwärmt, 10µl auf einen Objektträger pipettiert und das Deckglas sanft mit den Zellen nach unten auf dem Objektträger angedrückt. Die Präparate wurden über Nacht zur Polymerisation bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und weiter bei 4°C gelagert.

2.2.5 Transfektion von HEK293T-Zellen zur Herstellung von lentiviralen Vektoren

Zur Produktion der lentiviralen Vektoren wurde eine Calcium-Phosphat-Transfektion mit HEK293T-Zellen nach dem Protokoll von Andreas Ooka, Department of Molecular Medicine and Gene Therapy, Lund University, Schweden, durchgeführt.

2.2.5.1 Lösungen

2.2.5.1.1 HeBS-Puffer

Der HeBS-Puffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

- NaCl 0,28M
- HEPES 0,05M
- Na₂HPO₄ 1,5M
- H₂O zur Chromatographie, Merck

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,00 eingestellt. Eine genaue Einstellung des pH-Wertes war erforderlich, da bei Werten unter 6,95 oder über 7,05 sich die Transfektionseffizienz durch zu geringe oder zu ausgeprägte Präzipitation des Gemisches verschlechterte. Der Puffer wurde bei –20°C gelagert.

2.2.5.2 Transfektionsprotokoll

Zur Transfektion wurden HEK 293T-Zellen verwendet.

Die Zellen wurden am Morgen des ersten Tages mit 2 Millionen Zellen pro Zellkulturschale (Greiner, 96mm) ausgesät. Die Kultur erfolgte mit DMEM Nut-Mix 12 mit 5 Prozent (v/v) FCS.

Am zweiten Tag wurden die Zellen 1:1 geteilt und in zwei Schalen ausgesät (je nach Versuch wurde auch nur eine Schale ausgesät).

Am dritten Tag wurden die Zellen transfiziert. Das Transfektionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

- 20µg Transferplasmid
- 15µg Verpackungsplasmid
- 5µg Hüllplasmid

Das DNA-Gemisch wurde mit sterilem H₂O (zur Chromatographie, Merck) bis 250µl aufgefüllt. Dann wurden 250µl Calciumchlorid 0,5M hinzugeben. Dieses Gemisch wurde anschließend Tropfen für Tropfen unter ständigen Rütteln („Vortexen“) zu 500µl HeBS-Puffer gegeben. Es blieb für 25 Minuten stehen (mindestens 20 und maximal 30 Minuten). In dieser Zeit wurde das Medium auf den zu transfizierenden Zellen gewechselt. Es wurde die zehnfache Menge des Transfektionsgemisches als Medium eingesetzt, also 10ml. Nach Ablauf der 25 Minuten wurde das präzipitierte Gemisch gleichmäßig im Medium verteilt.

Am vierten Tag wurde das Medium gewechselt.

Am fünften und am sechsten Tag wurde das Medium der transfizierten HEK293T-Zellen, welches die produzierten Viruspartikel enthielt, gesammelt, 10 Minuten bei Raumtemperatur und 2500g zentrifugiert, durch einen 0,45µm-Filter steril filtriert und dann direkt zur Transduktion anderer Zellen, z.B. primärer Schwann-Zellen, verwendet.

2.2.5.3 Transduktion von Zellen mit lentiviralen Vektoren

Unter Transduktion versteht man die Überführung von Teilen der DNA eines Donors in das Genom eines Rezipienten durch temperente oder virulente Phagen. Als Phage diente hier der mittels Transfektion der HEK293T-Zellen hergestellte lentivirale Partikel.

Am ersten Tag wurden die zu transduzierenden Zellen ausgesät, z.B. HEK293T-Zellen in Gewebekulturschalen mit 6 Vertiefungen, 300.000 Zellen pro Vertiefung.

Am zweiten Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt und zur Hälfte durch frisches Medium und zur anderen Hälfte durch Viruspartikel-haltiges Medium der HEK293T-Zellen ersetzt. Diesem Gemisch wurde außerdem Polybren in einer Konzentration von 9µg/ml zugegeben.

Am dritten Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt.

Am fünften Tag des Experiments wurde dann der Anteil der GFP-positiven Zellen bestimmt. HEK293T-Zellen wurden danach verworfen, alle anderen Zelllinien und primäre Zellen wurden weiter kultiviert, an verschiedenen Tagen erneut im Fluoreszenzlicht kontrolliert und schließlich zur Lipidextraktion abgeerntet.

2.2.6 Extraktion von Lipiden aus Zellen

2.2.6.1 Vorbereitung von LiChroprep[®] RP-18

Die LiChroprep[®] RP-18-„Kügelchen“ wurden zunächst in 2 Volumen Chloroform/ Methanol (2:1) suspendiert und dann 30 Minuten gerührt. Anschließend wurden sie sedimentiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurden die Kügelchen mit 2 Volumen Methanol gewaschen und in Methanol bei 4°C gelagert.

2.2.6.2 Lipidextraktion

Die Zellen zur Lipidextraktion wurden zunächst von der Zellkulturschale gelöst, gezählt und pelletiert.

Zu diesem Pellet wurden 1ml Methanol und 2ml Chloroform (Methanol/ Chloroform 1:2) hinzugegeben. Die Suspension wurde in ein Pyrex-Röhrchen überführt und mithilfe des Ultraturrax zerkleinert. Dieses Homogenisat wurde danach in einem Reacti Therm „Heating and Stirring Module“ mit einem kleinen Rührfisch für 4 Stunden bei 60°C gerührt. Durch Zentrifugation, 10 Minuten mit 1300rpm bei 4°C, wurde unlösliches Material sedimentiert, der Überstand wurde in einem frischen Pyrex-Röhrchen gesammelt und das Sediment erneut extrahiert. Dafür wurden 1ml Methanol und 1ml Chloroform (Methanol/ Chloroform 1:1) hinzugegeben. Die Suspension wurde wieder im Reacti Therm „Heating and Stirring Module“ mit einem kleinen Rührfisch für 4 Stunden bei 60°C gerührt. Durch Zentrifugation, 10 Minuten mit 1300rpm bei 4°C, wurde unlösliches Material sedimentiert, der Überstand wurde abgenommen und mit dem Überstand der ersten Extraktion vereinigt. Dieses Extrakt wurde im 60°C-Wasserbad erhitzt und unter Einblasen von Stickstoff eingedampft.

Die Lipide wurden in 2,5ml Methanol aufgenommen und 5 Minuten im Ultraschallwasserbad gelöst. Dann wurden 62,5µl 4M Natriumhydroxid zur Verseifung der Triglyceride und Phospholipide hinzugegeben. Diese Lösung wurde im Reacti Therm „Heating and stirring module“ mit einem kleinen Rührfisch 2 Stunden bei 37°C gerührt. Die Hydrolyse wurde anschließend durch Zugabe von 10µl Essigsäure gestoppt und die Lösung erneut im 60°C-Wasserbad erhitzt und unter Einblasen von Stickstoff eingedampft. Die Lipide wurden in 1ml Methanol aufgenommen und 5 Minuten im Ultraschallwasserbad gelöst.

Zur Entsalzung wurden die Lipide auf eine folgendermaßen präparierte Säule gegeben (Schwarz et al., 1997; van Echten-Deckert, 2000): Eine Pasteurpipette wurde mit Glaswolle gestopft. In Methanol gelagerte LiChroprep[®] RP-18-„Kügelchen“ wurden resuspendiert und auf die Glaswolle pipettiert. Die Säule wurde anschließend zweimal mit 1ml 0,1M Chloroform/ Methanol/ Kaliumchlorid (3: 48: 47) gewaschen. Die Lipidlösung wurde mit 1ml 300mM Ammoniumacetat versetzt und anschließend auf die Säule gegeben. Das Pyrex-Röhrchen wurde zweimal mit je 0,5ml Methanol/ 200mM Ammoniumacetat (1:1) gewaschen und die Lösung auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule sechsmal mit je 1ml destilliertem Wasser gespült. Danach wurde ein frisches Pyrexröhrchen unter die Säule gestellt.

Zur Elution der Lipide wurde dann zunächst 1ml Methanol, dann sechsmal je 1ml Chloroform/ Methanol (1:1) auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde im 60°C-Wasserbad erhitzt und unter Einblasen von Stickstoff eingedampft. Die eingedampften Lipide wurden abschließend in 150µl Chloroform/ Methanol (1:1) gelöst und in ein Glasfläschchen mit Teflondeckel überführt. Die Lipide wurden bei -20°C gelagert.

2.2.7 Dünnschichtchromatographie (DC)

2.2.7.1 Lösung zur Färbung von DC-Platten

Die Lösung zur Färbung von Dünnschichtchromatographie-Platten enthielt 625mM Kupfersulfat und 9,4 Prozent (v/v) konzentrierte Phosphorsäure (85-prozentig, v/v) (Yao und Rastetter, 1985).

2.2.7.2 Auftrennen von Lipiden auf DC-Platten

Die Dünnschichtchromatographie wurde angewandt zur Analyse der extrahierten Lipide.

Die Lipide wurden zu diesem Zweck mithilfe des „TLC-Sampler“ von Camag auf eine DC-Platte 20x20cm Kieselgel 60 aufgetragen. Bei einer ersten DC wurden 30µl der Lipidlösung aufgetragen. Bei weiteren DCs wurden die aufgetragenen Lipidmengen anhand der Cholesterinfraktion der ersten DC verglichen und in der Menge einander angepasst.

Die beladene Platte wurde in eine Chromatographiekammer mit Laufmittel gestellt. Als Laufmittel wurden Chloroform, Methanol und destilliertes Wasser im Verhältnis 35: 15: 2

verwendet. Die Platte wurde aus der Kammer genommen, wenn das Laufmittel bis ungefähr 2cm unter den Plattenrand gelaufen war, dann kurz bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend großzügig mit Färbelösung eingesprüht. Die Platte wurde erneut kurz mit einem Fön getrocknet, dann 7 Minuten bei 180°C inkubiert und abschließend eingelesen.

2.2.8 Immundetektion von Sulfatid auf DC-Aluminiumfolien

Dieses Verfahren wird im Englischen als „thinlayerchromatogram-overlay“, kurz „TLC-overlay“, bezeichnet. Das Protokoll wurde modifiziert nach Bethke et. al. (Bethke et al., 1986).

2.2.8.1 Lösungen

2.2.8.1.1 BCIP/ NBT-Lösung

Zum Ansetzen der Färbelösung wurden 200µl der NBT/ BCIP-Stocklösung in 10ml in Färbepuffer mit 0,1M Tris-HCl (pH 9,5), 0,1M NaCl und 0,05M MgCl₂ verdünnt.

2.2.8.1.2 „Plexigum“ 0,3-prozentig (w/ v)

Polyisobutylmethacrylat („Plexigum“) wurde zunächst in Chloroform gelöst, 3g in 100ml. Kurz vor Gebrauch wurde diese Lösung dann 1:10 in n-Hexan verdünnt.

2.2.8.2 Immundetektion

Die Dünnschichtchromatographie wurde für die Immundetektion mit DC-Aluminiumfolien 20x20cm Kieselgel 60 durchgeführt. Die Lipide wurden mit dem „TLC-Sampler“ von Camag aufgetragen, eine Standardlipidlösung an beiden Rändern der DC-Platte. Die beladene Platte wurde in eine Chromatographiekammer mit Laufmittel gestellt. Als Laufmittel wurden Chloroform, Methanol und destilliertes Wasser im Verhältnis 35: 15: 2 verwendet. Die Platte wurde danach bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die beiden äußeren Spuren mit der Standardlipidlösung abgetrennt und entwickelt. Dann wurden die Spuren wieder an die DC-Platte angelegt und der Bereich der gesuchten Lipide sparsam ausgeschnitten. Dieser Teil der DC-Platte wurde nachfolgend weiterverarbeitet. Er wurde zweimal eine Minute mit 0,3-prozentiger (w/v) „Plexigum“-Lösung gewaschen, zwischendurch kurz mit einem Fön getrocknet, dann 1 Stunde bei 55°C getrocknet und

anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur in Tris-HCl-Puffer 200mM (pH 7,5) inkubiert. Die Platte wurde erneut kurz mit einem Fön getrocknet und eine Stunde bei Raumtemperatur in 2-prozentiger (w/v) BSA und 0,05-prozentigem (v/v) Tween 20 in PBS inkubiert.

Nach kurzem Trocknen wurde die Platte mit dem ersten Antikörper (anti-SulphI-Antikörper) 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wurde 1: 50-150 (anti-SulphI-Antikörper 1: 100) verdünnt in 2-prozentiger (w/v) BSA und 0,05-prozentigem (v/v) Tween 20 in PBS. Danach wurde die Platte dreimal mit PBS für je 15 Minuten gewaschen und zwischendurch kurz mit einem Fön getrocknet.

Der zweite Antikörper (anti-Maus-Antikörper, mit alkalischer Phosphatase gekoppelt) wurde 1½ Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wurde 1: 250 verdünnt in 2-prozentiger (w/v) BSA und 0,05-prozentigem (v/v) Tween 20 in PBS. Danach wurde die Platte viermal mit PBS für je 10 Minuten gewaschen und zwischendurch kurz bei Raumtemperatur getrocknet. Die Platte wurde in NBT/ BCIP-Färbelösung wenige Minuten bis über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und entwickelt.

Die Teile der DC-Aluminiumfolie, die nicht zur Immundetektion dienten, wurden mit DC-Färbelösung entwickelt.

3 Ergebnisse

3.1 Primäre Zellkulturen

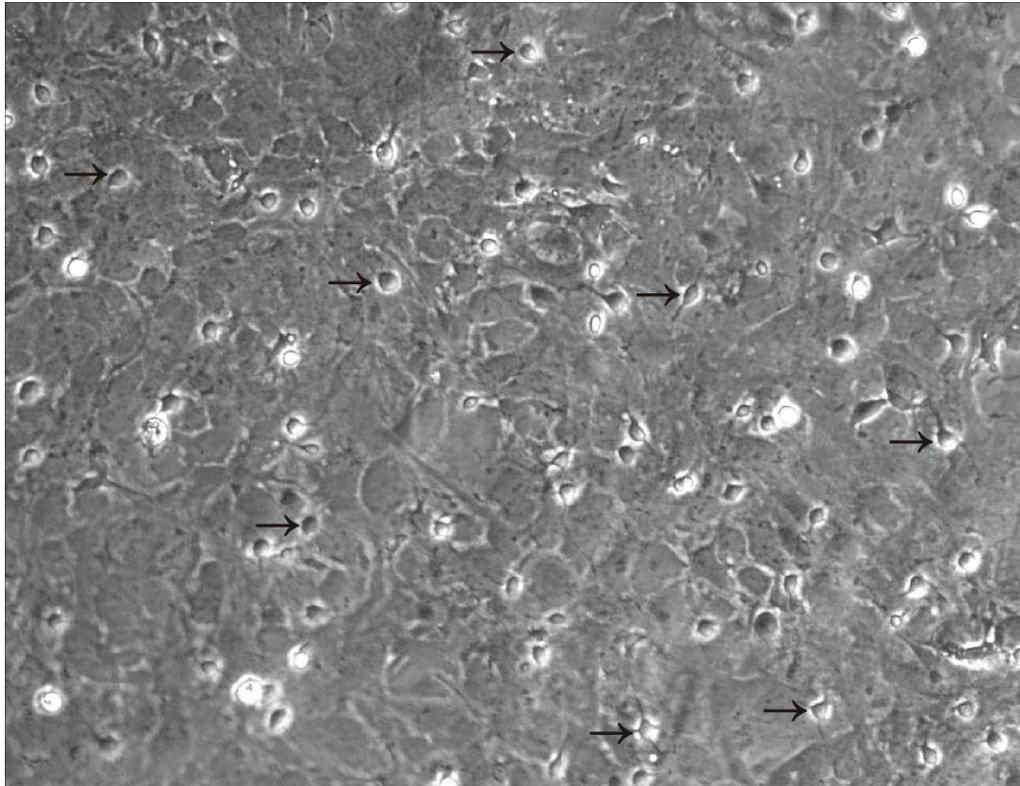
3.1.1 Oligodendrozyten

Die Präparation der Oligodendrozyten war die Grundlage für weiterführende Experimente. Aus den Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse wurde eine Mischkultur präpariert, die Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia enthielt. Diese Kultur wurde nach 7 bis 8 Tagen durch ein manuelles Verfahren mit nacheinanderfolgender Lösung der Zellarten durch kontrollierte Erschütterung der Zellkulturflasche getrennt. Die präparierten Oligodendrozyten wurden durch Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert und von einzelnen, in der Kultur enthaltenen Astrozyten unterschieden. Durch Transduktion mit lentiviralen Vektoren sollten die ASA-Knockout-Oligodendrozyten zur Sulfatid-Speicherung gebracht werden. Eine Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie sollte erfolgen.

