

**Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern,
der**

Ludwig-Maximilians-Universität, München

Direktor: Prof. Dr. med. B. Reichart

**Selektiver Gentransfer in Rattenherzen
Transduktion mittels AAV-2
im heterotopen abdominalen
Transplantationsmodell**

Dissertation

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

vorgelegt von

Lars Burdorf

aus Bonn

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Schmoeckel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus von der Helm
Priv. Doz. Dr. Johannes Rieber

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:**

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2008

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| | Abkürzungen | 5 |
| 1 | Einführung | 7 |
| 1.1 | Hintergrund | 7 |
| 1.2 | Zielsetzungen | 13 |
| 1.3 | Grundlagen | 14 |
| 1.3.1 | Adeno-assoziiertes-Virus (AAV) | 14 |
| 1.3.1.1 | Eigenschaften | 14 |
| 1.3.1.2 | Morphologie | 15 |
| 1.3.1.3 | Zellpenetration | 15 |
| 1.3.2 | Transduktion von Zellen | 17 |
| 1.3.2.1 | Transkription | 17 |
| 1.3.2.2 | Translation | 17 |
| 1.3.3 | Markergene | 19 |
| 1.3.3.1 | Green-fluorescent-Protein-Gen (GFP) | 19 |
| 1.3.3.2 | LacZ | 21 |
| 2 | Methodik | 22 |
| 2.1 | Materialien | 22 |
| 2.2 | Versuchstiere | 24 |
| 2.3 | Vektoren | 24 |
| 2.4 | Gliederung der Versuche | 25 |
| 2.4.1 | Etablierung des Gentransfer-Modells | 25 |
| 2.4.2 | Transduktion von Rattenherzen mittels AAV-Vektoren | 26 |
| 2.5 | <i>In vivo</i> Versuche | 27 |
| 2.5.1 | Versuchsablauf der heterotopen Herztransplantation | 27 |
| 2.5.1.1 | Narkose | 27 |
| 2.5.1.2 | Chirurgische Technik | 27 |
| 2.5.2 | Versuchsablauf der systemischen intravenösen Transduktion | 33 |
| 2.5.2.1 | Narkose | 33 |
| 2.5.2.2 | Chirurgische Technik | 33 |
| 2.5.3 | Versuchsablauf der direkten Skelettmuskel-Transduktion | 34 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5.3.1 | Narkose | 34 |
| 2.5.3.2 | Chirurgische Technik | 34 |
| 2.5.4 | Postoperativer Verlauf | 35 |
| 2.5.5 | Organexplantation | 36 |
| 2.5.6 | Organasservation | 37 |
| 2.6 | Organanalyse | 38 |
| 2.6.1 | Markergenanalyse | 38 |
| 2.6.2 | Expressionsanalyse | 39 |
| 3 | Ergebnisse | 41 |
| 3.1 | Etablierung der Technik der heterotopen abdominelle Herztransplantation | 41 |
| 3.2 | Ergebnisse der Transduktion von Rattenherzen mittels AAV-Vektoren | 43 |
| 3.2.1 | Fallzahlen | 43 |
| 3.2.2 | Ergebnisse der indirekten koronaren Transduktion | 45 |
| 3.2.3 | Ergebnisse der systemischen intravenösen Transduktion | 48 |
| 3.2.4 | Ergebnisse der lokalen Skelettmuskeltransduktion | 48 |
| 4 | Diskussion | 51 |
| 5 | Zusammenfassung | 60 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 62 |
| 7 | Anhang | 70 |
| 8 | Danksagung | 71 |
| 9 | Lebenslauf | 72 |

Abkürzungen

Abkürzungen

| | |
|-------|---|
| AAV | Adeno-assoziiertes-Virus |
| Abb. | Abbildung |
| bzw. | beziehungsweise |
| cm | Zentimeter |
| d | Tag |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FGFR1 | Fibroblast-growth-factor-receptor-1 |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| h | Stunde |
| hnRNA | heterogene RNA |
| HSPG | Heparan-Sulfate-Proteoglycan |
| HTX | Herztransplantation |
| i.m. | intramuskulär |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| kb | Kilobasen |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| LAD | Left anterior descending (Koronargefäß) |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| µl | Mikroliter |
| n | number (Anzahl) |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| rAAV | rekombinantes Adeno-assoziiertes-Virus |
| RNA | Ribonukleinsäure |

Abkürzungen

| | |
|------|---------------------------|
| sec | Sekunden |
| s.u. | siehe unten |
| Tab. | Tabelle |
| tRNA | transfer Ribonukleinsäure |

1 Einführung

1.1 Hintergrund

Organtransplantationen können vor einem frühzeitigen Tod bewahren und die Zeit eines chronischen Krankheitsleidens beenden. Insbesondere bei Krankheiten, die mit einer irreversiblen Schädigung eines Organs einhergehen, wie zum Beispiel bei einer fortgeschrittenen dilatativen Kardiomyopathie, Lungenfibrose oder auch postinfektiösen Krankheitszuständen, stellt eine Transplantation oft die letzte Option einer kurativen Therapie dar.

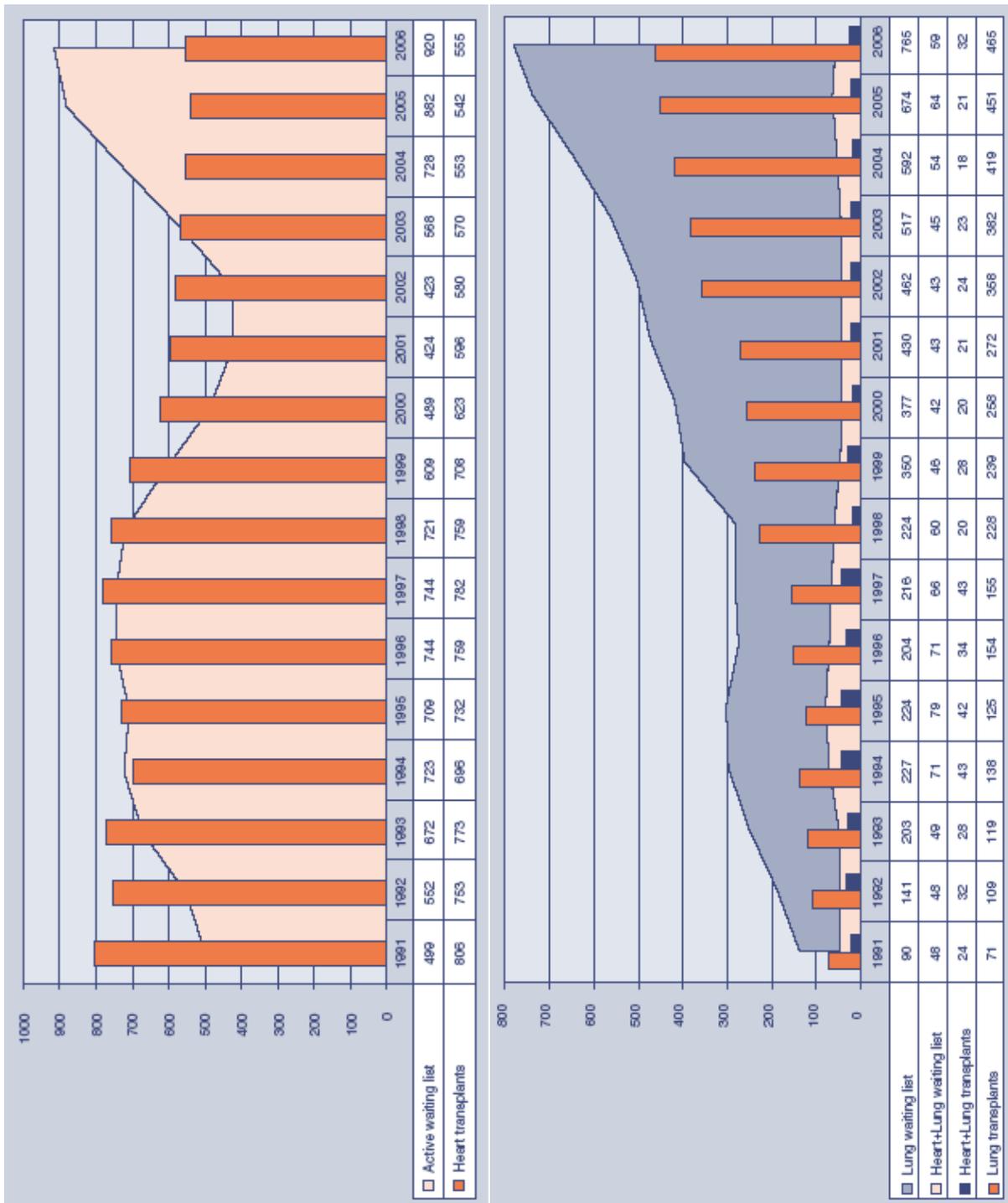
Nachdem in den letzten Jahrzehnten die Transplantation immer mehr zur Routine geworden ist und somit von einer immer größer werdenden Zahl an Kliniken durchgeführt wird, steht diese Behandlungsmöglichkeit einer ständig wachsenden Zahl an Patienten zur Verfügung. Gleichzeitig konnte die postoperative Lebensqualität, im Wesentlichen bedingt durch deutlich verbesserte Immunsuppressiva mit weniger Nebenwirkungen und erhöhter Wirksamkeit, gesteigert werden. Die Konsequenz aus dieser Entwicklung ist, dass der Bedarf an Spenderorganen steigt.

Im Gegensatz dazu bleibt das Angebot an Spenderorganen weit hinter der Nachfrage zurück, so dass, abhängig vom benötigten Organ, bis zu 20% der gelisteten Patienten versterben, bevor für sie ein passendes Transplantat gefunden werden kann (Eurotransplant Statistik). Ein weiterer Grund für den Mangel an Spenderorganen ist auch in der verbesserten Notfall- und Intensivmedizin zu sehen: der medizinische Fortschritt ermöglicht bei Schwerverletzten und Polytrauma-Patienten eine frühzeitige, genaue Diagnostik und damit auch gezielte Therapie durchzuführen. Diese Patienten, die früher als potentielle Organspender in Frage kamen, können heute vielfach gerettet werden.

In der Tabelle 1 sind die Transplantations-Statistik der europaweit durchgeführten Organtransplantationen und die entsprechenden Wartelisten für Herz-, Herz-Lungen- und Lungentransplantation dargestellt (Quelle: Eurotransplant, Jahresbericht 2006). Es wird ersichtlich, dass in den letzten Jahren bezüglich aller Organe der Bedarf an Transplantaten deren Verfügbarkeit deutlich übertrifft.

Derzeit müssen Patienten in der Regel ein Jahr auf die Transplantation von Herz, Lunge oder Leber warten.

1 Einführung



Tab. 1 Entwicklung der Herz-, Herz-Lungen- und Lungentransplantationszahlen und entsprechender Warteliste im Zeitraum 1991-2006 (Quelle: Eurotransplant, Jahresbericht 2006)

1 Einführung

Eine Möglichkeit, dem Organmangel entgegenzuwirken, stellt die Aufklärung der Bevölkerung über Organtransplantationen dar, um die Bereitschaft zur Organspende zu steigern. Durch Änderung des Transplantationsgesetzes von einem sogenannten informed Consent (auch: Opting-in system / Family Consent), bei dem es der ausdrücklichen Zustimmung durch den Verstorbenen selbst (Organspender-Ausweis) oder eines Familienangehörigen bedarf, zu einem presumed Consent (auch: Opting-out system), bei dem nur im Falle der Ablehnung einer Organspende der entsprechenden Personen, die Organe nicht gespendet werden, könnte eine Zunahme des Organangebots erzielt werden. Zahlen von Eurotransplant belegen, dass in Österreich, Spanien und Belgien, in denen der Rechtslage nach ein presumed Consent besteht, deutlich höhere Spenderzahlen zu verzeichnen sind (z.B. Spanien 27, Österreich 24 Spender pro Millionen Einwohner und Jahr), als in den anderen, Eurotransplant-zugehörigen Staaten mit informed Consent (z.B. Niederlanden 16 Spender, Deutschland 13 Spender; Quelle: Transplantationszentrum Tübingen).

Da es sehr unwahrscheinlich erscheint, dass eine Gesetzesänderung durchgesetzt oder die allgemeine Spendebereitschaft gesteigert werden kann, ist eine deutliche Ausweitung des Organangebotes nicht zu erwarten.

Abhilfe könnte hier die Forschung schaffen, die verschiedene Strategien verfolgt, die Letalität von schwerkranken Patienten zu senken:

- **Assist-Devices** – auch Kunstherzen genannt – konnten soweit perfektioniert werden, dass sie suffizient die Herzfunktion eines Menschen ersetzen können. Es gibt Devices, die voll-implantierbar sind (z.B. Jarvik 2000), bei anderen befinden sich die Ventrikel (Herzkammern) extracorporal (z.B. Berlin Heart). Gemein ist diesen Kunstherzsystemen jedoch, dass sie mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität einhergehen. Sie machen eine kontinuierliche, strikte Antikoagulation erforderlich und durch die benötigte Stromversorgung der Geräte ist eine ständige Abhängigkeit vom Akku, beziehungsweise Stromnetz, gegeben.

Patienten mit Kunstherz-Systemen haben aufgrund der großen, mit Blut in Kontakt kommenden Fremdoberfläche der Geräte ein hohes Risiko für thrombembolische Ereignisse und sind bedingt durch die Eintrittsstellen von Schläuchen und Kabeln anfällig für lokale und systemische Infektionen.

1 Einführung

- Das Ziel der pharmakologischen Forschung ist es, neue **Medikamente** zu entwickeln, die ein Fortschreiten einer bereits bestehenden Herzinsuffizienz verhindern sollen, um somit Patienten vor einer Transplantation bewahren zu können. Andererseits muss die immunsuppressive Therapie eines Organempfängers gewährleisten, dass ein bereits transplantiertes Organ möglichst lange seine volle Funktion erfüllt. Dies bedeutet, dass Abstoßungsreaktionen, unerwünschte Nebenwirkungen von Medikamenten oder auch Spätfolgen, wie zum Beispiel die Transplantatvaskulopathie, die häufig zur Re-Transplantation führt, weitestgehend verhindert werden müssen.

Obwohl auch hier wesentliche Fortschritte durch die Entwicklung neuer und wirksamerer Medikamente erzielt werden konnten, verbleibt eine Vielzahl an schwer erkrankten Patienten, die alleine durch eine medikamentöse Therapie nicht ausreichend zu therapieren sind.

- Das Züchten von neuem Gewebe oder gar ganzer Organe aus körpereigenen Stammzellen ist das Ziel der **Stammzellforschung**. Aus pluripotenten Stammzellen ist es theoretisch möglich, durch Differenzierung jede Art von Gewebe zu erzeugen [Fenno, 2008]. Würde dies nun dem Individuum, von dem die entsprechenden Stammzellen entnommen wurden, transplantiert werden, könnte man von einer Autotransplantation sprechen, da es sich im Grunde um körpereigenes Gewebe handelt. Eine Immunsuppression müsste hier nicht durchgeführt werden.

Bisher ist es nicht gelungen, die Stammzellforschung soweit voranzutreiben, dass Gewebe, welches mit dieser Technologie erzeugt wurde, in einen Menschen transplantiert werden konnte. Im Wesentlichen ist dies in dem Risiko begründet, dass durch die Pluripotenz der Stammzellen Tumore erzeugt werden können, die sich im Empfänger entwickeln [Lensch, 2006].

- Eine weitere Möglichkeit dem Organmangel zu begegnen, könnte die Verwendung xenogener Organe darstellen:

Die **Xenotransplantationsforschung** beschäftigt sich mit der Möglichkeit, tierische Organe in den Menschen zu transplantieren. Das Schwein zeichnet sich insbesondere bezüglich Anatomie, Größe der Tiere / Organe und auch bezüglich der Verfügbarkeit

1 Einführung

(Wurfgröße meist 8-12 Ferkel) als geeignetes Spendertier aus.

Schwerkranken Patienten könnte ein Organ transplantiert werden, welches in erforderlichem patientenspezifischem Gewicht, ohne Wartezeit verfügbar wäre. Weiterhin ist es möglich, dass die Spendertiere kliniknah gehalten werden, um bei einer Transplantation lange Ischämiezeiten zu vermeiden.

Bei Xenotransplantationen laufen Abstoßungsreaktionen wegen der phylogenetischen Distanz zwischen Mensch und Tier in der Regel heftiger ab und treten auch schneller ein, als dies nach Allotransplantation der Fall ist.

Um den sicheren klinischen Einsatz von Xenotransplantaten zu ermöglichen, muss, wie in der Allotransplantation auch, gewährleistet sein, dass die verschiedenen Abstoßungsreaktionen (s. Tab.2) verhindert werden können.

| | Transplantat-funktion | Zeitintervall | Mechanismus | Histologie |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------|---|---|
| Hyperakute Abstoßung | keine | Minuten bis Stunden | Präformierte AK Komplement-disposition | Interstitielle Hämorrhagie Ausgedehnte Thrombosen |
| Akute zelluläre Abstoßung | vorübergehend vorhanden | Tage bis Wochen | Präformierte und induzierte AK Komplement-disposition | Endothel-Schwellung Thrombosen, DIC Fokale Ischämie |
| Akute humorale Abstoßung | vorübergehend vorhanden | Tage bis Wochen | Geringe Komplement-disposition Mononukleäres Infiltrat | |
| Chronische Abstoßung | progrediente Dysfunktion | Monate bis Jahre | Vaskuläre Veränderungen * | Koronarsklerose z.T. Nekrosen * |

Tab.2 Abstoßungsphasen nach Xenotransplantation (* vermutlich, da Ergebnisse bisher nicht vorliegend)

1 Einführung

Obwohl es gelungen ist, die hyperakute Abstoßung von Xenotransplantaten, die aufgrund des Vorliegens präformierter xenoreaktiver IgM Antikörper und einer Aktivierung des Komplementsystems zustande kommt, mit molekularbiologischen Methoden zu verhindern [Schmoeckel, 1996], ist es mit den heute bekannten und verfügbaren Immunsuppressiva nicht möglich, die anderen Stadien der Abstoßung zu unterdrücken. Daher werden diverse Konzepte zur Induktion immunologischer Toleranz gegen das Xenotransplantat geprüft.

Im Mittelpunkt der heutigen Forschung steht die gezielte genetische Veränderung der tierischen Antigenstruktur. Es werden Tiere gezüchtet, welche menschliche Proteine an der Zelloberfläche überexprimieren, die regulatorische Aufgaben der Komplementsystemaktivierung oder der Gerinnungskaskade aufweisen. Als Beispiele sind hier hDAF (humaner decay accelerating factor), MCP (membrane cofactor protein), CD59 oder auch hTM (humanes Thrombomodulin) zu nennen. Die Züchtung von knock-out (KO) Schweinen, bei denen hingegen porcine Gene eliminiert werden, ist eine weitere Möglichkeit um die Antigenität von Xenotransplantaten zu senken. Insbesondere wird Hoffnung in die Verwendung von GalT-KO Schweine gelegt, bei der es zu keiner Expression von GalT-Epitopen mehr kommen soll [Tai HC, 2007].

Es zeigt sich jedoch, dass die Generierung solch transgener Tiere äußerst aufwendig ist und nur in wenigen Fällen gelingt.

Ein vielversprechender Ansatz, der immer mehr Beachtung findet, ist die selektive gentechnische Veränderung von Zellen und Organen mit Hilfe von viralen Vektoren. Bei ihnen handelt es sich um virale Kapside (Hüllstrukturen), in die, nach Entnahme der viralen genetischen Information, ein Transgen eingebracht werden kann. Die Vektoren werden von Zellen aufgenommen und durch Freigabe der integrierten Transgene im Nukleus kommt es zum Gentransfer. Zur Verwendung kommen im Wesentlichen Vektoren, die auf der Basis von Adeno-, Herpes-, Lenti- oder auch Adeno-assoziierten Viren hergestellt werden. Abhängig von Vektor-Art und ihrer Applikationsweise differieren Gentransfereffizienz und Transgenexpressionsrate.

1.2 Zielsetzungen

- 1) Primäres Ziel der vorliegenden Studie ist es, eine Methode zu etablieren, in der selektiv Vektoren zur gentechnischen Veränderung am Rattenherz appliziert werden können.
- 2) In diesem Modell soll dann sekundär untersucht werden, ob es möglich ist, mittels eines Adeno-assoziierten-Virus (AAV) eine Genübertragung, insbesondere in kardiale Endothelzellen aber auch Kardiomyozyten, zu erreichen.

Es werden hierfür verschiedene Applikationsweisen auf ihre Effizienz geprüft:

- a) In einer Versuchsreihe werden abdominale heterotope Herztransplantationen an Ratten durchgeführt, im Rahmen derer eine indirekte koronare Injektion der AAV-Vektoren erfolgen soll.

Als Kontrollen werden die viralen Vektoren auch

- b) systemisch (i.v.) und
- c) lokal (i.m.) appliziert

Bei den Markergenen, die durch die Vektoren übertragen werden, handelt es sich um das Green-fluorescent-Protein- (GFP), sowie das β -Galaktosidase-Gen (LacZ). Die Organe der transduzierten Ratten werden 28 Tage postoperativ zur Analyse der Markergen-Expressionsrate explantiert.

Sollte gezeigt werden können, dass Organe oder Transplantate mittels dieser Technik gentechnisch verändert werden können, wäre in Zukunft eine Übertragung von Genen mit immunregulatorischen oder immunsuppressiven Eigenschaften möglich.

1.3 Grundlagen

1.3.1 Adeno-assoziiertes-Virus (AAV)

Die Bezeichnung der Adeno-assoziierten-Viren rührt daher, dass Viren dieser Gruppe erstmals als Kontamination in Adenovirus-Isolaten gefunden wurden. Bekannt sind bisher 12 Serotypen (AAV-1 bis AAV-12) [Srivastava, 2008], wobei die Typen 2, 3 und 5 den Menschen infizieren können und bei einem Großteil der erwachsenen Bevölkerung Antikörper im Blut gegen diese AAV-Serotypen gefunden werden [Zaiss, 2008]. Da pathologische Eigenschaften dem Mensch gegenüber nach heutigem Wissensstand nicht vorhanden sind [Warrington KH Jr], werden diese Serotypen von der zentralen Kommission für die biologische Sicherheit (ZKBS) der Risikogruppe 1 (S1) zugeordnet. Eine natürliche Infektion des Menschen mit AAV-1, -4 und -6 kommt nicht vor. Da diese Serotypen aus dem Affen isoliert wurden, ist ihre Apathogenität dem Menschen gegenüber nicht gesichert. Somit werden diese Serotypen in die Risikogruppe 2 (S2) eingruppiert. AAV-9 wurde mittels PCR aus humanem Gewebe isoliert und mit Hilfe von serologischen Kreuzexperimenten als neuer Serotyp beschrieben. Ebenfalls als neue Serotypen identifiziert wurden AAV-7, -8, -10, -11 und AAV-12, die auch aus Cynomolgus-Affen isoliert wurden [Mori, 2004]. Sie sind in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu infizieren, bislang wurden sie aber beim Menschen nicht isoliert.

Die am häufigsten verwendeten AAV-Vektoren basieren auf dem Serotyp 2 [Büning, 2008].

1.3.1.1 Eigenschaften

Das AAV ist ein kleines DNA-Einzelstrangvirus, welches der Gruppe der Parvoviren angehört. Es ist in der Lage, sowohl proliferierende, als auch ruhende Zellen zu infizieren, ohne dass dabei eine Immunreaktion hervorgerufen oder die Morphologie und das Wachstum der Zelle beeinflusst wird [Choi, 2005]. Adeno-assoziierte-Viren selbst sind replikationsinkompetent und benötigen zur Vermehrung die Anwesenheit eines Helfervirus

1 Einführung

(z.B. Adenovirus, Herpes simplex Virus Typ I und Typ II, Cytomegalievirus oder humanes Herpesvirus-6) [Atchinson, 1965]. Sie integrieren ihre DNA an eine spezifische chromosomale Lokalität und führen zu einer stabilen Transfektion mit lang andauernder Genexpression [Li, 2003].