3.1.1.1 Präparation der Oligodendrozyten

Die Präparation der primären Kulturen wurde nach obigem Protokoll durchgeführt. Die frisch präparierte Kultur wurde in eine mit Poly-L-Lysin-beschichtete 75cm²-Flasche von Falcon ausgesät. Diese gemischte Zellkultur war nach ungefähr 6 Tagen konfluent.

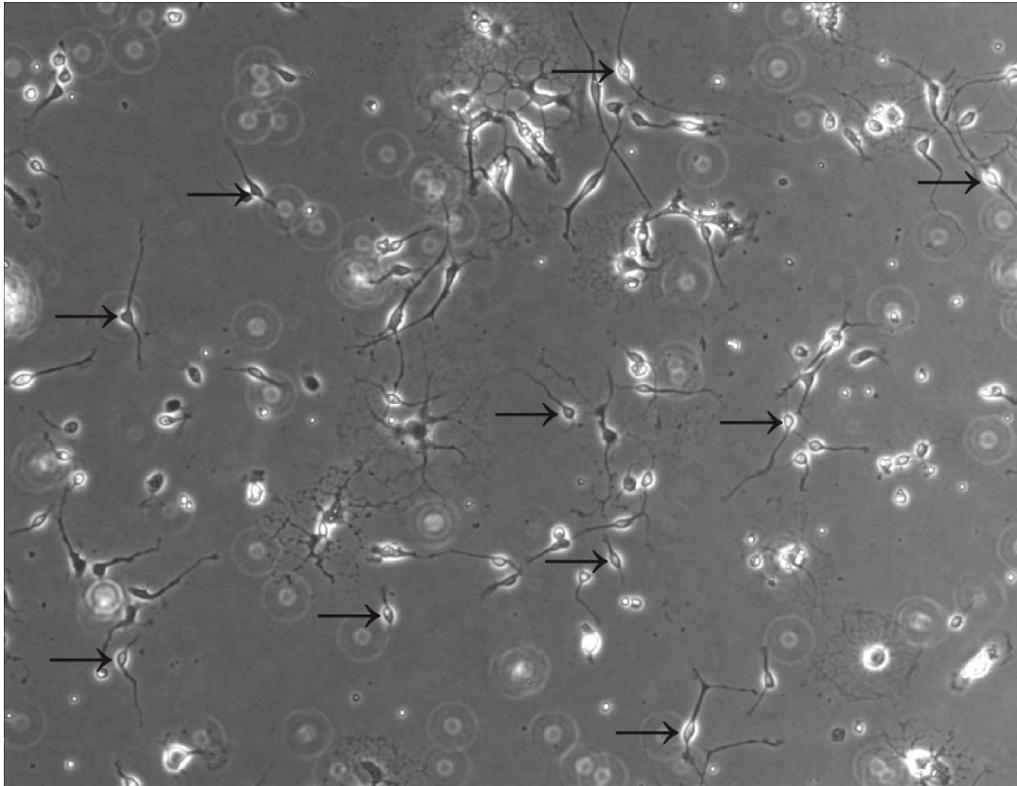
Abbildung 7: Primärkultur aus den Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse



Mischkultur aus Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia 10 Tage nach Präparation; einzelne, an ihrer Morphologie erkennbare Oligodendrozyten sind mit Pfeilen markiert.

7 bis 8 Tage nach Präparation wurden die verschiedenen Zelltypen durch kontrolliertes Schütteln der Zellkulturflasche getrennt. Die Mikroglia wurden verworfen, die Oligodendrozyten wurden für weitere Versuche auf Deckgläser oder in Zellkulturplatten mit 100.000 Zellen pro μl Medium ausgesät und die Astrozyten wurden entweder weiterkultiviert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Abbildung 8: Oligodendrozyten (3 Tage nach Abschütteln)



Zu sehen sind Oligodendrozyten, 10 Tage nach Präparation der Primärkultur aus Gehirnen neugeborener Mäuse, 3 Tage nach Herausschütteln der Oligodendrozyten aus der gemischten Kultur; einzelne Oligodendrozyten sind mit Pfeilen markiert.

3.1.1.2 Zellausbeute

Die Präparation der primären Mischkulturen erfolgte 0 bis 2 Tage nach der Geburt der Mäuse. Es wurden stets möglichst viele Mäuse zur gleichen Zeit präpariert, bis zu 35 Tiere in einer Präparation, aus ein bis mehreren Würfen. Es mussten mindestens 5 Tiere zur Verfügung stehen. Die Zahl der isolierten Oligodendrozyten, die im Durchschnitt aus einer präparierten Maus generiert wurden, variierte sehr stark zwischen 2 333 und 916 666 Zellen. Unten stehende Tabelle gibt einen Überblick über die einzelnen Präparationen.

Tabelle 1: Übersicht über die für Primärkulturen präparierten ASA-Knockout-Mäuse und die aus den primären Mischkulturen abgeschüttelten Oligodendrozyten

	Präparierte Mäuse	Zellzahl der abgeschüttelten Oligodendrozyten pro Präparation	Zellzahl der abgeschüttelten Oligodendrozyten pro präparierte Maus
	18	6 700 000	372 222
	10	230 000	23 000
	6	5 500 000	916 666
	9	270 000	30 000
	10	300 000	30 000
	9	21 000	2 333
	9	2 160 000	240 000
	8	150 000	18 750
	5	100 000	20 000
	28	127 000	4 535
	6	150 000	25 000
	8	650 000	81 250
	15	1 500 000	100 000
	17	2 200 000	129 411
	21	2 000 000	95 238
	25	1 700 000	68 000
	12	800 000	66 666
	22	450 000	20 454
	35	2 800 000	80 000
Summe	273	27 808 000	/
Mittelwert	14,4	1 463 578	73 024
Standardabweichung	/	/	212 696,72

3.1.1.3 Immunfluoreszenzfärbung der Oligodendrozyten

Die isolierten Oligodendrozyten wurden durch Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert. Es wurden O4, RIP, MBP und Sulfatid als Marker für Oligodendrozyten untersucht, um den Anteil der Oligodendrozyten in der Kultur und deren Differenzierungsgrad zu bestimmen.

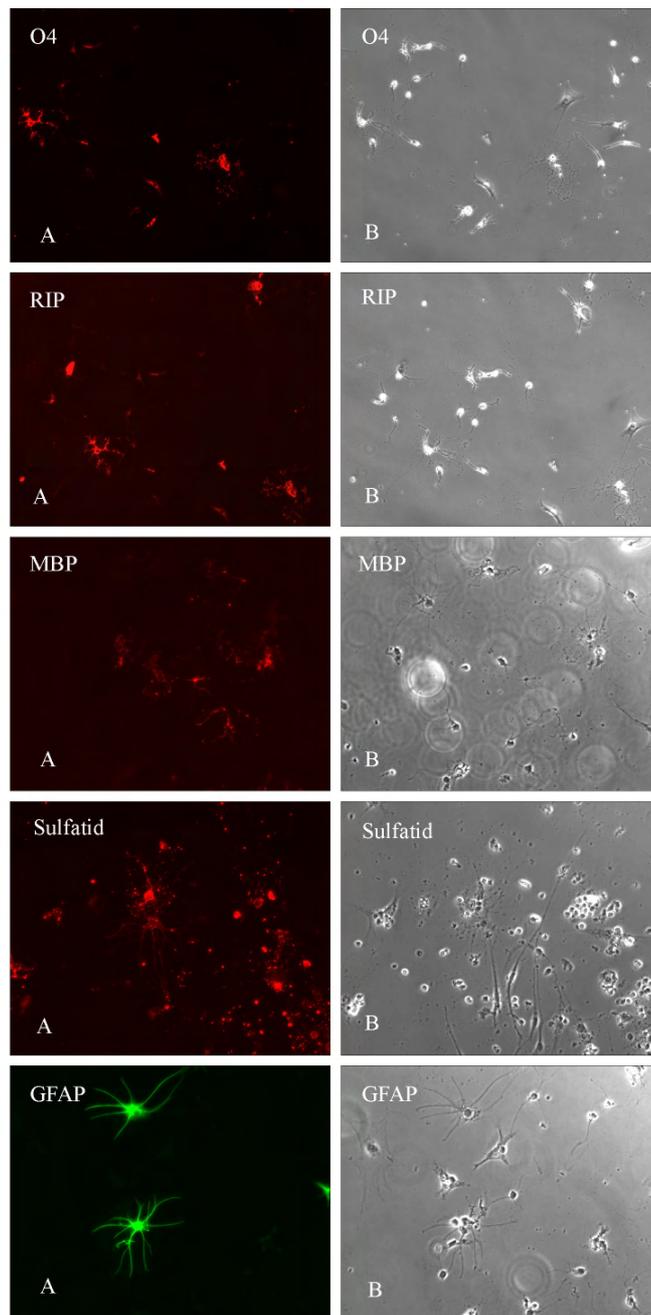
Tabelle 2: Oberflächenmarker von Oligodendrozyten (Baumann und Pham-Dinh, 2001)

Entwicklungsstadium	Oberflächenmarker
Oligodendrozyten-Precursor	CNP, DM-20, PSA-NCAM, PDGFR α
Oligodendrozyten-Progenitor	CNP, DM-20, A2B5, PDGFR α
Prä-Oligodendrozyt	CNP, DM-20, O4 , A2B5, PDGFR α
Unreifer Oligodendrozyt	CNP, DM-20, O4 , RIP , GalC
Nicht-myelinisierender, reifer Oligodendrozyt	CNP, DM-20/ PLP, O4 , RIP , GalC, MBP , MAG
Myelinisierender, reifer Oligodendrozyt	CNP, DM-20, O4 , RIP , GalC, MBP , MAG

Fettgedruckt sind die Marker, die durch Immunfluoreszenzfärbung untersucht wurden; ebenfalls untersucht wurde Sulfatid, ein früher Marker, der auf der Oberfläche des reifen Oligodendrozyten nachweisbar bleibt (Baumann und Pham-Dinh, 2001).

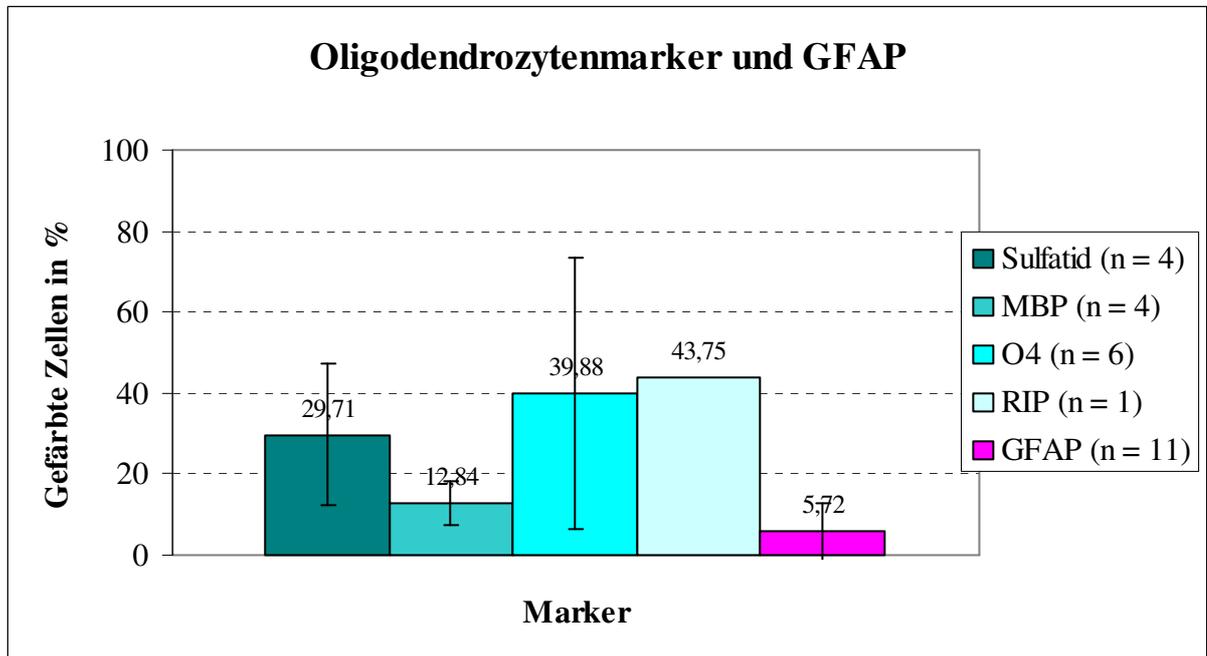
GFAP ist ein Filamentprotein des Zytoskeletts, spezifisch für Astrozyten, und wurde hier zur Identifikation einzelner Astrozyten eingesetzt, die bei der Prozedur des Abschüttelns auch immer in geringer Zahl in die Oligodendrozytenkultur gelangt sind.

Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung der Oligodendrozytenkulturen



Oligodendrozyten wurden auf Deckgläser in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät (50 000 Zellen pro Vertiefung), 6 Tage kultiviert, fixiert und gefärbt; die Färbung wurde mit Anti-O4-, Anti-RIP-, Anti-MBP-, Anti-Sulfatid- und Anti-GFAP-Primär-Antikörpern und Alexa-Sekundär-Antikörpern durchgeführt; O4, RIP, MBP und Sulfatid sind Oligodendrozyten-Marker, GFAP ist ein Astrozyten-Marker; A: Immunfluoreszenz, rot bei 546nm, grün bei 470nm, B: Phasenkontrast.

Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung der Oligodendrozytenkulturen – Auswertung



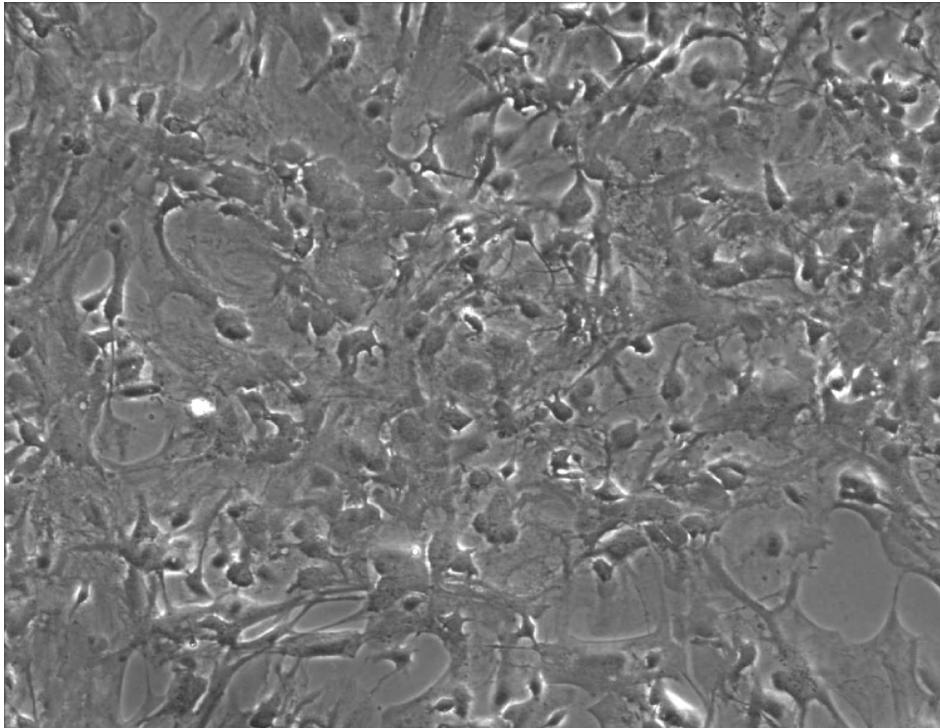
Es wurden alle Zellen und die gefärbten Zellen gezählt und in Relation gesetzt; n ist die Zahl der ausgezählten Deckgläser; Sulfatid, MBP, O4 und RIP sind Oligodendrozytenmarker, GFAP kennzeichnet Astrozyten.

Im Mittel zeigten 29,71 % der Zellen Sulfatid, 12,84 % der Zellen MBP und 39,88 % der Zellen O4. Durchschnittlich 5,72 % der Zellen waren GFAP-positiv und damit Astrozyten. Das MBP spricht für das Vorhandensein reifer Oligodendrozyten, O4 und RIP treten schon bei unreifen Oligodendrozyten auf.

3.1.2 Astrozyten

Aus den Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse wurden primäre Zellkulturen hergestellt, die sowohl Mikroglia, Astrozyten, als auch Oligodendrozyten enthielten. Diese Mischkultur wurde nach 7 bis 8 Tagen „abgeschüttelt“, um Oligodendrozytenkulturen zu gewinnen. Die verbliebene Kultur enthielt nach mehrfacher Passage fast ausschließlich Astrozyten, die teilungsfähig blieben und ein schnelleres Wachstum als Oligodendrozyten zeigten. Oligodendrozyten differenzierten ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren und waren nach mehrfacher Passage nur noch vereinzelt vorhanden.

Abbildung 11: Astrozyten

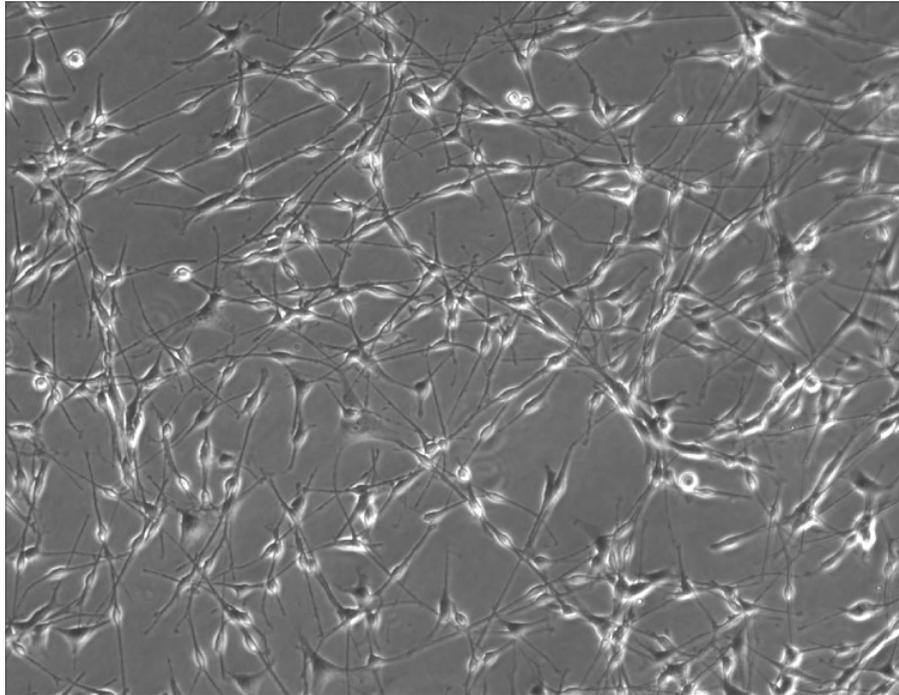


Aus der primären Mischkultur wurde nach „Abschütteln“ und mehrfacher Passage eine fast reine Astrozytenkultur gewonnen.

3.1.3 Schwann-Zellen

Die Schwann-Zellen wurden von Saravanan Karumbayaram (Institut für physiologische Chemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn) aus ASA-defizienten Mäusen präpariert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Karumbayaram, 2006). Aus den primär präparierten Zellen war durch spontane Immortalisierung eine Zelllinie gewonnen worden (Eccleston et al., 1991).

Abbildung 12: Schwann-Zellen



Zu sehen sind ASA-defiziente Schwann-Zellen. Sie wurden aus ASA-Knockout-Mäusen präpariert und durch spontane Immortalisierung wurde eine Zelllinie gewonnen (Karumbayaram, 2006).

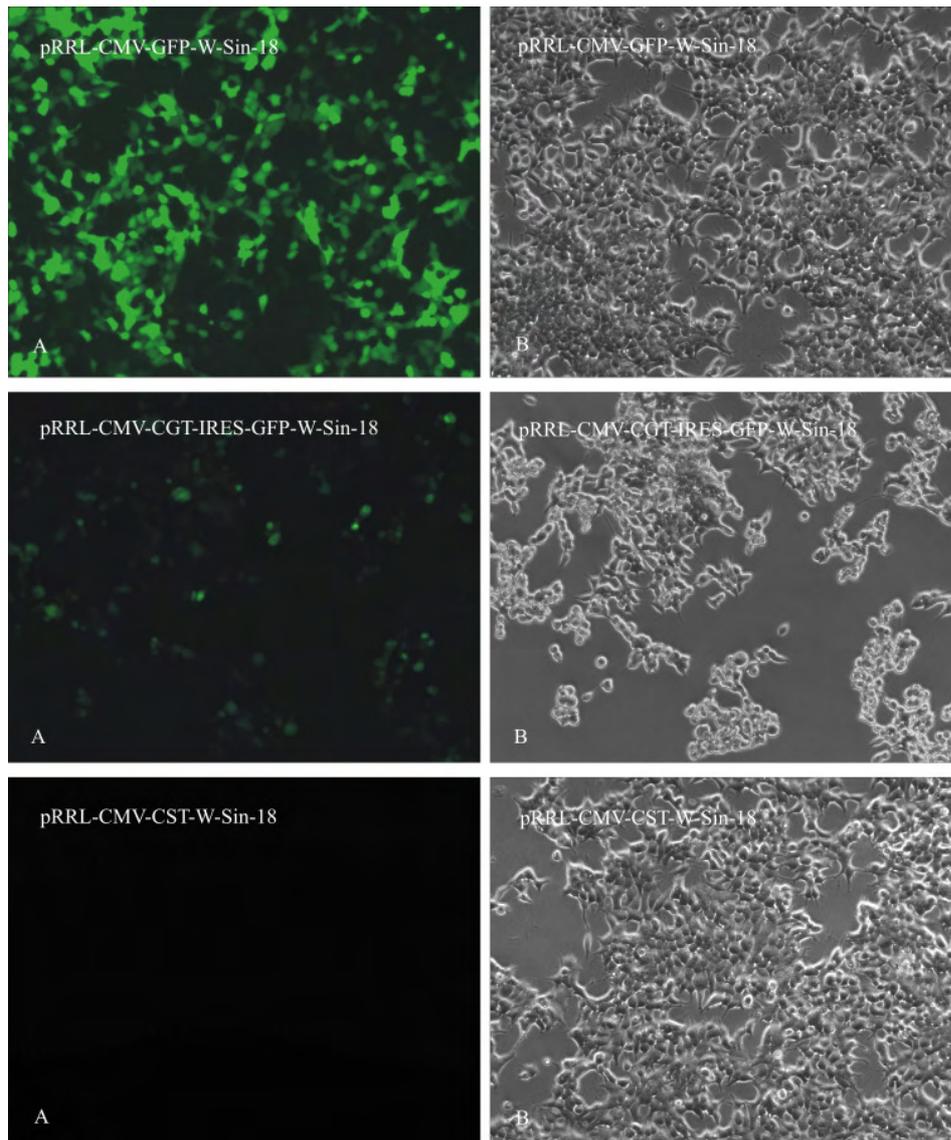
3.2 Transfektion von 293T-Zellen zur Herstellung lentiviraler Vektoren

Zur Herstellung lentiviraler Vektoren wurden HEK293T-Zellen mittels der Calcium-Phosphat-Methode mit einem Transferplasmid sowie pCMV Δ R8.93 und pMD.G transfiziert.

Die transfizierten Zellen exprimierten die Virusproteine und transkribierten die zu transduzierende Information in RNA, so dass lentivirale Viruspartikel produziert wurden, die ins Medium ausgeschleust wurden. Es wurden Vektoren erzeugt, die die genetische Information für GFP (LV-GFP), CST (LV-CST) oder CGT transduzierten. Der CGT-Vektor enthielt auch eine GFP-Sequenz, welche durch eine IRES-Sequenz mit der für CGT verknüpft war (Transferplasmid: pRRL-CMV-CGT-IRES-GFP-W-Sin-18, Vektor: LV-CGT-GFP). GFP diente zur Kontrolle für den Erfolg der Transfektion und der Transduktion. Für die Transduktion wurde als Qualitätsmerkmal die Anzahl der

fluoreszierenden Zellen bestimmt. Es konnte keine Aussage darüber getroffen werden, wie viele RNA-Kopien in das Genom der transduzierten Zellen integrierten wurden. Mit den erzeugten lentiviralen Viruspartikeln konnten regelmäßig 50 bis 90 Prozent aller Zellen in Abhängigkeit von der Zellart transduziert werden (siehe Abb. 15, 20, 22).

Abbildung 13: Lentiviren-produzierende HEK293T-Zellen



Transfektion mit pMD.G, pCMV Δ R8.93 und als Transferplasmid pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18 oder pRRL-CMV-CGT-IRES-GFP-W-Sin-18 oder pRRL-CMV-CST-W-Sin-18; GFP diente zur Kontrolle der Transfektion und der Transduktion; bei der Transfektion mit pRRL-CMV-CGT-IRES-GFP-W-Sin-18 ist die GFP-Expression im Vergleich zu pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18 abgeschwächt; A: Fluoreszenz bei 470nm: GFP; B: Phasenkontrast.

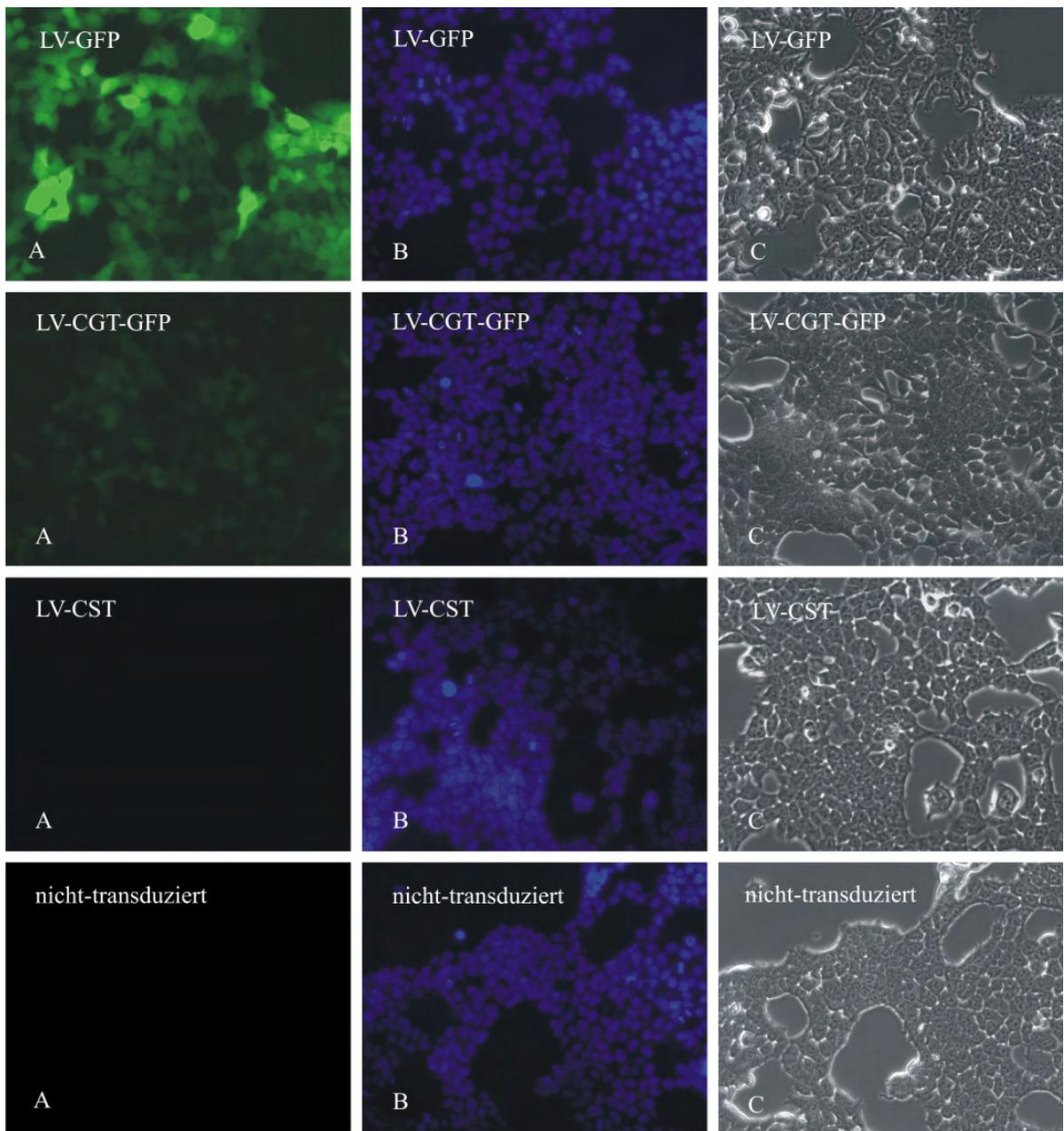
3.3 Transduktion mit lentiviralen Vektoren

In diesem Kapitel wird gezeigt, dass alle verwendeten Zelllinien und primären Zellen mit den erzeugten lentiviralen Vektoren transduzierbar waren. Das „Green fluorescence protein“ wurde durch LV-GFP transduziert und die Rate der fluoreszierenden Zellen bestimmt. Die Transduktion mit LV-CST und LV-CGT-GFP wurde durch Analyse der Lipidzusammensetzung der transduzierten Zellen untersucht.

3.3.1 HEK293T-Zellen

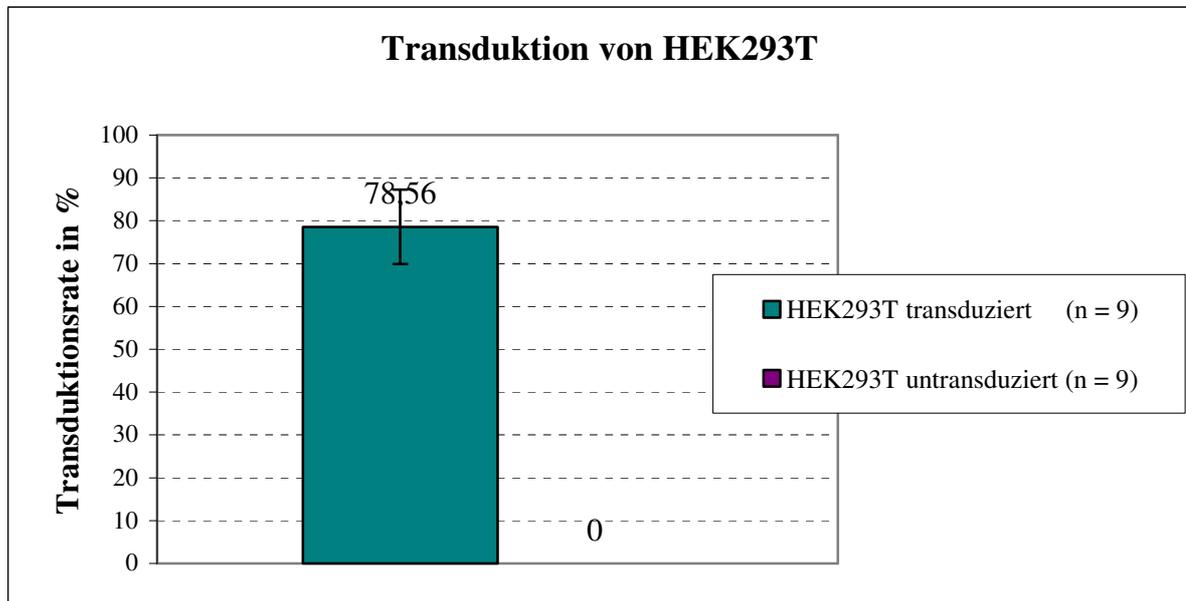
Bei jedem Versuch wurden HEK293T-Zellen zur Kontrolle der Transduktionseffizienz mit lentiviralen Vektoren transduziert. Es wurden stets LV-GFP, LV-CST und LV-CGT-GFP an den HEK293T-Zellen getestet. Die mit LV-GFP transduzierten, GFP-positiven Zellen wurden ausgezählt und zur Bewertung der Güte der Transduktion herangezogen.

Abbildung 14: Transduzierte HEK293T-Zellen



Mit LV-GFP, LV-CGT-GFP und LV-CST transduzierte HEK293T-Zellen, nicht-transduzierte HEK293T-Zellen zur Kontrolle; es wurden HEK293T-Zellen in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät, jeweils 3 Vertiefungen transduziert und nach drei Tagen im Fluoreszenzlicht kontrolliert und fotografiert; bei der Transduktion mit LV-CGT-GFP ist die GFP-Expression im Vergleich zur Transduktion mit LV-GFP abgeschwächt; A: Fluoreszenz bei 470nm: GFP; B: Fluoreszenz bei 365nm: Kernfärbung; C: Phasenkontrast.