Als Vektoren eingesetzt sind sie in der Lage, Gene mit einer maximalen Größe von 6,0 kb zu übertragen [Grieger, 2005].

1.3.1.2 Morphologie

Das AAV besteht aus einem isohedralem Protein-Kapsid und einer einsträngigen DNA. Diese weist eine Länge von 4675 Nukleotiden auf.

1.3.1.3 Zellpenetration

Die intrazelluläre Aufnahme der Adeno-assoziierten-Viren geschieht über Endozytose [Büning, 2003]. Hierbei bindet AAV an Heparan-sulfate-Proteoglycan (HSPG) der äußeren Zellmembran (①,②). Nach Verbindung mit Fibroblast-growth-factor-receptor-1 (FGFR1) und dem Integrin $\alpha v \beta 5$ (③) kommt es zur Aufnahme von AAV in die Zelle über Clathrin-coated vesicles (④,⑤).(siehe Abb.1)

Dieser Prozess erfolgt sehr schnell, so dass die Halbwertszeit der AAV unter 10 min liegt. Im Zytoplasma wird das Virus aus den Vesikeln freigegeben (⑥) und wandert zum Nukleus, in den es wahrscheinlich über Zellkernporen (Nuclear pore complex) gelang (⑦). Bereits nach 2 Stunden ist es möglich im Kern virale DNA nachzuweisen.

1 Einführung

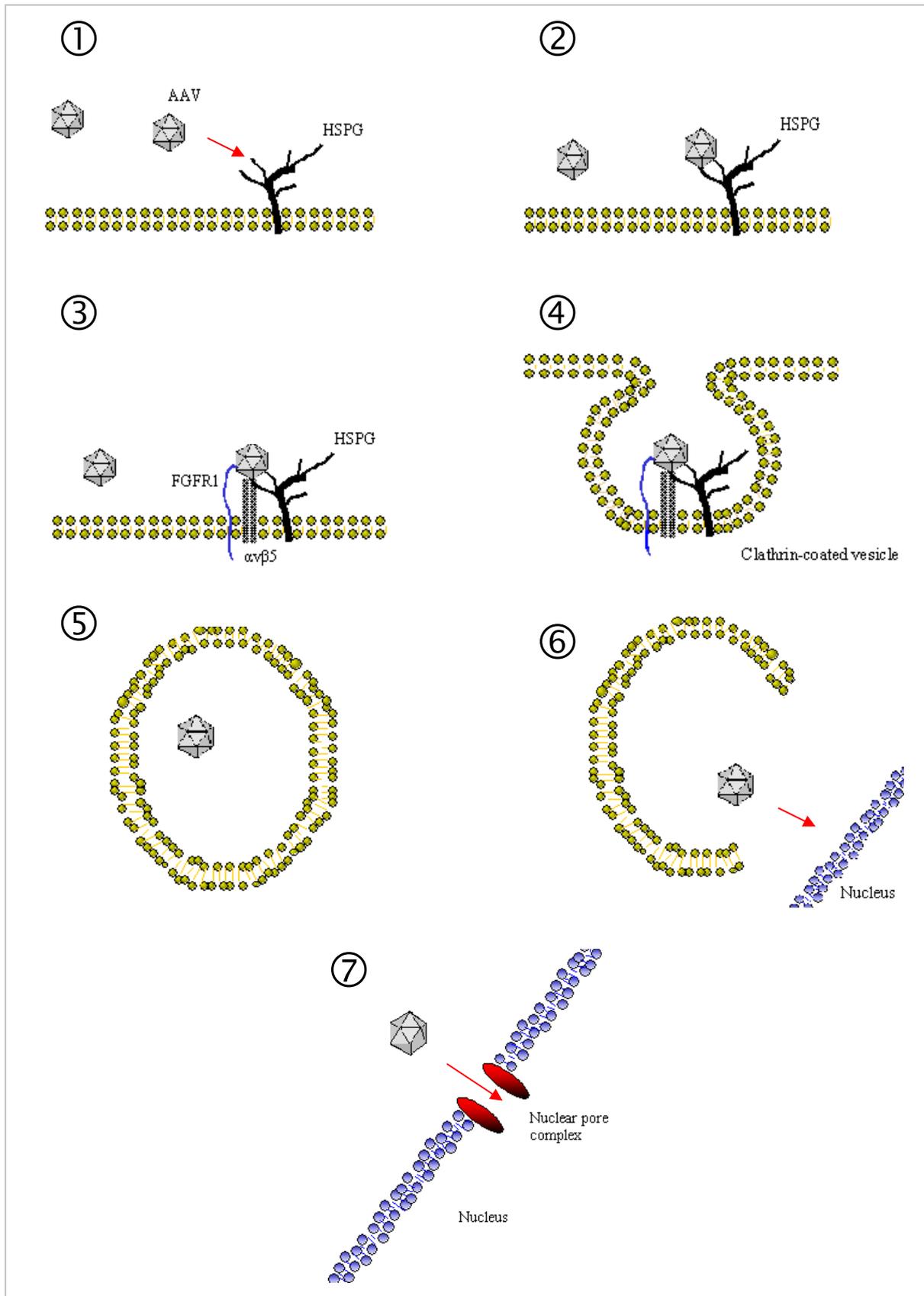


Abb.1 Zellpenetration von AAV

1.3.2 Transduktion von Zellen

Die Transduktion stellt eine Methode zur Einschleusung heterologer DNA in Eukaryontenzellen dar.

Die Gene, die auf dem AAV-Vektor liegen, werden, wie in Abb.2 dargestellt, durch Endozytose in die Zelle aufgenommen. Dort wird die DNA in den Nukleus transportiert und transkribiert.

1.3.2.1 Transkription

Unter Transkription versteht man den Vorgang, bei dem anhand einer DNA-Matrizenvorlage eine komplementäre RNA gebildet wird. Dabei wird nie das gesamte Genom transkribiert, sondern immer nur ein kleiner Bereich – ein Gen. Die entsprechenden Enzyme, die eine Transkription katalysieren, sind die DNA-abhängigen RNA-Polymerasen. In Eukaryonten entsteht als primäres Transkript die sogenannte heterogene RNA (hnRNA), die noch im Zellkern selbst zur messenger RNA (mRNA) umgebaut wird. Diese wird dann aus dem Nukleus in das Zytosol ausgeschleust, wo sie zu den Ribosomen diffundiert und mittels der Translation das entsprechende Protein gebildet wird.

1.3.2.2 Translation

Die mRNA, die im Kern gebildet wurde, bindet an Ribosomen, wo ihre genetische Information abgelesen wird. Anhand der Sequenz der Basen des mRNA-Strangs ist eine spezifische Reihenfolge von Aminosäuren festgelegt. Transfer RNA (tRNA) bindet im Zytoplasma an die entsprechenden Aminosäuren und transportiert diese zu den Ribosomen. Hier entsteht aus den einzelnen Aminosäuren eine Polypeptidkette, ein Protein.

In unserer Studie wurde ein rekombinantes Adeno-assoziiertes-Virus Serotyp 2 (rAAV-2) als Vektor und Green-fluorescent-Protein- (GFP) sowie das LacZ-Gen als Markergene verwendet (s.Abb.2).

1 Einführung

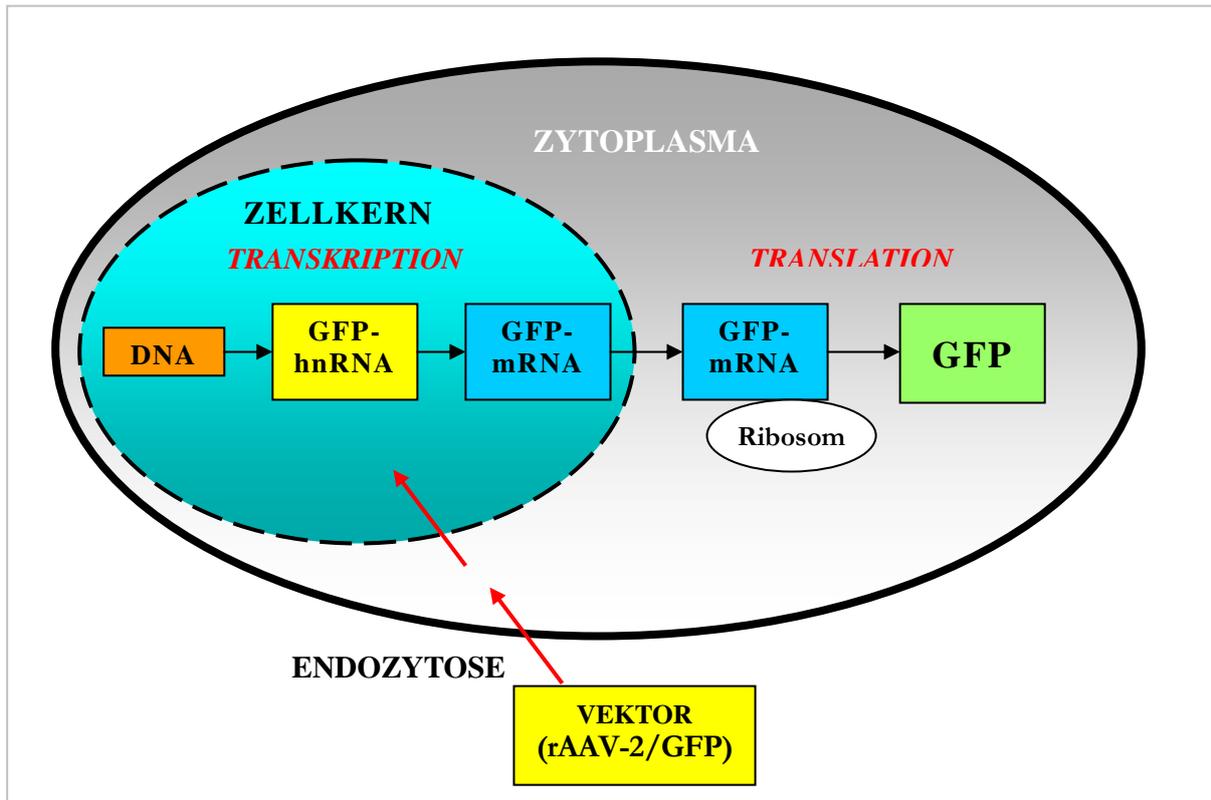


Abb.2 Transduktion einer Eukaryontenzelle mit rAAV-2/GFP

1.3.3 Markergene

Bei Markergenen handelt es sich um Gene, die über einen Vektor (z.B. AAV) in Zellen oder bestimmte Gewebe eingeschleust werden können. Anhand ihrer spezifischen Eigenschaften, wie beispielsweise der Produktion eines bestimmten Proteins oder Enzyms, kann die Effizienz wie auch der Ort des Gentransfers (Gewebe/Zellen) leicht überprüft werden.

1.3.3.1 Green-fluorescent-Protein-Gen (GFP)

Das GFP-Gen hat eine Größe von 0,76 kb und kodiert für das Green-fluorescent-Protein, bei dem es sich um ein kleines, äußerst stabiles Protein handelt, welches aus der *Aequorea victoria*, einer grün fluoreszierenden Tiefseequalle (s.Abb.3) stammt. GFP wurde in den sechziger Jahren zufällig bei der Reinigung von Aequorin entdeckt [Prasher DC, 1992].