Abbildung 15: Transduktion von HEK293T-Zellen mit LV-GFP – Auswertung



Das Zellkulturmedium mit dem lentiviralen Vektor LV-GFP wurde auf HEK293T-Zellen gegeben, die in eine Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät worden waren; 3 Vertiefungen wurden transduziert, 3 dienten als Kontrolle, wovon eine Polybren erhielt, um Auswirkungen des Polybrens auf die Zellen zu beobachten; 3 Tage nach Transduktion wurden die transduzierten Zellen fotografiert und die fluoreszierenden, GFP-positiven Zellen ausgezählt (jeweils 3 Bildfelder pro Vertiefung); im Durchschnitt wurden 78,56 % der HEK293T-Zellen transduziert (Werte zwischen wenigstens 68,25 % und höchstens 96,89 %).

HEK293T-Zellen wurden mit lentiviralen Vektoren zu durchschnittlich mehr als 78 % transduziert (siehe Abb. 15).

3.3.2 CHO-Zellen

Neben der Übertragung der genetischen Information war für eine Steigerung der Lipidspeicherung in transduzierten Zellen die Aktivität der Enzyme in den transduzierten Zellen notwendig. Um zu untersuchen, ob die konstruierten lentiviralen Vektoren die genetischen Informationen für die CST und die CGT in die Zelle übertragen und ob die

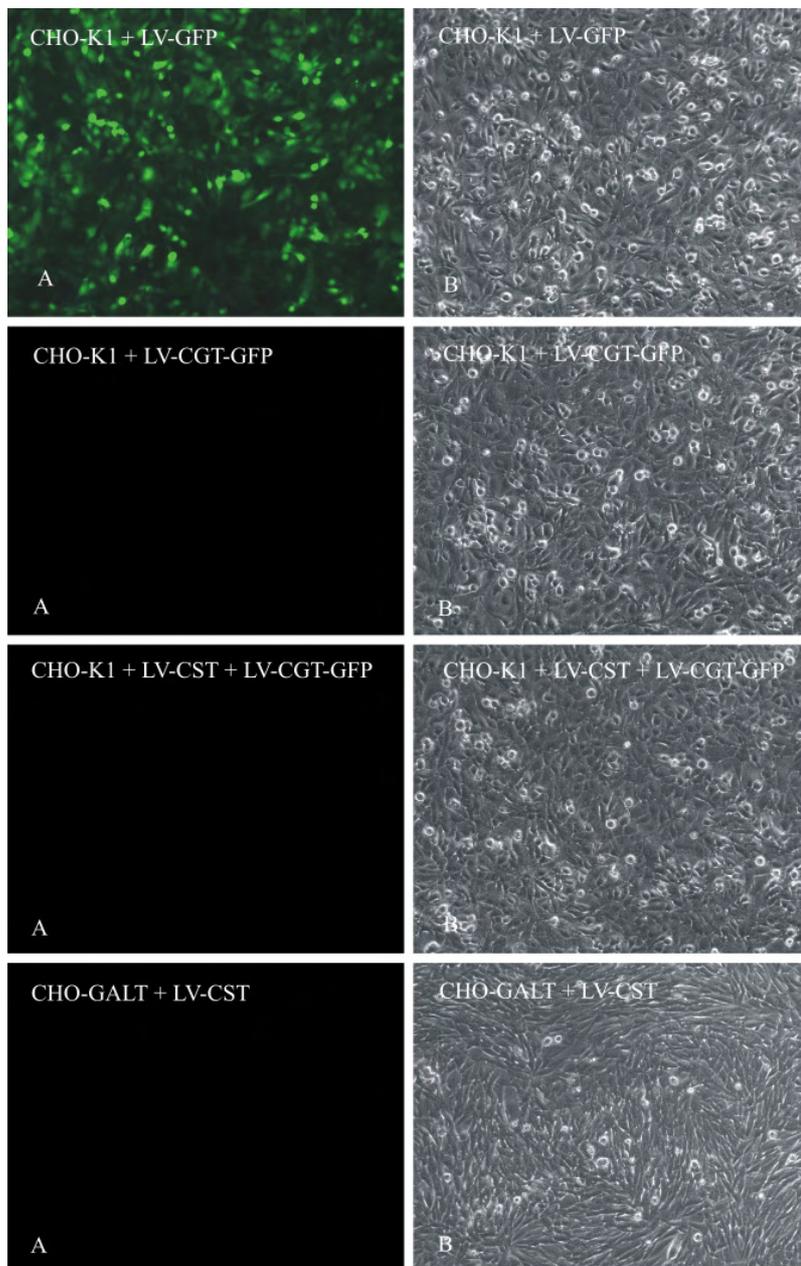
Enzyme dann auch aktiv waren, wurden CHO-Zellen verwendet. CHO-K1 und CHO-GalT wurden transduziert, CHO-SULF diente zur Kontrolle.

CHO-K1 ist eine aus den Ovarien chinesischer Hamster abgeleitete Zelllinie, die natürlicherweise kein Galaktosylceramid und kein Sulfatid produziert (Puck et al., 1958; Stahl et al., 1994). CHO-GalT ist eine stabil mit der CGT transfizierte Zelllinie, die Galaktosylceramid produziert, aber kein Sulfatid (Stahl et al., 1994). CHO-SULF ist eine stabil mit der CGT und der CST transfizierte Zelllinie, die sowohl Galaktosylceramid als auch Sulfatid produziert (Eckhardt et al., 2002).

3.3.2.1 Transduktion von CHO-Zellen

CHO-K1 wurden mit LV-CST oder mit LV-CGT-GFP oder in Kombination mit den Vektoren LV-CST und LV-CGT-GFP transduziert, CHO-GalT wurden mit LV-CST oder mit LV-CGT-GFP transduziert. GFP wurde auch hier eingesetzt, um zu zeigen, dass CHO-Zellen transduzierbar sind.

Abbildung 16: Transduzierte CHO-Zellen

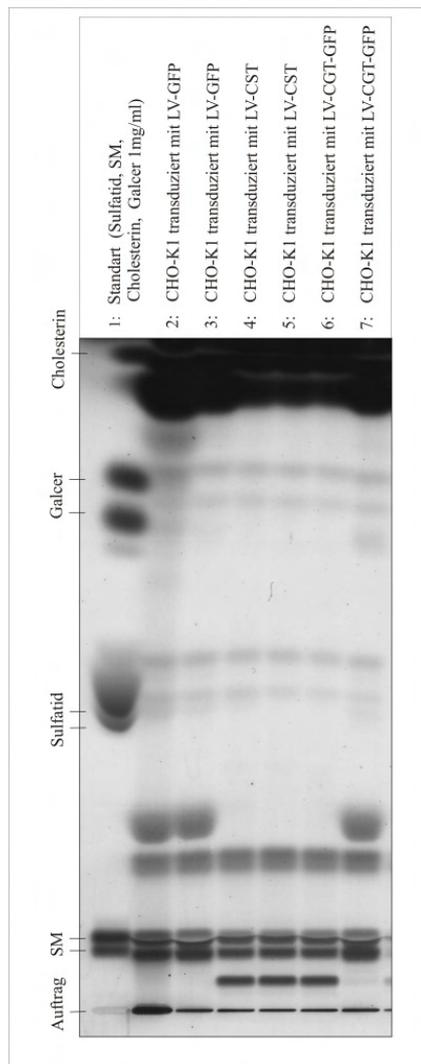


Mit LV-GFP, LV-CGT-GFP und/ oder LV-CST transduzierte CHO-K1- und CHO-GalT-Zellen; die Zellen wurden in 75cm²-Flaschen ausgesät mit einer Million Zellen pro Flasche, transduziert, dann für eine Woche kultiviert und fotografiert und abschließend zur Lipidanalyse abgeerntet; die Expression des GFP bei Transduktion mit LV-CGT-GFP war im Vergleich zur Transduktion der HEK293T-Zellen mit LV-CGT-GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht nachweisbar; A: Fluoreszenz bei 470nm: GFP; B: Phasenkontrast.

3.3.2.2 Lipidanalyse transduzierter CHO-Zellen

Zunächst wurden CHO-K1-Zellen mit LV-GFP oder mit LV-CST oder mit LV-CGT-GFP transduziert. Mit LV-GFP transduzierte CHO-K1-Zellen dienten hier als Kontrolle. Bei diesen Zellen war eine Veränderung der Lipidzusammensetzung im Vergleich zu untransduzierten CHO-K1-Zellen nicht zu erwarten.

Abbildung 17: Dünnschichtchromatographie von Lipiden aus transduzierten CHO-Zellen

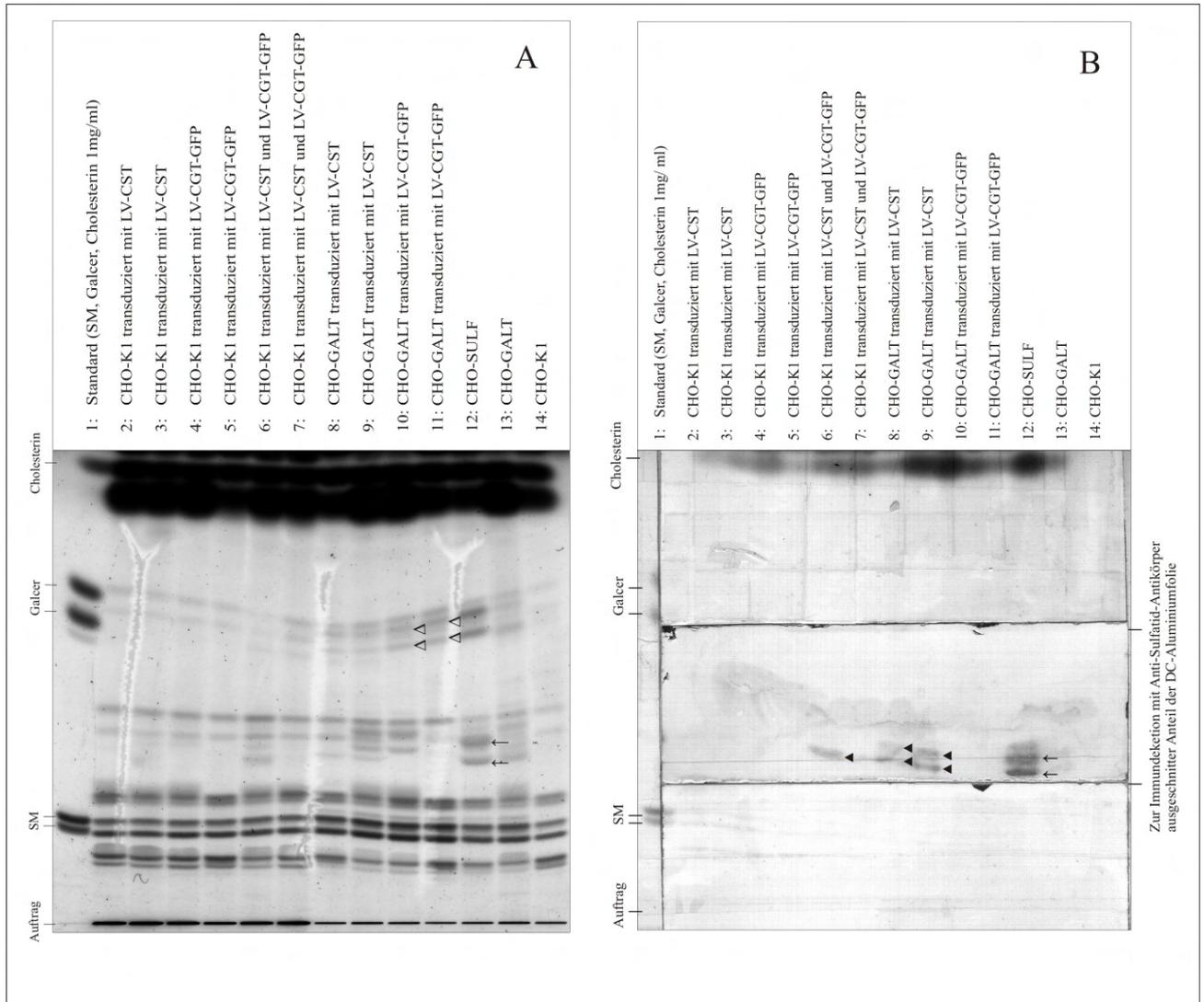


Die Zellen wurden in eine 75cm²-Flasche mit einer Million Zellen pro Flasche ausgesät, transduziert, eine Woche kultiviert und dann zur Lipidanalyse abgeerntet; alle LV-GFP stammten aus einer Transfektion, genauso LV-CST und LV-CGT-GFP, aber die Zellen wurden unabhängig von einander transduziert und kultiviert; es wurden gleiche Mengen der Extrakte aufgetragen.

Man erkennt keine Veränderung der Lipidzusammensetzung bei mit LV-CST oder mit LV-CGT-GFP transduzierten CHO-K1-Zellen im Vergleich zu den mit LV-GFP transduzierten CHO-K1-Zellen. Für die Sulfatid-Biosynthese in der Zelle sind sowohl die CST als auch die CGT notwendig: die CGT katalysiert Ceramid und Galaktose zu Galaktosylceramid, welches die CST mit aktiviertem Sulfat zu Sulfatid umsetzt. CHO-K1-Zellen exprimieren diese beiden Enzyme aber natürlicherweise nicht. CHO-K1-Zellen, die mit LV-CST transduzierten wurden, exprimieren die CST. Es fehlt Galaktosylceramid, das zur Sulfatid-Biosynthese notwendig ist. CHO-K1-Zellen, die mit LV-CGT-GFP transduzierten wurden, exprimieren die CGT, nicht die CST, so dass eine Sulfatid-Synthese ebenso unmöglich ist. Eine Vermehrung von Galaktosylceramid in diesen Zellen war zu erwarten, ist jedoch nicht sichtbar. Die extrahierten und aufgetragenen Lipidmengen waren im übrigen zu gering, um sicher eine Aussage machen zu können.

Unter der Annahme, dass CHO-Zellen beide Enzyme, die CGT und die CST, benötigen, um Sulfatid herzustellen, wurden in einem folgenden Versuch CHO-Zellen erzeugt und untersucht, die beide Enzyme, die CST und die CGT, enthalten, entweder durch stabile Transfektion (CHO-SULF-Zellen) oder durch stabile Transfektion und Transduktion (mit LV-CST transduzierte CHO-GalT-Zellen) oder durch gleichzeitige Transduktion mit LV-CST und mit LV-CGT-GFP (mit LV-CST und LV-CGT-GFP transduzierte CHO-K1-Zellen). Zudem wurde eine Dünnschichtchromatographie und eine Immundetektion des Sulfatids auf DC-Aluminiumfolien durchgeführt. Die Immundetektion hat eine um den Faktor 30 höhere Sensivität als eine Dünnschichtchromatographie.

Abbildung 18: Dünnschichtchromatographie und Immundetektion von Sulfatid transduzierter CHO-Zellen



A: Dünnschichtchromatographie, B: Immundetektion von Sulfatid auf DC-Aluminiumfolie; CHO-GALT- und CHO-K1-Zellen wurden transduziert und untersucht; CHO-SULF-Zellen dienten als Kontrolle; die Zellen wurden in eine 75cm²-Flasche mit einer Million Zellen pro Flasche ausgesät, transduziert, eine Woche kultiviert und dann zur Lipidanalyse

abgeerntet; alle LV-CST und LV-CGT-GFP stammten aus einer Transfektion, aber die Zellen wurden unabhängig von einander transduziert und kultiviert; bei Zellen, die entweder mit LV-CST oder mit LV-CGT-GFP transduziert wurden, erkennt man keinen Unterschied in der Lipidzusammensetzung im Vergleich zu CHO-K1-Zellen; bei Zellen, die beide Enzyme enthalten, entweder stabil transfiziert (CHO-SULF) oder stabil transfiziert und transduziert (CHO-GALT mit LV-CST) oder zweifach transduziert (CHO-K1 mit LV-CST und LV-CGT-GFP), kann man Sulfatid-Banden (hydroxyliert und nicht-hydroxyliert) in der Immundetektion erkennen; CHO-GalT-Zellen, die mit LV-CGT transduziert wurden, zeigen in der Immundetektion keine Sulfatid-Banden (Zellen enthalten keine CST), aber mehr Galaktosylceramid in der DC; Doppelpfeile: Sulfatid (hydroxyliert und nicht-hydroxyliert) bei stabil transfizierten CHO-SULF-Zellen, Dreiecke: Sulfatid (hydroxyliert und nicht-hydroxyliert) bei transduzierten Zellen in der Immundetektion, Dreiecke hohl: Galaktosylceramid (hydroxyliert und nicht-hydroxyliert) bei transduzierten Zellen in der DC.

Durch kombinierte Transduktion mit LV-CST und LV-CGT-GFP war es möglich, eine Sulfatid-Produktion in CHO-K1-Zellen zu erreichen. Die CGT lieferte das Galaktosylceramid, ohne das die CST kein Sulfatid produzierte. Gleiches galt für mit LV-CST transduzierte CHO-GalT-Zellen.

CHO-Zellen konnten durch lentivirale Vektoren transduziert werden. Die erzeugten Vektoren LV-CST und LV-CGT-GFP übertrugen die cDNAs der Ceramidgalaktosyltransferase und der Cerebrosidsulfotransferase in die CHO-Zellen und beide Enzyme waren in den transduzierten Zellen aktiv. Eine gesteigerte Sulfatid-Synthese war durch Immundetektion auf DC-Aluminiumfolien nachweisbar.

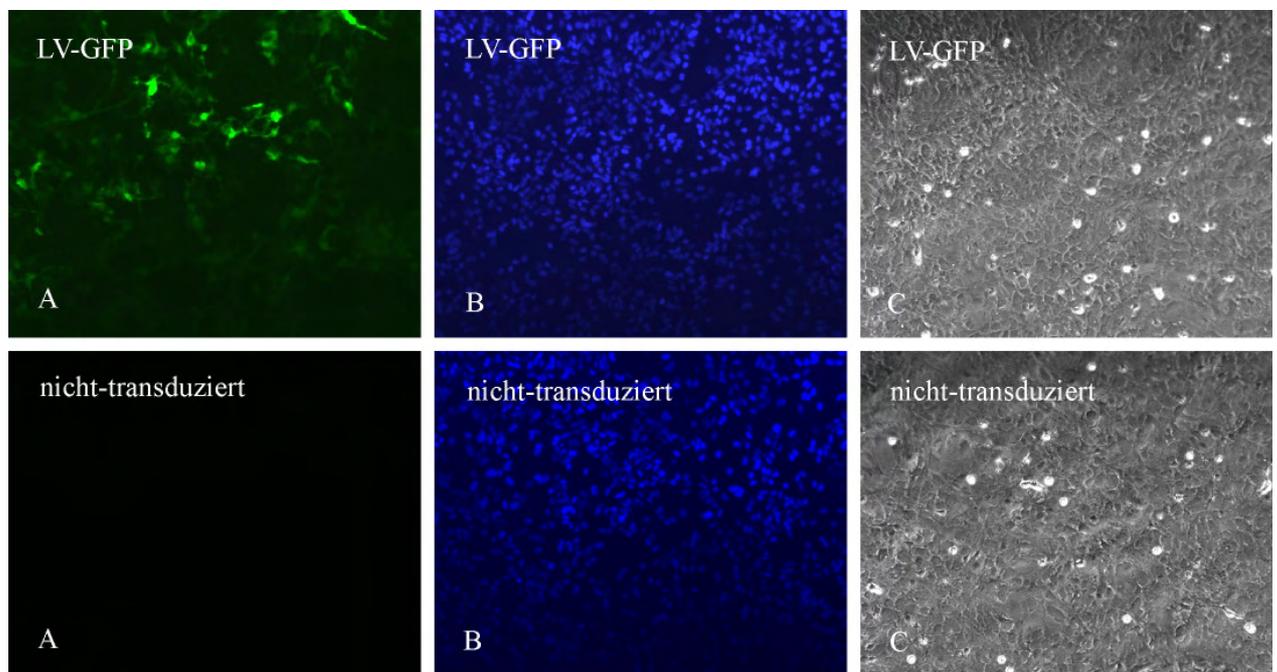
3.3.3 ZNS: Astrozyten und Oligodendrozyten

Astrozyten und Oligodendrozyten wurden aus den Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse präpariert. Dazu wurde zunächst eine gemischte Primärkultur angelegt und diese nach 7 Tagen Kultur durch kontrolliertes Schütteln in Astrozyten und Oligodendrozyten getrennt (siehe Kapitel 3.1).

3.3.3.1 Transduktion von Astrozyten und Oligodendrozyten

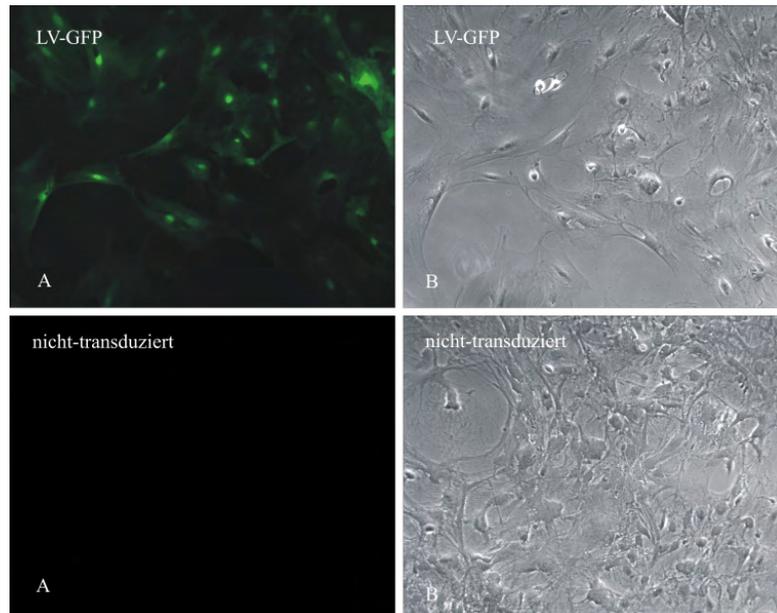
Transduziert wurden die gemischte Primärkultur aus Gehirnen neugeborener Mäuse mit verschiedenen Zelltypen sowie isolierte Oligodendrozyten und Astrozyten. Um zu überprüfen, ob und in welcher Zahl diese Zellen mit lentiviralen Vektoren transduzierbar waren, wurde der lentivirale Vektor LV-GFP eingesetzt.

Abbildung 19: Transduzierte Primärkultur aus den Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse



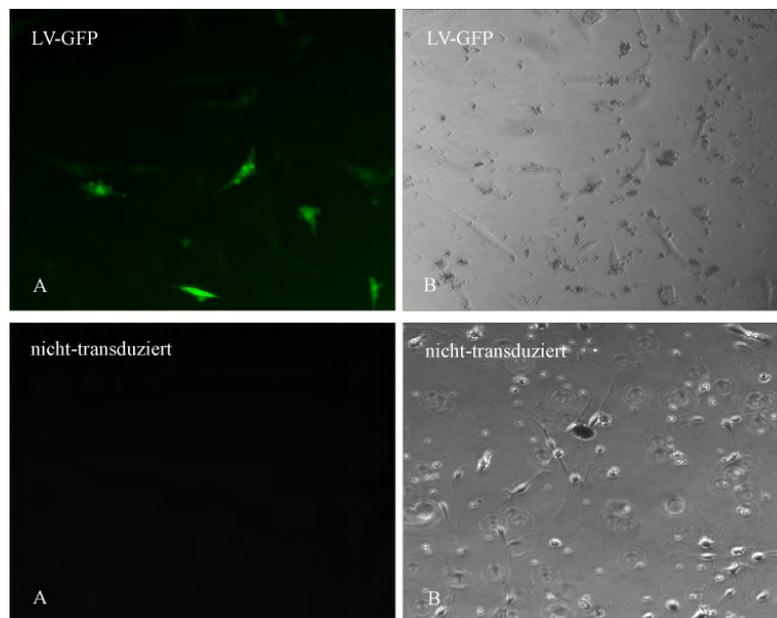
Mit LV-GFP transduzierte Primärkultur aus Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse, nicht-transduzierte Primärkultur zur Kontrolle; die Zellen wurden 6 Tage nach Präparation und 6 Tage nach Transduktion fotografiert; A: Fluoreszenz bei 470nm: GFP; B: Fluoreszenz bei 365 nm: Kernfärbung; C: Phasenkontrast.

Abbildung 20: Transduzierte Astrozyten



Mit LV-GFP transduzierte Astrozyten, nicht-transduzierte Astrozyten als Kontrolle; die Zellen wurden 14 Tage nach Transduktion fotografiert; A: Fluoreszenz bei 470nm: GFP; B: Phasenkontrast.

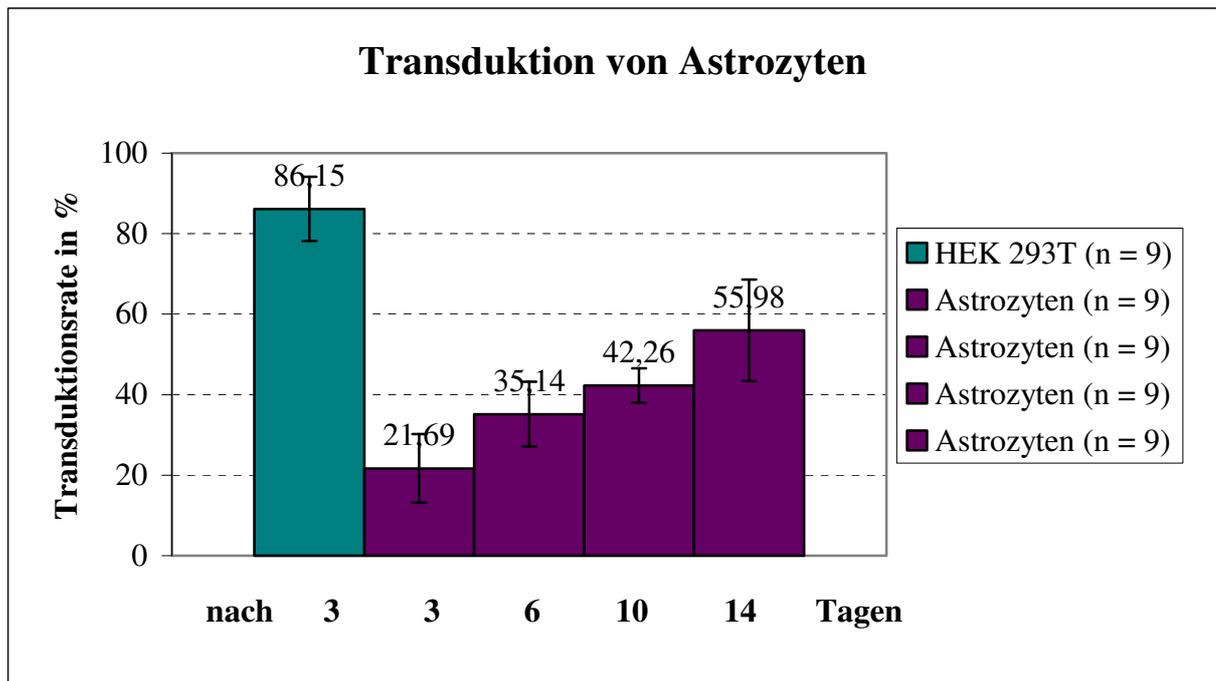
Abbildung 21: Transduzierte Oligodendrozyten



Mit LV-GFP transduzierte Oligodendrozyten, nicht-transduzierte Oligodendrozyten als Kontrolle; die Zellen wurden 15 Tage nach „Abschütteln“ und 14 Tage nach Transduktion fotografiert; A: Fluoreszenz bei 470nm: GFP; B: Phasenkontrast.

Alle präparierten Zellen konnten mit LV-GFP transduziert werden. Die Transduktionsrate der Astrozyten wurde durch Auszählen der GFP-positiven Astrozyten bestimmt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet und fotografiert. Die Zahl der GFP-positiven Zellen wurde an verschiedenen Tagen bestimmt. Die Zahl der fluoreszierenden Astrozyten war über den Beobachtungszeitraum von 2 Wochen langsam zunehmend.

Abbildung 22: Transduktion von Astrozyten mit LV-GFP – Auswertung



Das Zellkulturmedium mit den lentiviralen Vektoren LV-GFP wurde auf Astrozyten gegeben, die in eine Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen ausgesät worden waren. Die transduzierten Zellen wurden 3 Tage, 6 Tage, 10 Tage und 14 Tage nach Transduktion fotografiert und die fluoreszierenden, GFP-positiven Zellen ausgezählt (jeweils 3 Bildfelder pro Vertiefung). Der Anteil der GFP-positiven Zellen schwankte zwischen wenigstens 10,69 % an Tag 3 und höchstens 80,77 % an Tag 14; zur Kontrolle wurden auch HEK293T-Zellen transduziert; es wurde wie bei den Astrozyten vorgegangen, jedoch wurden die Zellen nur bis zum dritten Tag nach Transduktion beobachtet und dann verworfen; im Mittel waren 86,15 % der HEK293T-Zellen GFP-positiv (wenigstens 68,52 % und höchstens 93,49 %).

In der Oligodendrozytenkultur waren nach Transduktion mit LV-GFP nur einzelne Zellen fluoreszierend (weniger als 5 %).

3.3.3.2 Lipidanalyse transduzierter Oligodendrozyten

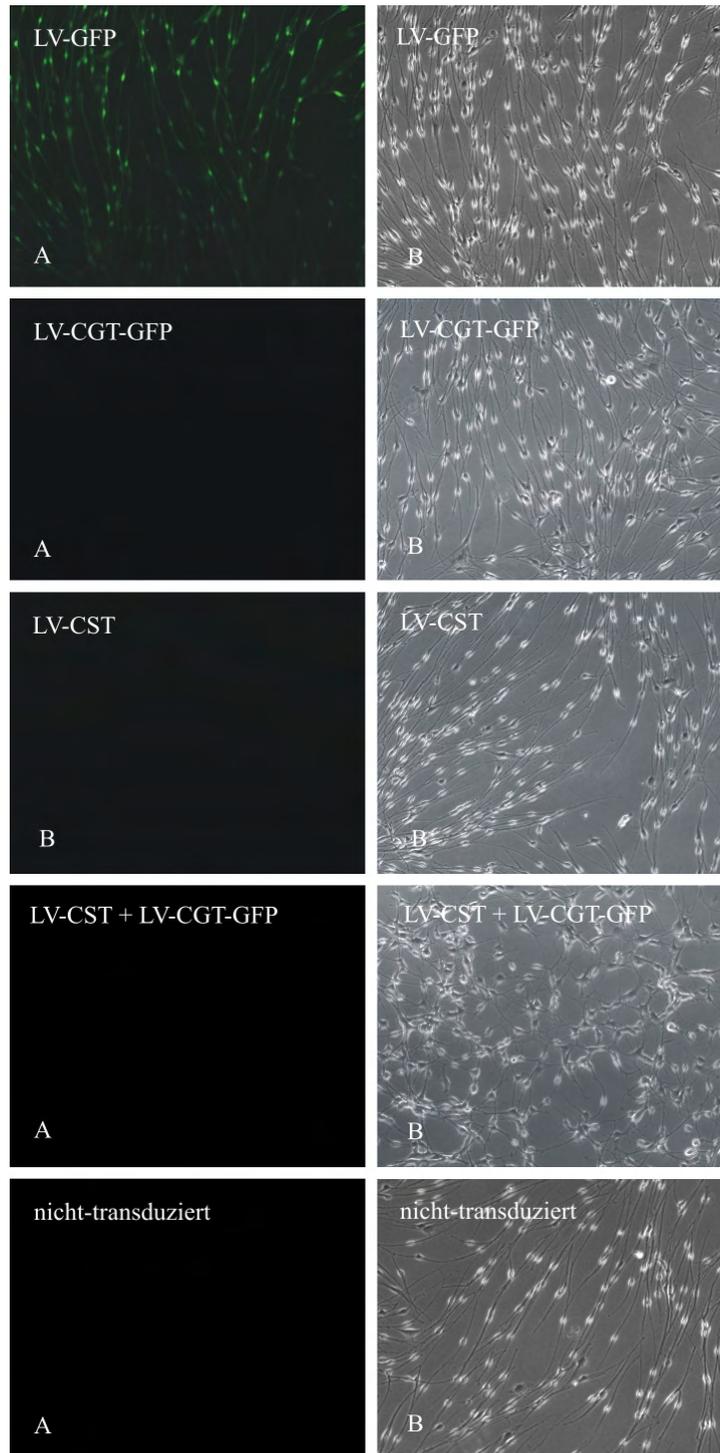
Die Oligodendrozyten sollten wie CHO-Zellen mit den Vektoren LV-CST und mit LV-CGT-GFP transduziert werden, um eine vermehrte Sulfatid-Speicherung zu erreichen. Jedoch war die Zellzahl der Oligodendrozyten, die durch Präparation einer Primärkultur gewonnen werden konnte, zu gering für eine Lipidextraktion. Zudem war die Transduktionsrate bei Transduktion der Oligodendrozyten mit LV-GFP schlecht, so dass die Transduktion mit LV-CST und LV-CGT-GFP nicht versucht wurde.

3.3.4 PNS: Schwann-Zellen

3.3.4.1 Transduktion von Schwann-Zellen

Schwann-Zellen wurden mit LV-GFP, LV-CST oder LV-CGT-GFP oder mit LV-CST und LV-CGT-GFP transduziert.