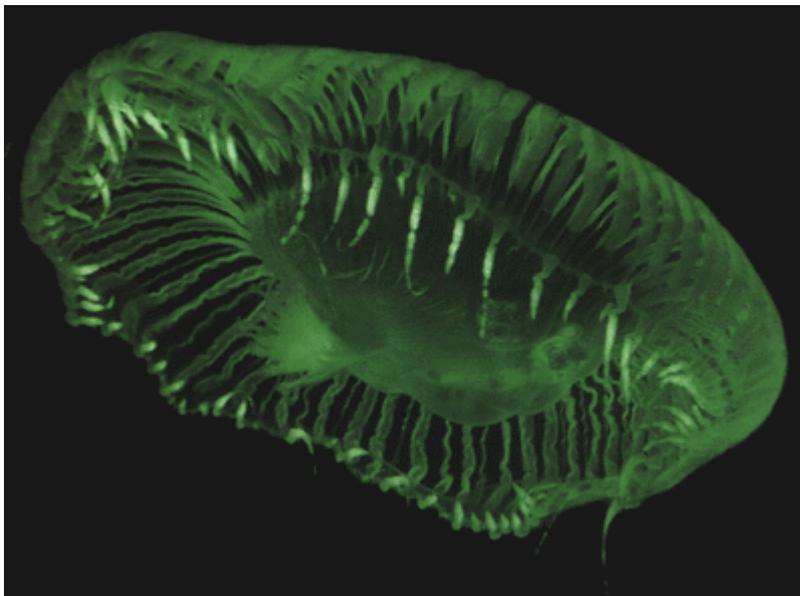


Abb.3 *Aequorea victoria*

Struktur von GFP

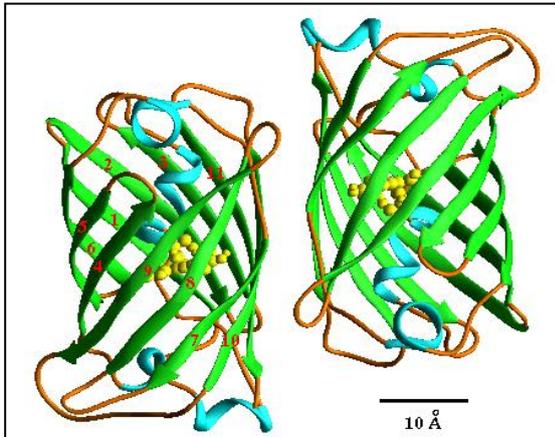


Abb.4 Darstellung der GFP-Struktur

GFP besteht aus 238 Aminosäuren. Es ist ein 11-strängiges β -Barrel, das in seiner Achse von einer Alpha-Helix durchwunden ist (s. Abb. 4). Als Teil dieser Alpha-Helix sitzt das Chromophor genau in der Mitte des Barrels. Das Chromophor ist ein p-Hydroxybenzylidenimidazolinon, das aus den Aminosäuren der Positionen 65-67 durch Faltung gebildet wird. Diese Aminosäuren sind im Wildtyp Serin, Tyrosin und Glycin. Zum Wildtyp-GFP sind bislang vier Isoformen bekannt, die aber keine abweichenden Eigenschaften zum Wildtyp zeigen. Durch einzelne Punktmutationen, durch die die Struktur des Chromophors modifiziert ist, können aber GFP-Mutanten (Alloformen) entstehen, die jedoch strukturell dem Wildtyp entsprechen.

Eigenschaften von GFP

GFP kann in Zellen, in denen es exprimiert wird, auch in den Kern und kleine Plasmaausstülpungen diffundieren. Durch blaues und UV-Licht kann es *in vivo* und *in vitro* zur Fluoreszenz angeregt werden, so dass diese Strukturen sichtbar gemacht werden können.

GFP kann mit anderen Proteinen an deren N- oder C-Ende gekoppelt werden, ohne dass die fluoreszierenden Eigenschaften von GFP und die Funktion der Proteine, an die GFP gekoppelt wurde, verloren gehen.

Da für die Fluoreszenz keine exogenen Substrate oder Ko-Faktoren benötigt werden, ist es möglich, GFP als Marker zur Gen-Expression und Protein-Lokalisation zu verwenden.

1 Einführung

Detektion von GFP

Wie oben bereits erwähnt, ist die GFP-Detektion unter Blau- oder UV-Licht durch die Fluoreszenz möglich. Um eine Detektion im Fluoreszenzmikroskop zu erreichen, ist es jedoch Voraussetzung, dass die GFP-Konzentration hoch genug ist, um die Eigenfluoreszenz der Zelle zu übertreffen.

Eine weitere Möglichkeit ist der immunhistochemische Ansatz.

Hierfür steht ein polyklonaler anti-GFP Antikörper zur Verfügung, mit dessen Hilfe ein indirekter Nachweis von GFP erfolgen kann. Dies ist auch bei nur geringen Konzentrationen von GFP möglich.

1.3.3.2 LacZ

Das LacZ-Gen wurde als eines der ersten Markergene verwendet. Es ist ein E. coli eigenes Gen, welches im Genom des Wildtyps enthalten ist und für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. Es hat eine Größe von 3 kb. Da die meisten anderen Genome kein LacZ enthalten, kann es als Markergen eingesetzt werden.

Eigenschaften und Detektion von β -Galaktosidase

Das Enzym β -Galaktosidase spaltet das Disaccharid Lactose in die beiden Bestandteile Glucose und Galactose.

Auch das synthetische Substrat 5-Brom-4-chlor-indolyl- β -D-galaktosid (XGal) kann durch das Enzym gespalten werden, was zur Entstehung eines blauen Indigofarbstoffs führt. Zellen, die das LacZ-Gen aufgenommen haben und β -Galaktosidase exprimieren, können somit in der X-Gal-Färbung durch ihre blaue Färbung unter dem Mikroskop detektiert werden.

2 Methodik

2.1 Materialien

Instrumente:

Skalpell Nr. 11, 22 (disposable scalpel) Feather, Osaka, Japan

2 Pinzetten, fein, rund (JFC-7) S&T AG, Neuhausen, Schweiz

Koronar-Pinzette (SF9) MIC Medical Instrument Corporation, in Solothurn, Schweiz

Chirurgische Pinzette, fein (BD 537), Aesculap AG, Tuttlingen

Koronar-Nadelhalter (CH 8135-21) , Aesculap AG, Tuttlingen

Nadelhalter, fein

Materialschere, kräftig

Schere, fein (BC 603 R), Aesculap AG, Tuttlingen

Mikro-Schere (15003-08) Fine Science Tools, Heidelberg

Satinsky-Klemme (24-466-04), KLS Martin L.P., Jacksonville, USA

2 Metallretractoren (Eigenbau aus großen Büroklammern)

2 Metallgefäße (Martinit 18/8), Bergheim

Kauter (Aaron Medical), Bovie Medical Corporation St. Petersburg, USA

Fäden:

Prolene 8-0 (EH 7828E), Ethicon Products Deutschland, Norderstedt/Glashütte

Prolene 3-0 (EH 7923), Ethicon Products Deutschland, Norderstedt/Glashütte

Ethibond 6-0 (EXCEL 6912H), Ethicon Products Deutschland, Norderstedt/Glashütte

2 Methodik

Gebrauchsutensilien:

Kanülen (BD Microlance 3, 21G, 25G, 27G), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Spritzen (BD Plastipak 1ml, 2ml, 10ml), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Kompressen (10x10cm, 5x5cm), NOBA, Wetter

Leukoplast Pflaster (1cm Breite), BSN medical, Hamburg

Viggo rosa (BD Insyte-W 20 GA), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Cutasept F Desinfektionsspray (Bode-Chemie Hamburg)

Wärmekissen

Operationsbrett (Korg)

Ether-Topf

Wattestäbchen (handelsüblich)

Einmal-Rasierer (handelsüblich)

Medikamente:

Diethylether, Herdinger, Stuttgart

Narcoren (Pentobarbital-Natrium), Merial, Hallbergmoos

Refludan (Lepirudin), Bayer Schering Pharma AG, Berlin

Custodiol/HTK nach Bretschneider, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein

NaCl 0,9%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Prograf (Tacrolimus), Astellas, München

Isopentan, Sigma, Taufkirchen

Zellmedien:

EBM, Firma PAA Laboratories, Cölbe

FCS, Firma PAA Laboratories, Cölbe

2.2 Versuchstiere

In den Experimenten wurden männliche Ratten vom Typ Sprague Dawley mit einem Körpergewicht von 250 bis 300g als Versuchstiere verwendet. Es handelt sich bei diesem Rattenstamm um einen Auszuchtstamm. Die Ratten wurden über Charles River Wiga GmbH; 97633 Sulzfeld bezogen.

Die Tiere wurden bei 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung, Marchioninstr. 27, 81377 München, gehalten. Sie erhielten handelsübliche Nagerdiät und Wasser ad libitum.

2.3 Vektoren

In vitro Untersuchungen an Schweine-Endothelzellkulturen haben gezeigt, dass die Transfektionseffizienz der Zellen (>88%) bei Verwendung von AAV Serotyp 2 wesentlich höher ausfällt, als dies bei den anderen getesteten Serotypen der Fall war (Buening et al., nicht publiziert). Auf Grund dieser Erkenntnis wurden für die Studie Vektoren verwendet, die auf dem Adeno-assoziiertes-Virus Serotyp 2 (AAV-2) basieren.

Der verabreichte Vektortiter betrug 7.5×10^{11} - 1.7×10^{12} genome copies [GC]/ Tier.

Wie bereits zuvor erwähnt, kam sowohl GFP- als auch LacZ-Gen als Markergen zum Einsatz.

Die verwendeten Vektoren wurden von Frau Natascha Schuhmann, Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt.

2.4 Gliederung der Versuche

2.4.1 Etablierung des Gentransfer-Modells

Ziel der Versuche ist, im Rahmen eines Transplantationsmodells Rattenherzen selektiv gentechnisch über virale Vektoren modifizieren zu können.

Hierfür wird einer Spenderratte das Herz entnommen, mit viralen Vektoren intrakoronar perfundiert und anschließend in das Abdomen einer Empfängerratte transplantiert.

Zur Etablierung dieser Technik wird primär die Präparation, Applikation eines Perfusats (hier: Kardioplegie) über die Aorta ascendens und die folgende Explantation des Spenderorgans durchgeführt. An denselben (verstorbenen) Tieren wird im Anschluss das Abdomen eröffnet und der infrarenale Gefäßstamm für die spätere Transplantation präpariert.

In einer zweiten Serie wird das explantierte Organ in eine Empfängerratte heterotop abdominell transplantiert. Nach Öffnen der Gefäßklemme wird die Aufnahme der Kontraktion beobachtet und eventuelle Blutungen an den Gefäßanastomosen identifiziert.

Erst nachdem die Durchführung der Transplantation sicher erfolgt und eine nur geringe Ausfallrate besteht, werden virale Vektoren verabreicht.

Die genaue technische Darstellung und Beschreibung der Transplantation ist in Kapitel 2.5 dargestellt.

2.4.2 Transduktion von Rattenherzen mittels AAV-Vektoren

Nach Etablierung des Modells wurde die Transduktionseffizienz eines AAV-vermittelten Gentransfers anhand von Markergenen überprüft.

Es wurden drei Applikationsvarianten untersucht:

1. lokale / indirekte koronare Transduktion während einer abdominalen herterotopen Herztransplantation (HTX) an Sprague Dawley-Ratten

Durch die Applikation der Vektoren als Koronarperfusat wurde die intrazelluläre Aufnahme aus einem intakten Gefäßsystem getestet.

2. systemische intravenöse Transduktion von Sprague Dawley-Ratten

Um eventuelle Einflüsse der operativen Technik auf die Transfektionsrate auszuschließen, wurde in diesen Versuchen eine systemische, intravenöse Injektion der Vektoren durchgeführt. Hierbei wurde sowohl die Markergen-Expression am Herzen als auch an anderen Organen überprüft.

3. direkte Transfektion eines Skelettmuskels an Sprague Dawley-Ratten

Durch das direkte Einspritzen von AAV-Vektoren in einen Skelettmuskel wurde die Transduzierbarkeit von Myozyten überprüft.

2.5 *In vivo* Versuche

Die durchgeführten Tierversuche wurden gemäß Tierschutzgesetz von der Regierung von Oberbayern als zuständiger Behörde unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-11/04 genehmigt.

2.5.1 Versuchsablauf der heterotopen Herztransplantation

2.5.1.1 Narkose

Die Induktion der Narkose wird durch Betäubung im Ether-Topf durchgeführt. Nach einer Zeit von ca. 30-60 sec verlieren die Ratten das Bewusstsein und können aus dem Ether-Topf genommen werden. Es folgt eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (Merial, Hallbergmoos) (60mg/kgKG i.p.). Nachdem die Tiere unter Raumluft noch einmal kurz erwachen, schlafen sie tief ein und erreichen rasch die chirurgische Toleranz.