Abbildung 23: Transduzierte Schwann-Zellen

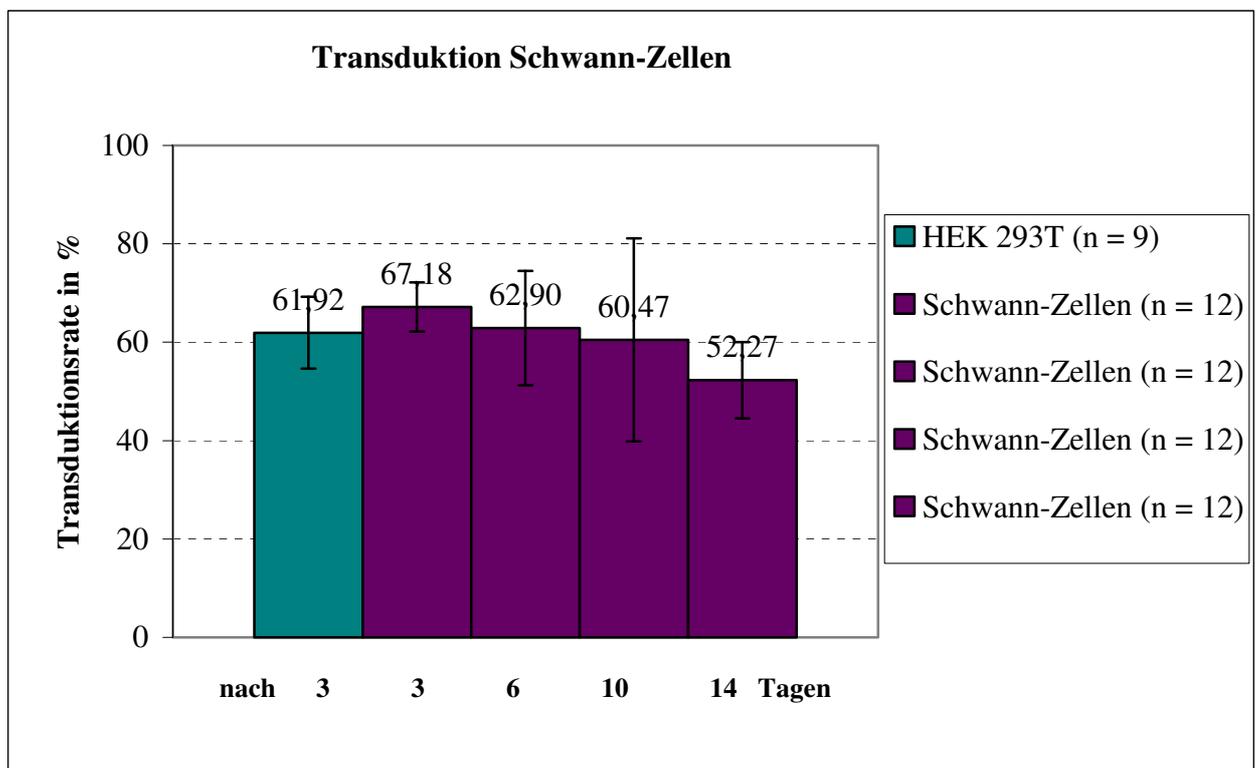


Mit LV-GFP, LV-CGT-GFP und LV-CST transduzierte Schwann-Zellen; die Zellen wurden in 75cm²-Flaschen ausgesät mit einer Million Zellen pro Flasche, transduziert, dann für zwei Wochen kultiviert, fotografiert und abschließend zur Lipidanalyse abgeerntet; diese Bilder wurden 3 Tage nach Transduktion angefertigt; die Expression des GFP bei

Transduktion mit LV-CGT-GFP ist im Vergleich zur Transduktion der HEK293T-Zellen mit LV-CGT-GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht nachweisbar; A: Fluoreszenz bei 470nm: GFP; B: Phasenkontrast.

Die Transduktionsrate wurde durch Auszählen der fluoreszierenden Schwann-Zellen bei Transduktion mit LV-GFP bestimmt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet und fotografiert. Die Zahl der GFP-positiven Zellen wurde an verschiedenen Tagen bestimmt.

Abbildung 24: Transduktion von Schwann-Zellen mit LV-GFP – Auswertung



Hier wurde LV-GFP auf Schwann-Zellen gegeben, die in eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen ausgesät worden waren; die transduzierten Zellen wurden 3 Tage, 6 Tage, 10 Tage und 14 Tage nach Transduktion fotografiert und die fluoreszierenden, GFP-positiven Zellen ausgezählt (jeweils 2 Bildfelder pro Vertiefung); der Anteil der GFP-positiven Zellen schwankte zwischen wenigstens 19,51 % an Tag 10 und höchstens 87,78 % an Tag 10; zur Kontrolle wurden auch HEK293T-Zellen transduziert; sie wurden in eine Zellkulturplatte

mit 6 Vertiefungen ausgesät, transduziert, bis zum dritten Tag nach Transduktion beobachtet, dann fotografiert und die GFP-positiven Zellen ausgezählt (jeweils 3 Bildfelder pro Vertiefung); im Mittel waren 61,92 % der HEK293T-Zellen GFP-positiv (wenigstens 47,07 % und höchstens 72,3 %).

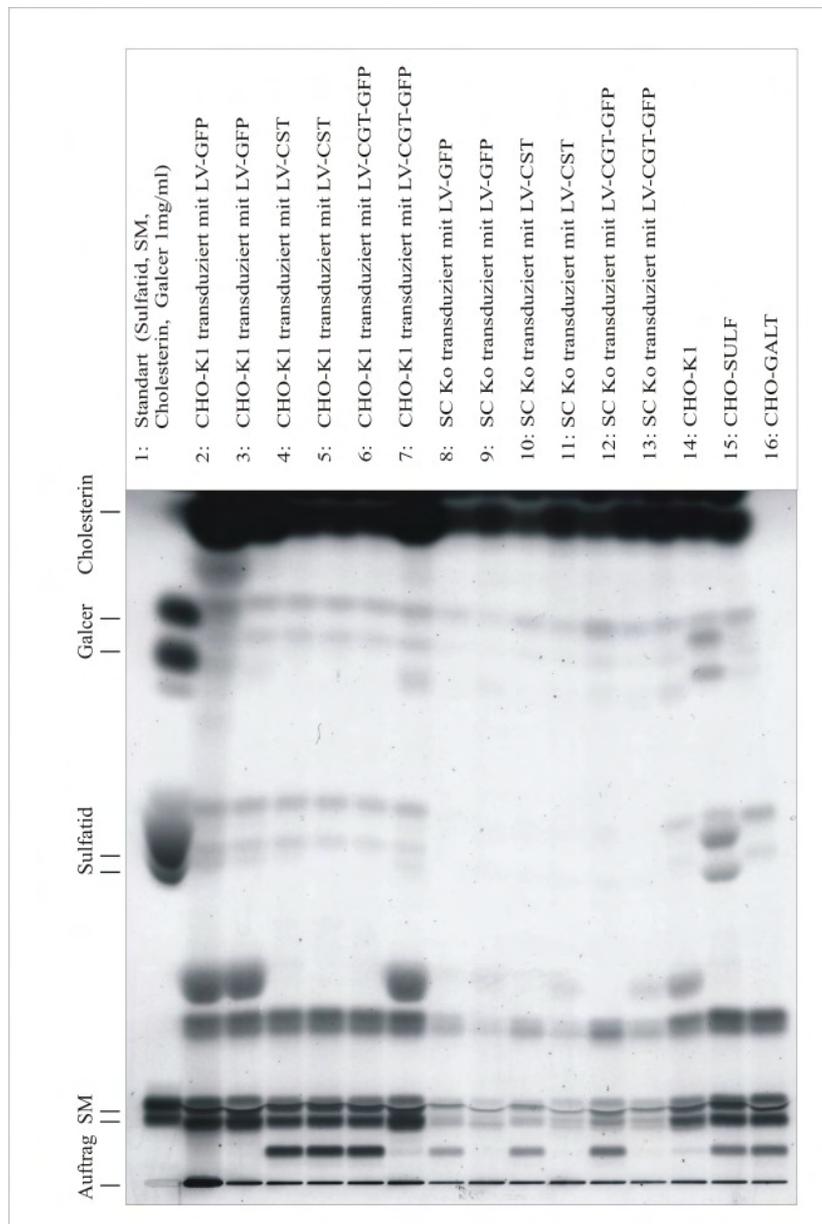
Auch Schwann-Zellen konnten mit lentiviralen Vektoren transduziert werden. Die Transduktionsrate der mit LV-GFP transduzierten Zellen lag nach 14 Tagen durchschnittlich bei 52,27 %.

3.3.4.2 Lipidanalyse transduzierter Schwann-Zellen

Die verwendeten Schwann-Zellen waren ASA-defizient und deshalb nicht in der Lage, Sulfatid abzubauen. Sie exprimierten die CST und die CGT. Auch ohne Transduktion enthielten diese Zellen Sulfatid. Sie wurden jedoch aus Jungtieren präpariert, so dass die isolierten Zellen nur geringe Mengen an Sulfatid bereits gespeichert hatten. Deshalb wurden Schwann-Zellen mit den lentiviralen Vektoren LV-CST oder LV-CGT-GFP oder kombiniert mit den Vektoren LV-CST und LV-CGT-GFP transduziert, eine bzw. zwei Wochen kultiviert, dann abgeerntet, die Lipide extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

Zunächst wurden ASA-defiziente Schwann-Zellen jeweils mit LV-GFP, LV-CST oder LV-CGT-GFP transduziert und eine Woche kultiviert. Stabil transfizierte und transduzierte CHO-Zellen dienten hier und in allen weiteren Versuchen als Kontrolle.

Abbildung 25: Dünnschichtchromatographie von Lipiden aus transduzierten, ASA-defizienten Schwann-Zellen und transduzierten CHO-K1-Zellen



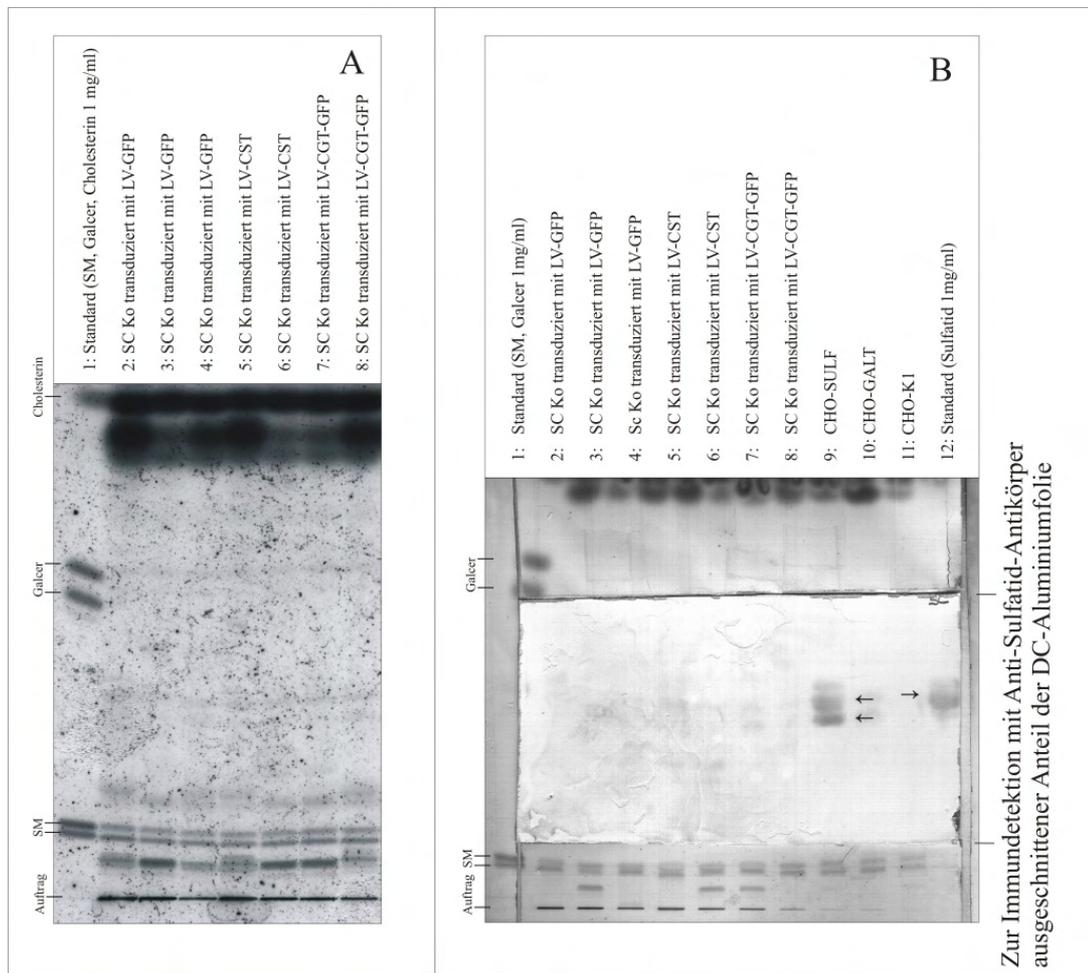
ASA-defiziente Schwann-Zellen (SC-Ko) und CHO-K1-Zellen wurden hier untersucht; die Zellen wurden in eine 75cm²-Flasche mit einer Million Zellen pro Flasche ausgesät, transduziert, eine Woche kultiviert und dann zur Lipidanalyse abgeerntet; alle LV-GFP stammten aus einer Transfektion, genauso LV-CST und LV-CGT-GFP, aber die Zellen wurden unabhängig von einander transduziert und kultiviert; es wurden gleiche Mengen der Extrakte aufgetragen; CHO-GalT und CHO-SULF wurden zum Vergleich in gleicher Zellzahl ausgesät, ebenso lang kultiviert und hier in gleicher Menge aufgetragen.

Die aufgetragene Lipidmenge aus Schwann-Zellen war zu gering, um in der Dünnschichtchromatographie Unterschiede detektieren zu können. Die Gesamtlipidmenge, die aus transduzierten Schwann-Zellen extrahiert wurde, war nicht ausreichend, um eine aussagekräftige Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie durchführen zu können. Bei weiteren Versuchen wurden deshalb zum einen die transduzierten Schwann-Zellen länger kultiviert, damit Sulfatid über einen längeren Zeitraum gespeichert werden konnte, und zum anderen wurde stets eine Analyse mittels Immundetektion von Sulfatid auf DC-Aluminiumfolien durchgeführt, die um den Faktor 30 sensitiver war als eine Dünnschichtchromatographie.

Es wurden ASA-defiziente Schwann-Zellen erneut mit LV-GFP, LV-CST oder LV-CGT-GFP transduziert, dann jedoch zwei Wochen kultiviert, abgeerntet und dann mittels Dünnschichtchromatographie und mittels Immundetektion von Sulfatid auf DC-Aluminiumfolie analysiert.

Bei mit LV-GFP transduzierten Schwann-Zellen war keine Veränderung im Lipidstoffwechsel im Vergleich zu untransduzierten, ASA-defizienten Schwann-Zellen zu erwarten. Sie dienten als Kontrolle. Bei mit LV-CST oder LV-CGT-GFP transduzierten Schwann-Zellen wurde mehr Sulfatid bzw. Galaktosylceramid erwartet.