2.5.1.2 Chirurgische Technik

Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz, wird das Fell über dem Abdomen von beiden Tieren, Empfänger, wie auch Spender, rasiert und mittels eines Desinfektionssprays (Cutasept) gereinigt. In Rückenlage wird dann das Empfängertier auf einem elektrischen Wärmekissen, das Spendertier auf einem Operationskorkbrett gelagert und an den Extremitäten mit Gummibändern fixiert.

Im Folgenden wird der Situs des Empfängers für die Transplantation vorbereitet:

Der Hautschnitt geschieht mittels eines 22er Skalpells. Hierbei wird der Schnitt ca. 1 cm unterhalb des Xyphoids in der Medianlinie angesetzt und etwa bis zum Beginn des unteren abdominalen Drittels fortgeführt. Die Rektusscheide wird vorsichtig mit einer feinen Schere

2 Methodik

durchtrennt und eventuell auftretende Hautblutungen werden mit einem (Elektro-) Kauter (Bovie, Aaron Medical) gestillt. An den Wundrändern werden beidseits Metallretractoren eingehängt, die ein Aufspannen des Operationsbereichs ermöglichen. Danach wird der Dünndarm mobilisiert und extraabdominell in eine feuchte Kompresse gewickelt.

Stumpf wird der infrarenale Bereich der Aorta abdominalis und Vena cava inferior vom umliegenden Bindegewebe befreit. Zwei feine Pinzetten dienen dazu, Gefäßabgänge soweit freizupräparieren, dass ein Unterminieren des Aorto-cavalen Gefäßstrangs möglich wird.

Der Operationsbereich wird nun mit einer kleinen feuchten Kompresse abgedeckt.

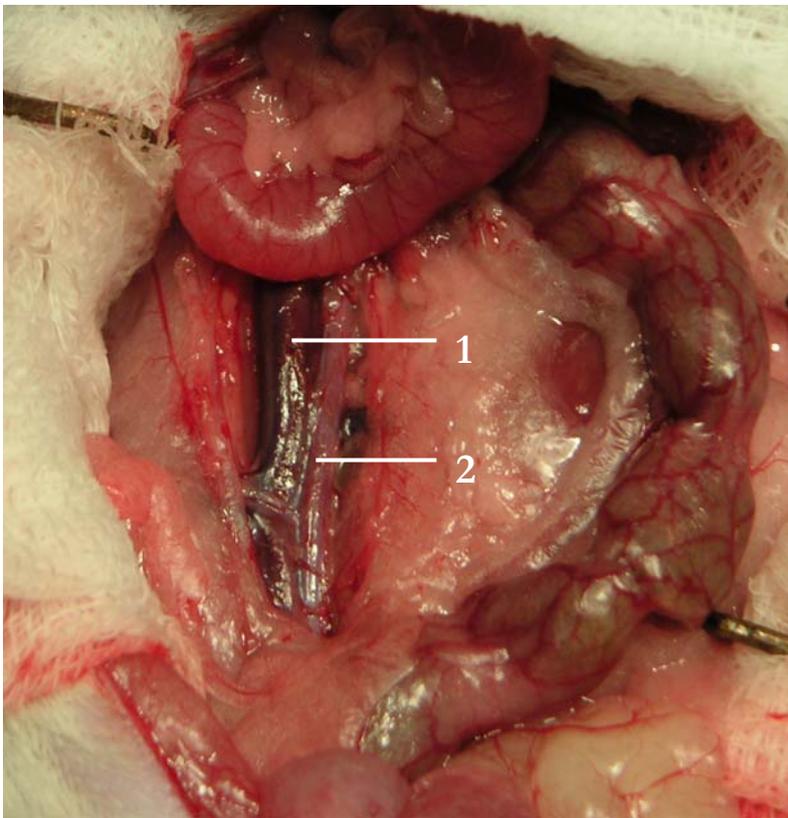


Abb. 5:

Darstellung des präparierten infrarenalen Gefäßstranges mit Vena cava inferior (1) und Aorta abdominalis (2)

2 Methodik

Es folgt die Explantation des Spenderherzens:

In gleicher Weise, wie zuvor beschrieben, wird das Abdomen eröffnet und der Darm verlagert. Da bei dem verwendeten Vektor AAV-2 eine Interaktion mit Heparin bekannt ist, die zu einer Behinderung der Vektor-Aufnahme in die Zellen führen kann [Hacker, 2001], wird im Versuch die Antikoagulanz Hirudin (Bayer Schering Pharma AG, Berlin) verwendet. Es werden 30mg/kg KG nun über eine 25G Kanüle in die Vena cava inferior injiziert. Um eine ausreichende Verteilungszirkulation zu gewährleisten, wird 2 Minuten gewartet. Eine kräftige Schere dient zum Spalten des Sternums. Mittels langer Nadeln wird der Thorax offengehalten. Die intrathorakale Vena cava inferior wird mit einer 25G Kanüle punktiert, über die 10 ml einer eiskalten kardioplegischen Lösung (Custodiol/HTK nach Bretschneider, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein) appliziert wird. Um das Herz zu entlasten, werden gleichzeitig Aorta abdominalis und Vena cava inferior im infrarenalen Bereich durchtrennt. Gleichzeitig wird das Herz topisch mit 4°C kalter Kochsalzlösung gekühlt. Nachdem das Herz asystol geworden ist, wird der Truncus pulmonalis von der Aorta ascendens getrennt und kurz vor der Bifurkation abgesetzt. Truncus brachiocephalicus und Aortenbogen werden mit einem Ethibond 6-0 Faden ligiert. Durch ein erneutes Injizieren von 2 ml Custodiol in die Aorta ascendens kann eine sichere Koronarperfusion und damit eine gute Kardioprotektion erreicht werden. Bei den Tieren der AAV-Versuchsgruppe werden nun die Virusvektoren verabreicht. Die Vektoren, welche sich in einer viskösen Flüssigkeit (Kontrastmittel; 400µl) befinden, wurden zuvor mit 0,6 ml eiskalter physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Diese Suspension (1ml) wird sehr langsam über eine feine Nadel (27G) in die Aorta ascendens gespritzt. Aufgrund der zuvor gesetzten Ligaturen kommt es ausschließlich zu einer Perfusion der Koronarien und des rechten Herzens. Es folgt das Absetzen der Aorta ascendens. Nun werden noch die Venae cavae ligiert (Ethibond 6-0) und abgesetzt. Nach einer Massenligatur der Pulmonalvenen, die ebenfalls mit einem Ethibond 6-0 Faden durchgeführt wird, können die Venae pulmonales distal davon durchtrennt werden. Das explantierte Herz wird in einem Gefäß mit eiskalter Kochsalzlösung gelagert.

2 Methodik

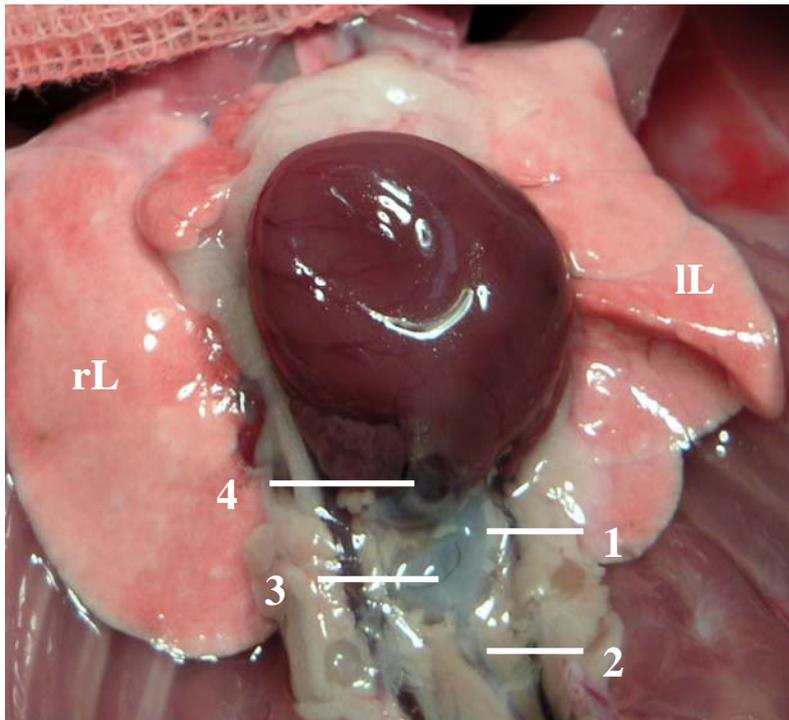


Abb.6

Spenderherz in situ:

Darstellung der Aorta ascendens (1), Truncus brachiocephalicus (2), Aortenbogen (3), rechtsventikulärer Ausflusstrakt (4), rechte (rL) und linke Lunge (lL)

Präparation des Spenderherzens:

In der Kochsalzlösung liegend, werden Aorta ascendens und Truncus pulmonalis bis zum Gefäßursprung voneinander getrennt und anhaftendes Bindegewebe entfernt. Beide Gefäßstümpfe sollten die gleiche Länge aufweisen, um eine Anastomosierung mit den Empfängergefäßen zu erleichtern und ein Abknicken der Gefäße zu verhindern.

Implantation des Spenderherzens:

Vor der Anastomosierung muss der anfangs vorbereitete infrarenale Bereich des Aorto-cavalen Gefäßstrangs der Empfängerratte ausgeklemmt werden. Hierzu führt man die Branchen einer feinen gebogenen Pinzette unter den Gefäßen durch und zieht damit die Gefäße etwas hoch. Eine kleine Satinsky-Klemme wird so gesetzt, dass ein etwa 1 cm langer Bereich dadurch ausgeklemmt ist. Um eine bessere Exposition der Aorta abdominalis zu

2 Methodik

erhalten, wird die Satinsky-Klemme etwas in Richtung Vena cava seitlich gedreht. Mit einem Stich-Skalpell (11er) wird zunächst eine Inzision der Aorta gesetzt, die mit einer Mikroschere auf eine Länge, entsprechend dem Durchmesser der Aorta ascendens des Spenderherzens, erweitert wird. Nun wird das Herz in einer kalten, feuchten Kompresse so neben die Aorta abdominalis gelegt, dass sich der Truncus pulmonalis oberhalb der Aorta ascendens befindet. Die Anastomosierung erfolgt mittels einer fortlaufenden zirkulären Naht (Prolene 8-0, MV14), beginnend am distalen Fußpunkt der Inzision. Nach der arteriellen Anastomose folgt die des Truncus pulmonalis mit der Vena cava inferior. Analog zur ersten Anastomose wird die Satinsky-Klemme in die andere Richtung gedreht und eine Inzision in die Vena cava inferior gesetzt. Da sich zumeist Thromben in dem ausgeklemmten Bereich der Vena Cava bilden, wird dieser über eine kleine Kunststoffkanüle mit NaCl 0,9% ausgespült und ein eventuell vorhandenes Gerinnsel aus dem Gefäßlumen entfernt.

Um ein Verziehen des Truncus bei der Einnah zu vermeiden, wird primär eine Einzelnaht am proximalen Ende der Inzision gesetzt. Danach werden vom distalen Fußpunkt her die Gefäße anastomosiert. Verwendet wird dabei Prolene 8-0, MV14. Obwohl beide Gefäße sehr dünnwandig und fragil sind, dürfen keine tiefen Stiche, bei denen viel Gewebe gefasst wird, gesetzt werden. Dies kann zu einer Einziehung der Vena cava führen, die einerseits den Blutstrom in der Vena cava, andererseits aber auch den venösen Abfluss aus dem transplantierten Herzen behindern würde.

Nach Fertigstellung der Anastomose wird langsam und vorsichtig die Satinsky-Klemme geöffnet und entfernt. Das nun perfundierte Herz nimmt eine rosige Färbung an und beginnt kurz darauf zu schlagen.

Es werden noch die Metallretraktoren, die das Operationsgebiet offengehalten haben, entfernt und der Darm wieder in das Abdomen zurückverlagert. Um einer postoperativen Hypovolämie, bedingt durch intraoperativen Flüssigkeitsverlust, der sowohl durch Verdunstung als auch Blutverlust bedingt sein kann, vorzubeugen, werden 2 ml warme physiologische Kochsalzlösung in den Bauchraum gegeben.

Abschließend wird eine Faszien- und eine Hautnaht mit einem Prolene 3-0 Faden durchgeführt und die Wunde noch einmal mit Cutasept desinfiziert.

Alle Daten der Transplantation und jegliche Besonderheiten werden im Operationsprotokoll vermerkt.

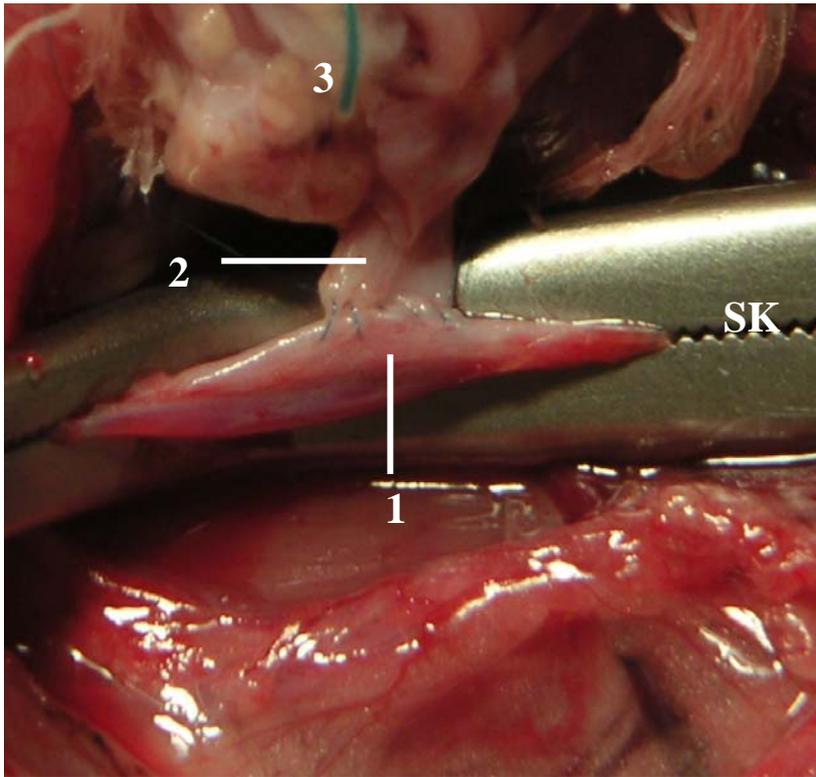


Abb.7

Darstellung des durch eine Satinsky-Klemme (SK) ausgeklemmten infrarenalen Gefäßstrangs mit Anastomose der Aorta abdominalis des Empfängertieres (1) mit der Aorta ascendens des Spenderherzens (2). Im oberen Bereich der Abbildung ist das Spenderherz (3) angeschnitten, welches in eine kalte, feuchte Kompresse eingewickelt ist.

2.5.2 Versuchsablauf der systemischen intravenösen Transduktion

2.5.2.1 Narkose

Bei den Tieren, die in diese Versuchsgruppe einbezogen wurden, wurde dasselbe Narkoseverfahren angewendet, wie es in 2.5.1.1 beschrieben ist. Da die Operation der systemischen, intravenösen Transduktion jedoch deutlich kürzer und weniger aufwendig ist, verabreichten wir eine niedrigere Pentobarbital-Dosis (40mg/kgKG).

2.5.2.2 Chirurgische Technik

Die Vorbereitung des Situs wird wie bei der direkten Skelettmuskel-Transduktion (2.5.3.2) durchgeführt. Abweichend ist hier lediglich, dass auch der linksseitige inguinale Bereich rasiert und gesäubert wird. Der Hautschnitt wird von inguinal in der Medianlinie der Oberschenkelinnenseite fortgesetzt. Nach Einsetzen der Metallretraktoren erkennt man bereits jetzt den Verlauf des femoralen Gefäß-Nerven-Stangs. Dieser wird vorsichtig mit zwei feinen gebogenen Pinzetten aus umliegendem Fett- und Bindegewebe freipräpariert.

Die in einer 1ml-Spritze aufgezugene Vektorsuspension (AAV-2/LacZ) wird nun langsam über eine Zeit von 30 sec in die dargestellte Vena femoralis injiziert. Verwendet wird hierfür eine 27G Kanüle (BD Microlance 3). Nach der Injektion wird das Gefäß mit einem Wattestäbchen solange komprimiert, bis es aus der Einstichstelle nicht mehr blutet.

Der Wundverschluß wird analog zu 2.5.2.2 durchgeführt.

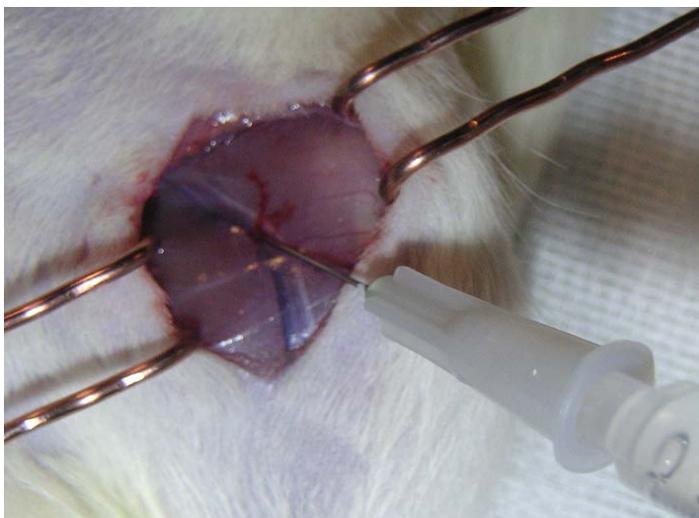


Abb. 8

Darstellung der systemischen intravenösen Transduktion: Über eine 27G Kanüle wird die Vektorsuspension in die linke V. femoralis injiziert.

2.5.3 Versuchsablauf der direkten Skelettmuskel-Transduktion

2.5.3.1 Narkose

Die Narkose wird entsprechend 2.5.2.1 durchgeführt.

2.5.3.2 Chirurgische Technik

Nach Rasur des linken innenseitigen Oberschenkels und der Reinigung mit einem Desinfektionsspray (Cutasept), wird das Tier in Rückenlage mit Gummibändern auf einem Korkbrett fixiert. Mit einem 15er Skalpell erfolgt ein etwa 1 cm langer Hautschnitt in der Mediallinie des Oberschenkels. An den Schnitträndern eingehängte Metallretraktoren dienen dem Offenhalten des Operationsgebietes. Nun wird eine Stelle am Oberschenkelmuskel mittels einer Prolene-Ligatur markiert, neben der direkt die Virussuspension injiziert wird. Bei der späteren Explantation des transfizierten Muskelbereichs ist die genaue Injektionsstelle anhand der Ligatur leicht wiederzufinden.

Abschließend werden die Metallretraktoren entfernt und der Wundbereich mit vier Einzelknopfnähten (Prolene 3-0) verschlossen. Bereits kurz nach der Operation wachen die Tiere aus der Narkose auf. Eine postoperative Analgesie ist aufgrund des geringen chirurgischen Traumas nicht nötig.

Der weitere postoperative Verlauf ist in 2.5.4 aufgezeigt.

2.5.4 Postoperativer Verlauf

Nach dem Eingriff wird das transduzierte Tier im Käfig unter eine Wärmelampe gelegt, bis es nach kurzer Zeit aus der Narkose erwacht.

In einem speziellen S1-Bereich des Tierstalls, werden die Ratten, getrennt von anderen Versuchstieren, untergebracht.

Ratten nach Skelettmuskel-Transduktion oder systemisch transduzierte Ratten

An den ersten 5 postoperativen Tagen wird täglich die Operationswunde inspiziert. Weiterhin wird subjektiv der Zustand (Fressen, Trinken, Aktivität) des Tieres beurteilt und dokumentiert.

Transplantierte Ratten

Analog zu den lokal oder systemisch transduzierten Ratten werden Zustand und Wunde beurteilt und dokumentiert. Zusätzlich wird hier palpatorisch das Transplantat auf Kontraktion und Kontraktionsstärke überprüft und in einem Verlaufsprotokoll vermerkt.

Da es sich bei dieser Transplantation um eine Allotransplantation handelt, müssen die Empfängertiere in der postoperativen Zeit immunsupprimiert werden. Studien haben gezeigt, dass eine immunsuppressive Monotherapie mit Tacrolimus i.m. bei Ratten suffizient ist, um eine akute Abstoßung zu verhindern [Li et al., 2004].

Es wird 0,1 mg/kgKG/d Tacrolimus (Astellas, München) i.m. verabreicht. Die Injektion erfolgt in den Oberschenkelmuskel.

Nach einer Dauer von 28 Tagen werden die Tiere, unabhängig von der Transduktionsmethode, zur weiteren Untersuchung auf eine erfolgte Genexpression euthanasiert.

2.5.5 Organexplantation

Nach Studienprotokoll wird am 28. postoperativen Tag das transduzierte Organ und weitere Organe explantiert (s.Tab.6).

Dafür werden die Tiere auf gleiche Art und Weise wie in 2.5.1.1 beschrieben narkotisiert und in Rückenlage fixiert.

Bei den transplantierten und den systemisch transduzierten Tieren wird mit einem 22er Skalpell eine mediane Laparatomie durchgeführt. Das Transplantat wird nun von Adhäsionen mit dem Darm befreit und makroskopisch auf Farbe und Kontraktion beurteilt. Auf Höhe der Anastomosen wird es nun mit einer feinen Schere herausgeschnitten. Das Durchtrennen der Abdominalgefäße führt zum Tod des Versuchstieres durch Ausbluten.

Entsprechend Tabelle 3 werden des Weiteren Proben von anderen Organen zur Untersuchung auf Markergen-Expression entnommen und asserviert.

Bei den Tieren, bei denen eine Transduktion des Oberschenkel-Skelettmuskels vorgenommen wurde, wird der entsprechende Muskel freipräpariert und die Prolene-Ligatur aufgesucht. Das entsprechende Muskelareal wird für die spätere Analyse herausgeschnitten.

| Applikationsart | Explantierte Organe |
|--------------------------------------|---|
| Indirekte koronare Perfusion | Transplantiertes Herz, Herz, Lunge, Leber, Niere |
| Systemische intravenöse Injektion | Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz, Hoden, Gehirn |
| Lokale Skelettmuskel- Injektion | Transduzierte Skelettmuskelregion |

Tab.3 Darstellung der explantierten Organe bei den verschiedenen Transduktionsarten

2.5.6 Organasservation

Bei der Asservation der explantierten Organe wird eine spezielle Technik angewendet, um das Gewebe und dessen empfindliche Proteinstrukturen für die Markergen-Expressionsanalyse möglichst gut zu erhalten:

Die Gewebeprobe wird hierbei in ein 10 ml Gefäß (Falcon) gegeben, welches bereits mit gekühltem Isopentan (2-Methylbutan) (Sigma, Taufkirchen) gefüllt ist. Nun wird das Falcon samt Inhalt für 5 Sekunden in flüssigen Stickstoff gehalten, was zu einem Schockgefrieren und Fixieren der Gewebeprobe führt. Das gefrorene Präparat wird nun mit einer Pinzette entnommen und in ein leeres, entsprechend der Probe markiertes Falcon überführt, welches sofort bei -80°C eingefroren wird.

Die Expressions- bzw. Markergenanalysen werden außerhalb des Instituts für chirurgische Forschung durchgeführt. Für den Transport werden die Proben-Gefäße in einer Styroporkiste auf Trockeneis gelagert.

2.6 Organanalyse

Der Gentransfer wird sowohl auf

a) **Genebene (Markergen-Nachweis [DNA und mRNA])**

als auch auf

b) **Proteinebene (Expressionsanalyse / Nachweis des transgenen Proteins)**

überprüft.

Folgende Techniken werden hierfür angewendet:

2.6.1 Markergenanalyse

Die Markergenanalyse der explantierten Organpräparate wurde von Frau Natascha Schuhmann, Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, durchgeführt.

Hierbei erfolgte eine Lyse der Präparate mit Hilfe des DNeasy Blood and Tissue Kit, Fa. Qiagen. Das Lysat wird mittels PCR (LightCycler 1, Fa. Roche) nun auf Markergen-DNA und mRNA (bzw. cDNA) untersucht.