Abbildung 26: Dünnschichtchromatographie und Immundetektion von Sulfatid transduzierter, ASA-defizienter Schwann-Zellen

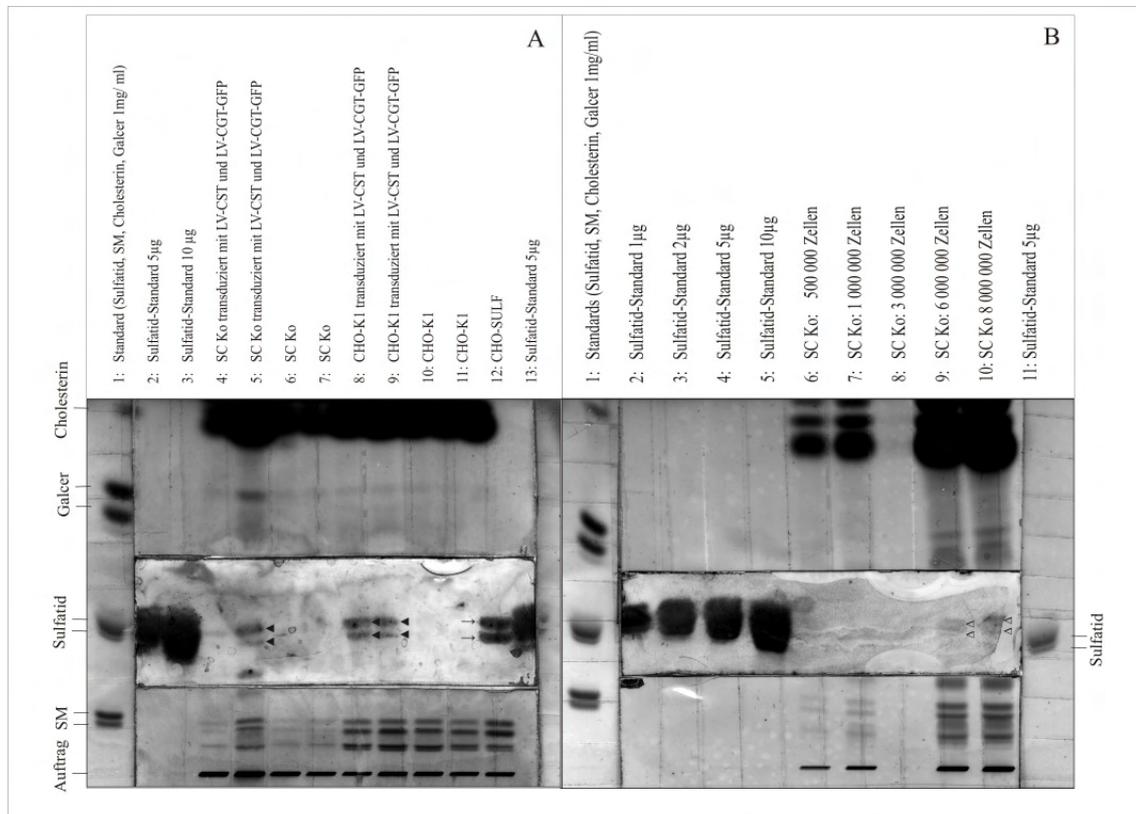


A: Dünnschichtchromatographie, B: Immundetektion von Sulfatid auf DC-Aluminiumfolie; Schwann-Zellen aus ASA-Knockout-Mäusen wurden in eine 75cm²-Flasche mit einer Million Zellen pro Flasche ausgesät, transduziert, zwei Woche kultiviert und dann zur Lipidanalyse abgeerntet; alle LV-GFP stammten aus einer Transfektion, genauso LV-CST und LV-CGT-GFP, aber die Zellen wurden unabhängig von einander transduziert und kultiviert; es wurden gleiche Mengen der Extrakte aufgetragen; CHO-K1, CHO-GalT und CHO-SULF wurden zum Vergleich in gleicher Zellzahl ausgesät, eine Woche kultiviert und hier in gleicher Menge aufgetragen; man erkennt keine Unterschiede in der Lipidzusammensetzung zwischen den mit LV-GFP (keine Veränderung zu erwarten) und den mit LV-CST oder LV-CGT transduzierten Schwann-Zellen; Doppelpfeile: Sulfatid-Bande (hydroxyliert und nicht-hydroxyliert) bei stabil transfizierten CHO-SULF-Zellen, Pfeil: Sulfatid-Standard 1mg/ml.

In der Dünnschichtchromatographie waren die Lipidmengen weiterhin zu gering, um Unterschiede in der Lipidzusammensetzung belegen zu können. In der Immundetektion von Sulfatid waren bei allen Proben der Schwann-Zellen kein Sulfatid und somit auch keine Unterschiede zwischen den in den Zellen enthaltenen Sulfatid-Mengen zu detektieren.

In CHO-Zellen konnte durch kombinierte Transduktion mit LV-CST und mit LV-CGT-GFP eine Zunahme der Sulfatid-Menge erreicht werden. Die kombinierte Transduktion wurde unter der Annahme durchgeführt, dass Galaktosylceramid für die Sulfatid-Synthese in CHO-Zellen vorhanden sein musste. In einem weiteren Versuch wurden deshalb ASA-defiziente Schwann-Zellen kombiniert mit LV-CST und mit LV-CGT-GFP transduziert. Hier unter der Annahme, dass in Schwann-Zellen nicht genügend Galaktosylceramid für eine gesteigerte Sulfatid-Produktion vorhanden war.

Abbildung 27: Immundetektion von Sulfatid transduzierter Schwann-Zellen und transduzierter CHO-K1-Zellen (untransduzierte Schwann-Zellen in Titration mit zunehmender Zellzahl als Kontrolle)



A: Immundetektion transduzierter, ASA-defizienter Schwann-Zellen und transduzierter CHO-K1-Zellen; **B:** Immundetektion untransduzierter, ASA-defizienter Schwann-Zellen in aufsteigender Zellzahl;

A: Hier wurden mit LV-CST und LV-CGT-GFP kombiniert transduzierte Schwann-Zellen und CHO-K1-Zellen untersucht; die Zellen wurden mit einer Million Zellen pro 75cm²-Zellkulturflasche ausgesät und transduziert; die CHO-Zellen wurden eine Woche kultiviert, die Schwann-Zellen wurden 2 Wochen kultiviert, dann wurden die Zellen abgeerntet und die Lipide extrahiert; man erkennt, dass die mit LV-CST und mit LV-CGT-GFP transduzierten CHO-K1-Zellen im Gegensatz zu den nicht-transduzierten Zellen Sulfatid zeigen; bei den transduzierten Schwann-Zellen erkennt man bei Transduktion 2 ebenso Sulfatid, es wurden jedoch mehr Lipide aufgetragen im Vergleich zu den anderen Spuren mit Lipiden aus Schwann-Zellen (Lipide aus ungefähr 6 Millionen Zellen, bei allen anderen Proben Lipide aus ungefähr 600.000 Zellen);

B: Um zu zeigen, dass das Sulfatid durch Transduktion mit LV-CST und LV-CGT-GFP im Vergleich zu nicht transduzierten Schwann-Zellen mit ausschließlich endogener Produktion vermehrt war, wurden Lipide untransduzierter Schwann-Zellen in einer Titration mit ansteigender Zellzahl gegenübergestellt; die Immundetektion wurde unter exakt den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die Immundetektion der transduzierten Zellen (gleiche Antikörper, gleiche Lösungen, gleiche Entwicklungsdauer); man erkennt, dass bei einer Zellzahl von 6 Millionen Zellen Sulfatid sichtbar wird, genauso bei 8 Millionen Zellen, doch die Stärke der Sulfatid-Doppelbande (hydroxyliert und nicht-hydroxyliert) ist bei den untransduzierten Schwann-Zellen deutlich geringer, auch bei 8 Millionen Zellen;

Doppelpfeile: Sulfatid (hydroxyliert und nicht hydroxyliert) bei stabil transfizierten CHO-SULF-Zellen, Dreiecke: Sulfatid (hydroxyliert und nicht-hydroxyliert) bei transduzierten Zellen in der Immundetektion, Dreiecke hohl: Sulfatid (hydroxyliert und nicht hydroxyliert) bei untransduzierten Schwann-Zellen.

Die obige Abbildung hat gezeigt, dass bei mit LV-CST und mit LV-CGT-GFP transduzierten, ASA-defizienten Schwann-Zellen die in den Zellen enthaltene Sulfatid-Menge im Vergleich zu nicht-transduzierten, ASA-defizienten Schwann-Zellen bei gleicher Zellzahl vermehrt ist. q.e.d.

4 Diskussion

4.1 Präparation primärer Oligodendrozyten aus Gehirnen neugeborener ASA-Knockout-Mäuse

Für die Entwicklung eines Zellkulturmodells zur Untersuchung der metachromatischen Leukodystrophie wurden primäre Oligodendrozyten aus ASA-Knockout-Mäusen präpariert. Diese Kultur wurde durch Immunfluoreszenzfärbung von Oligodendrozyten- und Astrozyten-Markern charakterisiert. Dabei waren 5,72 % der Zellen in der Immunfluoreszenzfärbung GFAP-positiv, es handelte sich somit um Astrozyten.

O4 ist ein Oligodendrozyten-Marker, der sowohl auf Pre-Oligodendrozyten, als auch auf unreifen und reifen Oligodendrozyten zu finden ist. 39,88 % der untersuchten Zellen waren O4-positiv. RIP ist ein im Zytosol zu findendes Antigen, welches in unreifen und reifen Oligodendrozyten zu finden ist. Sulfatid ist ein Glykolipid, welches auf unreifen und reifen Oligodendrozyten zu finden ist. 29,71 % der Zellen waren Sulfatid-positiv. MBP ist ein Protein, welches auf reifen Oligodendrozyten zu finden ist. 12,84 % der Zellen waren MBP-positiv.

Der Anteil der Astrozyten in dieser Kultur entsprach den Werten in der Literatur (Trotter et al., 1989). Doch war bei kleiner n-Zahl und großer Standardabweichung, sowohl bei Kalkulation der im Mittel GFAP-positiven Zellen als auch bei Kalkulation des mittleren Vorkommens der übrigen Marker, die Zusammensetzung der Kultur unsicher. Man kann sagen, dass es sich um eine Oligodendrozytenkultur handelte, die Pre-Oligodendrozyten und Oligodendrozyten unterschiedlicher Entwicklungsstufen enthielt, genauso wie vereinzelte Astrozyten. Die Gesamtzellzahl der Kultur war trotz Präparation einer ausreichenden Zahl an ASA-Knockout-Mäusen gering. Die vereinzelten Astrozyten nahmen durch fortwährende Zellteilung und schnelleres Zellwachstum bei zunehmender Dauer der Kultivierung einen immer größer werdenden Prozentsatz der Zellen ein. Je älter eine solche Kultur war, desto ausgereifter waren die Oligodendrozyten, die so ihre Teilungsfähigkeit verloren haben (Trotter et al., 1989). Außerdem starben auch bei angereicherten Kulturen eine gewisse Zahl an Oligodendrozyten, insbesondere bei geringer Zelldichte bei Aussaat (Trotter et al., 1989).

Die präparierten primären Oligodendrozytenkulturen aus ASA-Knockout-Mäusen waren aus oben genannten Gründen für eine Extraktion der Lipide unbrauchbar. Deshalb wurden alle weiteren Versuche zur Lipidzusammensetzung transduzierter und nicht transduzierter glialer Zellen mit ASA-defizienten Schwann-Zellen durchgeführt.

4.2 Transfektion und Herstellung lentiviraler Vektoren

Zur Herstellung lentiviraler Vektoren wurden HEK293T-Zellen mit den Plasmiden pMD.G, pCMV Δ R8.93 und pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18 oder pRRL-CMV-CST-W-Sin-18 oder pRRL-CMV-CGT-IRES-GFP-W-Sin-18 transfiziert.

In Abbildung 13 („Lentiviren-produzierende HEK293T-Zellen“) kann man erkennen, dass die Zellen, die mit pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18 oder pRRL-CMV-CGT-IRES-GFP-W-Sin-18 transfiziert wurden, GFP-positiv waren, das heißt die Transfektion war erfolgreich. Über die Plasmide pRRL-CMV-CST-W-Sin-18, pMD.G und pCMV Δ R8.93 konnte keine direkte Aussage gemacht werden, da bei Transfektion mit diesen Vektoren kein GFP übertragen und exprimiert wurde.

Durch die Transduktion von HEK293T-Zellen mit LV-GFP und LV-CGT-GFP konnte gezeigt werden, dass durch Transfektion mit pMD.G und pCMV Δ R8.93 und pRRL-CMV-GFP-W-Sin-18 oder pRRL-CMV-CGT-IRES-GFP-W-Sin-18 infektiöse Partikel entstanden, die die Information des Transferplasmids an andere Zellen übertragen konnten (siehe Abbildung 14 „Transduzierte HEK293T-Zellen“).

Über die Transfektion mit pRRL-CMV-CST-W-Sin-18 und die Produktion von LV-CST konnte durch Fluoreszenzmikroskopie keine Aussage gemacht werden. Die Funktionstüchtigkeit von LV-CST war nur durch Transduktion und Lipidanalyse transduzierter Zellen zu zeigen.

4.3 Transduktion verschiedener Zelllinien und primärer Zellen

Alle untersuchten Zelllinien und primären Zellen (HEK293T-Zellen; CHO-Zellen; primäre Mischkulturen, primäre Astrozyten und primäre Oligodendrozyten, präpariert aus ASA-Knockout-Mäusen; Schwann-Zellen, präpariert aus ASA-Knockout-Mäusen) konnten mit LV-GFP transduziert werden. Dies zeigt die grüne Fluoreszenz dieser Zellen nach

Transduktion mit LV-GFP. Die Transduktionsraten waren unterschiedlich, jedoch am höchsten bei HEK293T-Zellen mit bis zu 86 % (siehe Abbildung 22 „Transduktion von Astrozyten mit LV-GFP – Auswertung“), Astrozyten konnten bis zu 56 % und Schwann-Zellen bis zu 67 % transduziert werden. Die Transduktionsrate war mit weniger als 5 % bei Oligodendrozyten am geringsten.

Lentivirale Vektoren binden unspezifisch an Phospholipide in der Plasmamembran und können deshalb verschiedenste Zelltypen transduzieren, unabhängig von deren Proliferationsstatus (Blomer et al., 1997; Burns et al., 1993; Naldini et al., 1996a; Naldini et al., 1996b). Alle in dieser Arbeit genutzten Zelllinien und primären Zellen konnten, wie erwartet, mit lentiviralen Vektoren transduziert werden.

4.4 Enzymaktivität der Ceramidgalaktosyltransferase aus LV-CGT-GFP und der Cerebrosidsulfotransferase aus LV-CST

Durch Transfektion konnten infektiöse Partikel produziert werden, die alle getesteten Zelllinien und primären Zellen transduzieren konnten. Die Übertragung der genetischen Information für GFP konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Auch die Transduktion durch LV-CGT-GFP konnte durch Expression des GFP der übertragenen Sequenz CGT-IRES-GFP in HEK293T-Zellen gezeigt werden. Die Transduktion durch LV-CST war nur mittels Lipidanalyse der transduzierten Zellen nachzuweisen. Zur Produktion von Lipiden war allerdings die Transduktion der Zellen nicht hinreichend. Die übertragenen Enzyme CST und CGT mussten funktionstüchtig und aktiv sein.

Um die Transduktion durch LV-CST und die Enzymaktivität der CST und der CGT zu überprüfen, wurden CHO-Zellen mit LV-CST und LV-CGT-GFP „infiziert“. Da CHO-K1-Zellen weder die CGT noch die CST natürlicherweise exprimierten, mussten beide Enzyme in die Zellen eingebracht werden, um eine Sulfatid-Produktion zu erreichen. Wie die Abbildungen 18 und 27 darlegen, ist durch Transduktion von CHO-GalT-Zellen mit LV-CST und durch Transduktion von CHO-K1-Zellen mit LV-CST und LV-CGT-GFP eine Sulfatid-Produktion im Vergleich zu den nicht-transduzierten Zellen (mit LV-GFP transduzierten Zellen) erreicht worden. CHO-GalT-CST enthält die CGT durch stabile Transfektion und die CST durch Transduktion mit LV-CST. CHO-K1-CST-CGT-GFP enthält beide Enzyme durch Transduktion mit LV-CST und LV-CGT-GFP. Damit ist die

Transduktion durch LV-CST und LV-CGT-GFP und die Aktivität der übertragenen Enzyme CST und CGT in CHO-Zellen bewiesen.

Dieses Prinzip der kombinierten Transduktion wurde auch auf ASA-defiziente Schwann-Zellen angewandt. Zwar exprimieren Schwann-Zellen die CST und die CGT natürlicherweise und die hier verwendeten Zellen waren zusätzlich ASA-defizient, doch konnte in der DC keine Sulfatid-Speicherung festgestellt werden. Bei einfacher Transduktion mit LV-CST oder mit LV-CGT-GFP konnte ebenso keine bzw. keine vermehrte Sulfatid-Speicherung nachgewiesen werden, weder mittels DC noch mittels Immundetektion von Sulfatid (siehe Abbildungen 25 und 26). Bei kombinierter Transduktion durch LV-CST und LV-CGT-GFP konnte mit Hilfe der Immundetektion bei aufgetragener Lipidmenge aus gleicher Anzahl von Zellen eine Vermehrung des Sulfatids im Vergleich zu untransduzierten Schwann-Zellen aus ASA-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27).

4.5 Ein Zellmodell zur Untersuchung der metachromatischen Leukodystrophie: Sulfatid-speichernde Schwann-Zellen aus ASA-Knockout-Mäusen

Ziel dieser Arbeit war es, ein Zellmodell zur Untersuchung der metachromatischen Leukodystrophie zu etablieren. Da die metachromatische Leukodystrophie insbesondere durch Demyelinisierung und den Untergang glialer Zellen gekennzeichnet ist, sollten Oligodendrozyten und Schwann-Zellen Gegenstand der Versuche sein.