2.6.2 Expressionsanalyse

Im Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München werden Organ-Gefrierschnitte von Herzen erstellt, die mittels **AAV-2/GFP** transduziert wurden.

Wie in Kapitel 1.5.3 beschrieben ist GFP durch die Eigenfluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Da der immunhistochemische Nachweis mittels eines polyklonalen GFP-Antikörpers, insbesondere bei quantitativ geringer GFP-Expression, die sensitivere Methode ist, wird dieses Verfahren in unserem Versuch favorisiert.

Zur Durchführung der direkten Transduktion des Skelettmuskels wird **AAV-2/LacZ** verwendet. Nach Explantation und Asservation werden die Organproben in der Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln nach folgender Technik analysiert:

LacZ-Nachweis:

Fixierung der Gefrierschnitte:

Proben dürfen vor der Fixierung nicht auftauen.

Auftauen durch Eintauchen der Proben in PBS-gepufferte 1,5%ige Glutaraldehydlösung für 5 min. Nun werden die Schnitte drei Mal für jeweils 30 sec in Bäder mit destilliertem Wasser eingetaucht. Abschließend werden die Proben 2 min lang in PBS gegeben.

X-Gal-Färbung:

Die fixierten Präparate werden in folgender Reihenfolge behandelt:

β -galactosidase Medium (16 std. bei 37°C im Dunkeln), zweimaliges Eintauchen in Bad mit destilliertem Wasser (jeweils 30 sec).

Aufsteigende Ethanolreihe mit 70%, 80% und 100% Ethanol für je 2 min.

Schließlich werden die Proben in zwei Bäder mit X-tra Solv (2x2 min) gegeben.

2 Methodik

Auf die Gewebeschnitte werden 1-2 Tropfen DPX gegeben und das Deckglas vorsichtig auf das Präparat gedrückt.

Abschließend werden nun die gefärbten Organschnitte unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Zellen die β -Galaktosidase-Aktivität aufweisen, können durch ihre blaue Anfärbung identifiziert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Technik der heterotopen abdominalen Herztransplantation

Zur Etablierung der Transplantationstechnik wurden 35 Versuche durchgeführt (Tab.4):

In 5 Versuchen wurde primär die Injektion der Kardioplegie in die Aorta ascendens und die folgende Explantation des Spenderorgans durchgeführt. Nach Organentnahme wurde an denselben (toten) Tieren der infrarenale Gefäßstamm präpariert und freigelegt.

Insgesamt wurden 24 Transplantationen durchgeführt, bei denen die transplantierten Tiere nicht überlebt haben oder euthanasiert werden mussten. In 11 Fällen bestanden unstillbare Blutungen an den Gefäßanastomosen; Einengungen der venösen Anastomose führten in 8 Fällen zu einer kurzzeitigen Aufnahme der Herzfunktion, die bei venöser Abflussstauung des Herzens jedoch nach kurzer Zeit sistierte.

5 Transplantationen wurden durchgeführt, bei denen die Spenderherzen gegen Ende des chirurgischen Eingriffs deutlich verhärtet waren und eine Aufnahme der Herzfunktion ausblieb. Ursächlich kommt hierfür eine verlängerte Ischämiezeit (>120min) oder eine insuffiziente topische Kühlung des Organs während der Transplantation in Frage.

Nach Analyse der gescheiterten Transplantationen und Behebung der Fehler konnten 6 erfolgreiche Transplantationen mit Wiedererwachen der Tiere durchgeführt werden.

| Versuch | Organ-Explantation; Adomen-Präparation | HTX | | | |
|----------------------------|---|--------------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------|
| | | nicht erfolgreich | | | erfolgreich |
| Symptome | | Blutung an der Gefäßanastomose | Venöse Stauung d. Transplantats nach Öffnen der Gefäßklemme; Graft zyanotisch verfärbt | Graft verhärtet und livide verfärbt | Graft weich, rosige Farbe |
| Aufnahme der Herzfunktion? | | + kurzzeitig | + kurzzeitig | - | + |
| n | 5 | 11 | 8 | 5 | 6 |
| Todesursache | | Hypovolämie bei Blutung | Einengung der venösen Gefäß-Anastomose und Stenosierung der VCI | Opferung der Tiere | entfällt |

Tab.4 Darstellung der durchgeführten Versuche zur Etablierung der Transplantationstechnik (+ = vorhanden; - = nicht vorhanden)

3.2 Ergebnisse der Transduktion von Rattenherzen mittels AAV-Vektoren

3.2.1 Fallzahlen

Im zweiten Teil der Studie wurden insgesamt 20 Versuche durchgeführt. Die Anzahl der in den einzelnen Abschnitten erfolgten Operationen ist in Tabelle 5 dargestellt.

Neben den gelisteten Versuchen wurden 4 Transplantationen (HTX-Gruppe) durchgeführt, bei denen die Versuchstiere aufgrund chirurgischer oder perioperativer Gründe verstarben. Die Organe dieser Tiere wurden nicht auf einen erfolgten Gentransfer untersucht, da die Zeit zwischen Vektorenapplikation und Organexplantation für eine Transgenexpression zu kurz war (<2h).

| Transfektions- methode | HTX | systemische i.v. Transduktion | direkte Skelettmuskel- transduktion | Kontroll- gruppe |
|-----------------------------------|-----|-------------------------------------|---|---------------------|
| n | 10 | 2 | 2 | 6 |

Tab.5 Darstellung der Fallzahlen der Versuchsabschnitte

Um Einflüsse der Kardioplegie bzw. Hypothermie und des intrakoronaren Drucks während der Verabreichung der Vektoren zu überprüfen, wurde die HTX Gruppe nochmals unterteilt (Tab.6):

3 Ergebnisse

- Applikation der Vektoren am hypothermen, stehenden Herzen (nach Kardioplegie)
- Applikation der Vektoren am hypothermen, stehenden Herzen bei erhöhtem intrakoronarem Druck (Klemmen des Truncus pulmonalis)
- Applikation der Vektoren am normothermen, schlagenden Herzen (vor Kardioplegie)

| Applikations- Verfahren | Injektion der Vektoren | | |
|------------------------------------|--|--|--|
| | Injektion der Vektoren am hypothermen, stehenden Herzen nach Kardioplegie | am hypothermen, stehenden Herzen nach Kardioplegie bei erhöhtem intrakoronarem Druck | Injektion der Vektoren am normothermen, schlagenden Herzen vor der Kardioplegie |
| n | 5 | 3 | 2 |

Tab.6 Unterteilung der HTX-Gruppe in drei verschiedene Applikationsverfahren

3.2.2 Ergebnisse der indirekten koronaren Transduktion (HTX-Gruppe)

Applikation der Vektoren an hypothermen, kardioplegierten Herzen

Bei der Analyse der primär durchgeführten Transplantationen, bei denen die Vektoren am hypothermen, kardioplegierten Herzen appliziert wurden, konnte keine Expression des Transgens (GFP) in den Organschnitten dargestellt werden.

Parallel zu der Expressionsanalyse wurden diese Präparate auf transgene DNA und cDNA mittels PCR untersucht. Hierbei zeigte sich, dass zwar die transferierte transgene DNA, nicht jedoch die entsprechende cDNA bzw. mRNA nach 28 Tagen nachweisbar war.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- *Hintergrund:*

Studien haben gezeigt, dass der AAV-vermittelte Gentransfer in die Leber abhängig vom hydrostatischen intravasalen Druck ist. So führte ein erhöhter Druck zu einer höheren Transgen-Expressionsrate [Feng, 2004].

Umsetzung:

Über das Klemmen des zuvor offen abgesetzten Truncus pulmonalis wird erreicht, dass die injizierten Vektoren in den Koronarien und dem rechten Herzen angestaut werden. Dies führt zu einem erhöhten intrakardialen/intrakoronaren Druck.

Applikation der Vektoren an hypothermen, kardioplegierten Herzen bei Erhöhung des intrakoronaren Drucks / Klemmen des Truncus pulmonalis

Auch nach Erhöhung des intrakoronaren Drucks während der Vektorenapplikation konnte in der Analyse transgene mRNA in den Zellen nicht detektiert werden. Wie in den zuvor beschriebenen Versuchen war transgene DNA nach 28 Tagen hingegen nachweisbar.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- Weitere Expressionsanalysen an Organschnitten sollen erst erfolgen, wenn nachgewiesen wurde, dass transgene mRNA, ohne die eine Transgen-Expression auf Proteinebene nicht möglich ist, in den Zellen gebildet wurde. Alle weiteren Transplantate werden primär mittels PCR untersucht.
- Um auszuschließen, dass die Verwendung von GFP als Markergen einen Einfluss auf die Expression hat, wird bei den weiteren Versuchen LacZ als Transgen verwendet.

Auch eine Änderung des Transgens erbrachte keine Änderung des Ergebnisses. Weiterhin konnte transgene DNA in den Zellen nachgewiesen werden, nicht jedoch die entsprechende mRNA.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden verschiedene Änderungen vorgenommen:

- *Hintergrund:*

Es ist bekannt, dass die intrazelluläre Aufnahme von AAV einen aktiven Prozess (Endozytose) darstellt (s.1.3.1.3). Nicht bekannt hingegen ist, ob die vor Vektorgabe verabreichte Kardioplegie (4°C) und die damit erzeugte Hypothermie Einfluss auf die Zellpenetration nimmt.

Umsetzung:

Um dies zu überprüfen, werden bei weiteren Versuchen die Vektoren (AAV-2/LacZ) an normothermen, schlagenden Herzen appliziert. Erst in der Folge wird das Herz kardioplegiert und dadurch gekühlt.

Applikation der Vektoren an normothermen, schlagenden Herzen

Die Organe wurden entsprechend der zuvor beschriebenen Technik in der PCR analysiert. Erneut zeigte sich, dass DNA nicht jedoch mRNA des Transgens in den transplantierten Organen detektiert werden kann.

Eine Beeinträchtigung der intrazellulären Vektoren-Aufnahme bzw. der transgenen mRNA-Produktion konnte nicht nachgewiesen werden.

3.2.3 Ergebnisse der systemischen intravenösen Transduktion

Nachdem auch nach den beschriebenen Modifikationen im Transplantationsmodell weder Markergenexpression noch mRNA-Produktion des Transgens detektierbar waren, sollte anhand einer systemischen intravenösen Transduktion ausgeschlossen werden, dass der chirurgische Eingriff mit kardioplegischen, hypothermen Herzstillstand ursächlich für dieses Ergebnis in Frage kommt.

Es wurden 2 systemische Transduktionen durchgeführt:

Im ersten Fall konnte transgene DNA im Herzen nachgewiesen werden, im zweiten hingegen nicht. Transgene mRNA wurde nicht detektiert.

Nebenbefundlich wurde festgestellt, dass lediglich die Leber, als einziges der untersuchten Organe, sowohl DNA als auch mRNA des Transgens aufwies.

3.2.4 Ergebnisse der lokalen Skelettmuskeltransduktion

Bei zwei Versuchstieren wurde eine direkte Injektion der Vektoren (AAV-2/LacZ) in einen Skelettmuskel durchgeführt. Das entsprechend markierte Muskelareal wurde nach 28 Tagen entnommen. Neben der PCR-Analyse wurden von dem explantierten Gewebe Kryoschnitte angefertigt, die nach der in 2.6.2 beschriebenen Methode gefärbt wurden.