Oligodendrozyten haben sich als nicht brauchbar für eine Studie zur Lipidzusammensetzung erwiesen. Die Präparation war aufwendig, die Zellausbeute gering und die Transduktionsrate niedrig.

Schwann-Zellen aus ASA-Knockout-Mäusen waren als Zelllinie durch spontane Immortalisierung aus primären Zellen gewonnen worden (Karumbayaram 2006). Sie waren in Kultur teilungsfähig und deshalb in ausreichender Zahl für eine Lipidextraktion zu gewinnen. Sie ließen sich durch lentivirale Vektoren in einem hohen Prozentsatz transduzieren (bis zu 67 %, siehe Abbildung 24). Es konnte gezeigt werden, dass Schwann-Zellen aus ASA-Knockout-Mäusen durch Transduktion mit LV-CST und mit LV-CGT-GFP vermehrt Sulfatid speichern. Die Zunahme der Sulfatid-Menge in Schwann-Zellen fiel

jedoch geringer aus, als man aufgrund der Experimente mit CHO-Zellen hätte erwarten können. Für die Interpretation dieser Resultate können auch Ergebnisse dienen, die parallel zu den hier durchgeführten Experimenten mit Hilfe transgener Mäuse gefunden wurden. Um die Sulfatid-Speicherung in Arylsulfatase A-defizienten Mäusen zu steigern, wurden transgene Tiere erzeugt, die unter einem PLP-Promoter entweder die CST oder die CGT oligodendrozytenspezifisch überexprimierten. Anschließend wurden diese transgenen Tiere in Arylsulfatase A-defiziente Mäuse gekreuzt. Dem lag die Annahme zugrunde, dass die erhöhte Expression der lipidsynthetisierenden Enzyme zu einer vermehrten Speicherung des Sulfatids führen sollte. Bei beiden Experimenten konnten in der Tat sowohl durch Westernblotanalyse, aber auch durch direkte Messung der Enzymaktivität nachgewiesen werden, dass in den Gehirnen transgener Mäuse erhebliche Mengen an CST und CGT aktiv sind (Eckhardt, 2006, data unpublished). Erstaunlicherweise kam es bei den Tieren, die nur das Transgen exprimierten, aber nur zu einer marginalen Erhöhung der Galactosylceramid- bzw. Sulfatid-Konzentration. Diese Versuche zeigen, dass überraschenderweise in Oligodendrozyten möglicherweise nicht die Aktivität der Enzyme CST und CGT für die Menge an Galaktosylceramid und Sulfatid im Myelin verantwortlich ist. Möglich ist, dass die Regulation der Lipidbiosynthese auf anderer Stufe als durch die Enzymaktivität erfolgt. Wurden die transgenen Tiere dann auf den Arylsulfatase A-defizienten Background gekreuzt, so kam es immerhin nach einem Jahr zu etwa einer Verdopplung der gespeicherten Sulfatid-Menge (Eckhardt, 2006, data unpublished). Überträgt man diese Ergebnisse auf das im Zentrum dieser Arbeit stehende Zellkulturmodell, so verwundert nicht, dass die Expression der CST und CGT in den transduzierten Zellen auch nur zu einer unerwartet geringen Erhöhung der Sulfatid-Biosynthese führt. Möglicherweise bedarf es einer längerfristigen Kultivierung der transduzierten Arylsulfatase A-defizienten Schwann-Zellen bis sich eine Speicherung in nennenswerten Ausmaßen manifestiert.

5 Zusammenfassung

Die metachromatische Leukodystrophie ist eine autosomal-rezessiv vererbte, lysosomale Speicherkrankheit mit schwerwiegendem Verlust neurologischer Fähigkeiten und infauster Prognose. Die Erkrankung ist unaufhaltsam progredient, die Patienten versterben im Stadium der Dezerebration. Ihr liegt zumeist eine Defizienz der Arylsulfatase A zugrunde, welche ein Schlüsselenzym im Abbau der 3,0-Sulfogalactosyl-Glykolipide, insbesondere des Sulfatids, ist. Konsekutiv wird Sulfatid gespeichert, vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem, aber auch in Niere, Gallenblase und den Gallengangsepithelien der Leber. Die Speicherung führt zu einer weitreichenden zentralen und peripheren Demyelinisierung und dem Untergang glialer und neuronaler Zellen und somit zum Krankheitsbild der metachromatischen Leukodystrophie. Der pathogenetische Zusammenhang zwischen Sulfatid-Speicherung, Demyelinisierung und dem Zellverlust ist nach wie vor ungeklärt. Ein Tiermodell zur Untersuchung der metachromatischen Leukodystrophie steht mit einer ASA-Knockout-Maus zur Verfügung, ein etabliertes Zellmodell für die metachromatische Leukodystrophie gab es bislang nicht (Gieselmann et al., 2003; Hess et al., 1996).

In dieser Arbeit wurde ein *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Pathogenese der metachromatischen Leukodystrophie entwickelt. Zunächst wurden lentivirale Vektoren mittels Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen hergestellt, die für die cDNAs der Cerebrosidsulfotransferase und der Ceramidgalaktosyltransferase kodierten (LV-CST und LV-CGT-GFP). Diese beiden Enzyme sind für die Sulfatid-Biosynthese erforderlich. Die Funktionstüchtigkeit der Vektoren sowie der übertragenen Enzyme wurde durch Transduktion von CHO-Zellen und Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie und Immundetektion bewiesen. ASA-defiziente Oligodendrozyten aus dem zentralen Nervensystem erwiesen sich durch aufwendige Präparation mit geringer Zellausbeute und durch niedrige Transduktionseffizienz als unbrauchbar für die durchzuführenden Experimente. ASA-defiziente Schwann-Zellen aus dem peripheren Nervensystem wurden kombiniert mit den lentiviralen Vektoren LV-CST und LV-CGT-GFP transduziert. Eine vermehrte Sulfatid-Speicherung im Vergleich zu untransduzierten Zellen konnte durch Immundetektion von Sulfatid nachgewiesen werden. Die Zunahme der

Sulfatid-Menge in transduzierten Schwann-Zellen war jedoch geringer, als die Experimente mit CHO-Zellen hätten erwarten lassen, was unter Umständen darin begründet sein mag, dass in glialen Zellen nicht die Enzymaktivität der bestimmende Faktor für die gespeicherte Sulfatid-Menge ist.

6 Literaturverzeichnis

- **Austin J.** Metachromatic Leukodystrophy (sulfatide lipidosis). In: Hers HG, Van Hoof F, Hrsg. Lysosomes and Lysosomal Storage Diseases. New York: **1973**
- **Austin J**, Balasubramanian AS, Pattabiraman TN, Saraswathi S, Basu DK, Bachhawat BK. "A Controlled Study Of Enzymic Activities In Three Human Disorders Of Glycolipid Metabolism." *J Neurochem* **1963**; 10: 805-816
- **Baumann N, Pham-Dinh D.** "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system." *Physiol Rev* **2001**; 81: 871-927
- **Berg JM**, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemie. Berlin: Spektrum, **2003**
- **Bethke U**, Muthing J, Schauder B, Conradt P, Muhlradt PF. "An improved semi-quantitative enzyme immunostaining procedure for glycosphingolipid antigens on high performance thin layer chromatograms." *J Immunol Methods* **1986**; 89: 111-116
- **Blomer U**, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH. "Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector." *J Virol* **1997**; 71: 6641-6649
- **Burns JC**, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**; 90: 8033-8037
- **Craves FB**, Zalc B, Leybin L, Baumann N, Loh HH. "Antibodies to cerebroside sulfate inhibit the effects of morphine and beta-endorphin." *Science* **1980**; 207: 75-76
- **Dull T**, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini, L. "A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system." *J Virol* **1998**; 72: 8463-8471
- **Ebadi M, Chweh A.** "Inhibition by arylsulphatase A of Na-independent [3H]-GABA and [3H]-muscimol binding to bovine cerebellar synaptic membranes." *Neuropharmacology* **1980**; 19: 1105-1111
- **Eccleston PA**, Mirsky R, Jessen KR. "Spontaneous immortalisation of Schwann cells in culture: short-term cultured Schwann cells secrete growth inhibitory activity." *Development* **1991**; 112: 33-42

-
- **Eckhardt M**, Fewou SN, Ackermann I, Gieselmann V. "N-glycosylation is required for full enzymic activity of the murine galactosylceramide sulphotransferase." *Biochem J* **2002**; 368: 317-324
 - **Eggers HJ**. Allgemeine Virologie - Menschenpathogene Viren. In: Köhler W, Eggers HJ, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G. Medizinische Mikrobiologie. München: Urban & Fischer, **2001**: 486-537
 - **Figura K**, Gieselmann V, Jaeken J. Metachromatic Leukodystrophy. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Hrsg. The metabolic and molecular basis of inherited disease. New York: McGraw-Hill, **2001**: 3695-3724
 - **Follenzi A**, **Naldini L**. "Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors." *Methods Enzymol* **2002**; 346: 454-465
 - **Gieselmann V**, Franken S, Klein D, Mansson JE, Sandhoff R, Lüllmann-Rauch R, Hartmann D, Saravanan VP, De Deyn P, D'Hooge R, Van Der Linden AM, Schaeren-Wiemers N. "Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation." *Acta Paediatr Suppl* **2003**; 92: 74-79
 - **Ginsberg L**, **Gershfeld NL**. "Membrane bilayer instability and the pathogenesis of disorders of myelin." *Neurosci Lett* **1991**; 130: 133-136
 - **Gustavson KH**, **Hagberg B**. "The incidence and genetics of metachromatic leucodystrophy in northern Sweden." *Acta Paediatr Scand* **1971**; 60: 585-590
 - **Hanahan D**, Jessee J, Bloom FR. "Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria." *Methods Enzymol* **1991**; 204: 63-113
 - **Heim P**, Claussen M, Hoffmann B, Conzelmann E, Gartner J, Harzer K, Hunneman D H, Kohler W, Kurlemann G, Kohlschutter A. "Leukodystrophy incidence in Germany." *Am J Med Genet* **1997**; 71: 475-478
 - **Hess B**, Saftig P, Hartmann D, Coenen R, Lüllmann-Rauch R, Goebel HH, Evers M, von Figura K, D'Hooge R, Nagels G, De Deyn P, Peters C, Gieselmann V. "Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93: 14821-14826
 - **Hirahara Y**, Tsuda M, Wada Y, Honke K. "cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-specific regulation of mouse cerebroside sulfotransferase." *Eur J Biochem* **2000**; 267: 1909-1917

- **Jatzkewitz H.** "Two types of cerebroside sulfates as so-called prelipids and storage substances in leukodystrophy of type Scholz (metachromatic form of diffuse sclerosis)." *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **1958**; 311: 279-282
- **Jatzkewitz H, Mehl E, Sandhoff K.** "Blocks in the catabolism of sulphatides and gangliosides as a cause of human neurological disease." *Biochem J* **1970**; 117
- **Karumbayaram S.** "Biochemical and cell culture approach to study the molecular aspects of Metachromatic Leukodystrophy." Bonn, Institut für Physiologische Chemie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität. **2006**
- **Kolter T, Sandhoff K.** "Sphingolipide - ihre Stoffwechselwege und die Pathobiochemie neurodegenerativer Erkrankungen." *Angewandte Chemie* **1999**; 111: 1632-1670
- **Komiyama T, Nakao Y, Toyama Y, Asou H, Vacanti CA, Vacanti MP.** "A novel technique to isolate adult Schwann cells for an artificial nerve conduit." *J Neurosci Methods* **2003**; 122: 195-200
- **Krall WJ, Challita PM, Perlmutter LS, Skelton DC, Kohn DB.** "Cells expressing human glucocerebrosidase from a retroviral vector repopulate macrophages and central nervous system microglia after murine bone marrow transplantation." *Blood* **1994**; 83: 2737-2748
- **McCarthy KD, de Vellis J.** "Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue." *J Cell Biol* **1980**; 85: 890-902
- **Miyakawa A, Ishitani R.** "Butanol extracts from myelin fragments: identification of 5-hydroxytryptamine binding components." *Life Sci* **1982**; 31: 1427-1434
- **Morganti MC, Taylor J, Pesheva P, Schachner M.** "Oligodendrocyte-derived J1-160/180 extracellular matrix glycoproteins are adhesive or repulsive depending on the partner cell type and time of interaction." *Exp Neurol* **1990**; 109: 98-110
- **Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D.** "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." *Science* **1996a**; 272: 263-267
- **Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM.** "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996b**; 93: 11382-11388

- **Ory DS**, Neugeboren BA, Mulligan RC. "A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**; 93: 11400-11406
- **Papst R**. Die Organe und Systeme der Abwehr. In: Benninghoff A. *Anatomie*. München, Wien, Baltimore: Urban & Fischer, **1994**.
- **Pesheva P**, Gloor S, Schachner M, Probstmeier R. "Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism." *J Neurosci* **1997**; 17: 4642-4651
- **Puck TT**, Cieciura SJ, Robinson A. "Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects." *J Exp Med* **1958**; 108: 945-956
- **Rintoul DA, Welti R**. "Thermotropic behavior of mixtures of glycosphingolipids and phosphatidylcholine: effect of monovalent cations on sulfatide and galactosylceramide." *Biochemistry* **1989**; 28: 26-31
- **Schmidt RF, Thews G**. *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, **2000**
- **Schwarz A**, Terstappen GC, Futerman AH. "Isolation of gangliosides by cloud-point extraction with a nonionic detergent." *Anal Biochem* **1997**; 254: 221-225
- **Shapiro LJ**, Aleck KA, Kaback MM, Itabashi H, Desnick RJ, Brand N, Stevens RL, Fluharty AL, Kihara H. "Metachromatic leukodystrophy without arylsulfatase A deficiency." *Pediatr Res* **1979**; 13: 1179-1181
- **Stahl N**, Jurevics H, Morell P, Suzuki K, Popko B. "Isolation, characterization, and expression of cDNA clones that encode rat UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase." *J Neurosci Res* **1994**; 38: 234-342
- **Tanaka K**, Nagara H, Kobayashi T, Goto I. "The twitcher mouse: accumulation of galactosylsphingosine and pathology of the sciatic nerve." *Brain Res* **1988**; 454: 340-346
- **Tanaka K**, Nagara H, Kobayashi T, Goto I. "The twitcher mouse: accumulation of galactosylsphingosine and pathology of the central nervous system." *Brain Res* **1989**; 482: 347-350

- **Trotter J**, Bitter-Suermann D, Schachner M. "Differentiation-regulated loss of the polysialylated embryonic form and expression of the different polypeptides of the neural cell adhesion molecule by cultured oligodendrocytes and myelin." *J Neurosci Res* **1989**; 22: 369-383
- **van Echten-Deckert G**. "Sphingolipid extraction and analysis by thin-layer chromatography." *Methods Enzymol* **2000**; 312: 64-79
- **Yamano T**, Ohta S, Shimada M, Okada S, Yutaka T, Sugita T, Yabuuchi H. "Neuronal depletion of cerebellum in late infantile metachromatic leukodystrophy." *Brain Dev* **1980**; 2: 359-364
- **Yao JK, Rastetter GM**. "Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography." *Anal Biochem* **1985**;
- **Zufferey R**, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery." *J Virol* **1998**; 72: 9873-9880

7 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Volkmar Gieselmann für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, am Institut für Physiologische Chemie der Universität Bonn arbeiten zu dürfen. Ohne seine fortwährende Unterstützung wäre diese Arbeit niemals zu einem Ende gekommen.

Des weiteren möchte ich mich für die zur Verfügung gestellten Schwann-Zellen bei Herrn Dr. Saravanan Karumbayaram und für die Bereitstellung der CHO-Zellen bei Herrn PD Dr. Matthias Eckardt bedanken.

Ich danke auch Frau PD Dr. Penka Pesheva für die Anleitung bei der Präparation der Oligodendrozyten aus Gehirnen neugeborener Mäuse.

Mein Dank gilt genauso der gesamten Arbeitsgruppe Gieselmann am Institut für Physiologische Chemie für die wunderbare Zusammenarbeit in all den Jahren, insbesondere Herrn Dr. Ulrich Matzner für Hilfe und Anregungen bei den Lipidextraktionen, Norbert Rösel, Ivonne Becker, Heidi Simonis und Ayse Öztürk für organisatorische Unterstützung, Ali und Nevzat für die Pflege der Knockout-Mäuse und meinen „Labormädels“ Inge, Anne, Mandy, Anette, Rebekka und Marion für Krisenbewältigung und Motivation.

Ich bedanke mich bei meiner Familie und meinen Freunden, da alle es mir jedes Mal wieder verziehen haben, wenn ich mit der Entschuldigung „Ich war noch im Labor“ zu spät gekommen bin.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern von Herzen danken, da sie mir diesen Werdegang überhaupt erst möglich gemacht haben.