Die Untersuchung der Präparate zeigte, dass eine direkte Transduktion von Muskelzellen mittels AAV-2/LacZ möglich ist. Neben dem immunohistochemischen β -Galactosidase-Nachweis konnte auch transgene DNA und mRNA in der PCR detektiert werden.

| <i>Gruppe</i> | <i>1</i> | <i>2</i> | <i>3</i> | <i>4</i> | <i>5</i> | <i>6</i> |
|------------------------------|--|---|--|--------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| Transduktions Methode | Applikation der Vektoren am hypothermen, kardioplegierten Herzen | Applikation der Vektoren am hypothermen, kardioplegierten Herzen mit Erhöhung des intrakoronaren Drucks | Applikation der Vektoren am normothermen, schlagenden Herzen | Systemische intravenöse Transduktion | Lokale Skelettmuskel-Transduktion | Kontrollgruppe |
| Markergen | GFP (n=3) LacZ (n=2) | GFP | LacZ | LacZ | LacZ | – |
| n | 5 | 3 | 2 | 2 | 2 | 6 |
| Transgene DNA | | | | | | |
| im Herzen | + | + | + | + (n=1) – (n=1) | n.u. | – |
| Transgene mRNA | | | | | | |
| im Herzen | – | – | – | – | n.u. | – |
| Genexpression | – (GFP-Versuche) n.u.(LacZ-Versuche) | – | n.u. | – (Herz) + (Leber) | – (Herz) + (Skelettmuskel) | – |

Tab. 7: Darstellung der durchgeführten Transduktionsversuche (+ = nachweisbar; – = nicht detektierbar; n.u. = nicht untersucht)

4 Diskussion

Der wissenschaftliche Fortschritt der modernen Medizin lässt neue Strategien und Behandlungskonzepte für Krankheiten entstehen, die bis vor wenigen Jahren noch unvorstellbar gewesen wären. Durch die Erkenntnisse der Grundlagenforschung, Pharmazie, aber auch medizin-technische Verbesserungen werden Einblicke in den Körper und die Pathologie ermöglicht, die zu wesentlich exakteren Diagnostiken und darauf basierend, erheblich differenzierteren Therapien führen. Insbesondere die Molekularbiologie und Genetik nehmen eine zentrale Position der Forschung ein und lassen ein weites Feld von Anwendungsmöglichkeiten entstehen.

Gentechnologie ermöglicht neben der genauen Analyse von Erbinformationen auch eine gezielte Veränderung des Erbguts von Organismen, die durch Einbringen von eigenen, synthetischen oder artfremden Genen entsteht. Es ist vorstellbar, hierauf basierend, Krankheiten zu behandeln oder deren Entstehung zu verhindern.

Neben der Mikroinjektionstechnik, bei der der Gentransfer über eine direkte Injektion des Transgens in die Zelle oder den Zellkern erfolgt, werden vielfach Gene über Vektoren übertragen. Dieser vektor-vermittelte Gentransfer zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass komplexe Zellverbände und ganze Organe durch Zugabe oder Injektionen der Vektoren gentechnisch verändert werden können.

Für den Gentransfer stehen sowohl nicht-virale als auch virale Vektoren zur Verfügung. Liposomen, Plasmide und kationische Polymere sind hier auf Seiten der nicht-viralen Vektoren als Beispiele zu nennen. Es wird angenommen, dass die positive Ladung der Vektoren, die zu einer Interaktion mit negativ geladenen Proteoglykanen der Zellmembran führt, maßgeblich für die intrazelluläre Aufnahme der Vektoren verantwortlich ist. Im Zytoplasma der Zelle wird dann das Transgen freigesetzt und kann zum Zellkern diffundieren. Wesentliche Vorteile dieses Vektorsystems sind, dass die Größe der zu transferierenden Gene im Grunde nicht begrenzt ist, es ein hohes Maß an Sicherheit zeigt [Brown, 2001] und keine spezifische Immunantwort des Empfängerorganismus induziert [Li, 2000]. Die geringe Transfereffizienz und kurze, transiente Genexpressionsdauer [Sakurai,

4 Diskussion

2007; Teixeira, 2001] setzen der Anwendung jedoch deutliche Einschränkungen. *In vivo* lässt sich das besonders auf die schlechte Erreichbarkeit nicht-mitotischer Zellen und auf die Effizienzmindering durch Anwesenheit von Serum zurückführen [Escriou, 1998].

Anders stellt sich die Sachlage bei den viralen Vektoren dar. Abhängig von Art und Herkunft der Vektoren (Adeno-, Adeno-assoziierte-, Herpes-, Retro-/Lentiviren) und des zu transduzierenden Gewebes (Zellart bzw. Organs) konnten in verschiedenen Untersuchungen zum Teil hohe Effizienz und Expressionsdauer des Transgens [Zentilin, 2008; Büning, 2004] nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von Adeno- bzw. Herpes-Vektoren sind allerdings neben den positiven Eigenschaften, wie der initial sehr hohen Transfereffizienz [Wang, 2004], auch negative wie die Induktion von immunologischen Reaktionen [Chu, 2003] zu beobachten.

Geeigneter scheinen hier die Adeno-assoziierte-Virus-Vektoren zu sein:

Es wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, die einen erfolgreichen Gentransfer an unterschiedlichen Geweben und Spezies mittels AAV beweisen, ohne wesentliche immunologische Reaktionen hervorzurufen [Büeler, 1999]. So konnte die Leber einer Maus mit dem AAV-8 [Grimm, 2006] und die eines Menschen mit dem AAV-9 [Manno, 2006] mit hoher Transgenexpression transduziert werden. Auch in zentralnervöse Strukturen [Taymans, 2007; Kaspar, 2002], Pankreas- [Wang, 2004] und Nierengewebe [Takeda, 2004] kann mittels Adeno-assoziiierter-Virus-Vektoren ein Gentransfer bewerkstelligt werden. Der AAV-2 zeigte weiterhin sehr hohe Effizienz bei der Transduktion von Ratten-Skelettmuskel [Abadie, 2002].

Die Transduktion kardialen Gewebes wurde mittels verschiedener Techniken, Vektoren und auch an unterschiedlichen Tierarten durchgeführt. Abhängig hiervon konnten variierende Ergebnisse festgestellt werden:

So wurde eine Modifikation von AAV-2 (ohne Heparin-Bindungsstelle) sowie AAV-6 mittels einer Retroinfusion in den Koronarsinus eines Schweineherzens injiziert [Raake, 2008]. Bei der Verwendung beider Vektoren zeigte sich eine deutliche Genexpression im Herzgewebe. Eine andere Transduktionstechnik wurde von Kaspar et al. [Kaspar, 2005] angewandt, bei der mittels eines Herzkatheters die LAD eines Schweineherzens antegrad mit der Vektor-Suspension (AAV-2) perfundiert wurde. Auch hier konnte in der Folge eine Expression (bis zu 32% der Zellen) in dem von der LAD versorgten Gebiet festgestellt werden. Ähnliche

4 Diskussion

Ergebnisse erbrachten Versuche, die bereits 1996 von Kaplitt et al. [Kaplitt, 1996] durchgeführt wurden. Auch die direkte intramyokardiale Injektion von AAV-Vektoren wurde in Hinblick auf ihre Gentransfereffizienz an Ratten getestet [Chu, 2003; Palomeque, 2007]. Diese Versuche zeigten, dass bis zu 60% der Myozyten das Transgen nach 3 Monaten noch exprimierten. Die hohe Transduktionsfähigkeit von Rattenmyozyten wurde auch durch *in vitro* Versuchen bestätigt [Maeda, 2000].

Neben den erwähnten Versuchen (Schweinemodell) von Kaspar und Kaplitt, wurde die intrakoronare Perfusion von Vektoren von verschiedenen Gruppen auch im Kleintiermodell getestet. So konnte an Hamstern beispielsweise eine langandauernde Genexpression bei der Verwendung von AAV-2 festgestellt werden [Li, 2003]. Der selbe Vektor zeigte im Ratten-Working-heart-Modell, bei dem die Vektoren am schlagenden Herzen über die Koronarien reperfundiert werden, eine Dosis/Vektortiter-abhängige Transfektionsrate [Asfour, 2002].

Ziel der vorliegenden Studie war es einerseits ein einfaches Modell zu etablieren, welches sich zur selektiven Transduktion des Herzens eignet und andererseits mittels dieses Versuchsaufbaus die Gentransfer-Effizienz von AAV-2 anhand von Markergenen und später therapeutischen Genen zu überprüfen.

Das Modell, welches hierfür gewählt wurde, ist die heterotope abdominale Herztransplantation im Rattenmodell. Die Etablierung dieses Versuchsmodells und das Erlernen der mikrochirurgischen Technik der Transplantation erfordert Zeit, Geduld und manuelle Geschicklichkeit. Insbesondere genaues Arbeiten, wie bei dem vorsichtigen Absetzen der Spenderherzgefäße oder der exakten Positionierung der Anastomosennaht-Stiche, ist für eine erfolgreiche Umsetzung der Technik unerlässlich. Kleinste Fehler können hier bereits zum Scheitern der Transplantation führen. Insgesamt waren 35 Versuche zur Erlernung der chirurgischen Technik erforderlich.

Trotz fehlender Transgenexpression bei Verwendung des AAV-2 zeichnet sich das verwendete Modell durch verschiedene Faktoren für den Gentransfer aus: das Transplantat wird noch vor der Transplantation in der Spenderratte transduziert. Die direkte Injektion der Vektoren in die Aorta ascendens stellt sicher, dass die höchstmögliche Vektorkonzentration am Zielorgan appliziert und das Herz selektiv transduziert wird. Erst in der Folge wird die

4 Diskussion

Transplantation des Organs durchgeführt. Aufgrund der abdominalen heterotopen Transplantationsweise, bei der das Herz perfundiert wird, jedoch keine hämodynamische Funktion zu erbringen hat, kann im Verlauf die Kontraktion des Herzens einfach per Palpation überprüft werden.

Im zweiten Studienabschnitt wurde der Gentransfer mittels AAV-2 durchgeführt: Die Transduktion der Rattenherzen erfolgte primär, wie im Studienprotokoll vorgesehen, im etablierten Versuchsaufbau: Hierbei wurden die Vektoren über die Aorta ascendens in die Koronarien der kardioplegierten, hypothermen Herzen injiziert. Die folgende Analyse der Transplantate zeigte keine Expression des Markergens; in der PCR konnte nur die transgene DNA, nicht jedoch die entsprechende mRNA detektiert werden. Auch verschiedene Änderungen der chirurgischen Technik (Erhöhung des Injektionsdrucks, Applikation an normothermen, nicht-kardioplegierten Herzen) und Wechsel des Transgens konnten keine Verbesserung des Ergebnisses erzielen. Systemische, intravenöse Injektionen der Vektoren wurden daraufhin durchgeführt, um einen Einfluss der Transplantation mit hypothermen Herzstillstand per se auszuschließen. Eine Transgen-Expression konnte in diesen Versuchen lediglich in der Leber nachgewiesen werden. Nur in einem der zwei durchgeführten Experimente zeigte die PCR transgene DNA im Herzen.

Die grundsätzliche Transduzierbarkeit von Ratten-Myozyten sollte durch eine direkte Injektion der Vektoren in einen Oberschenkelmuskel überprüft werden. Im entsprechenden Muskelgewebe konnte nach 4 Wochen neben dem Vorhandensein transgener mRNA und DNA auch eine Markergenexpression festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in dieser Versuchsreihe nicht möglich war, eine Transgenexpression im Herzgewebe nachzuweisen. Lediglich der Skelettmuskel (nach direkter Transduktion) und die Leber (nach systemischer Transduktion) zeigten Markergenexpression. Ein weiterer auffälliger Befund ist, dass in der PCR regelmäßig transgene DNA im Herzgewebe, nie jedoch transgene mRNA festgestellt werden konnte. Aus den vorliegenden Ergebnissen dieser Studie ist eine klare Begründung hierfür nicht abzuleiten. Nach Analyse der Befunde stellen sich jedoch folgende Fragen:

4 Diskussion

Zeichnen sich die verschiedenen Zellarten durch unterschiedliche Transfektionsraten aus?
Welche Zellen kamen bei den Versuchen in direkten Kontakt mit den Vektoren?

Ist es möglich, dass die Endothelzellschicht, die Aufnahme der Vektoren aus dem Gefäßlumen behindert?

Können intrazelluläre Mechanismen verhindern, dass eine Transkription des Transgens stattfindet?

Die Entscheidung den AVV-Serotyp 2 Vektor für den Gentransfer in dieser Studie einzusetzen, beruht einerseits auf den Ergebnissen der oben erwähnten Veröffentlichungen [Li, 2003; Asfour, 2002] und andererseits auf Versuchen, die von Frau Natascha Schuhmann und Frau Dr. Hildegard Büning, Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, durchgeführt worden sind. Hierbei wurden die AAV Serotypen 1-5 bezüglich ihrer Transfektionseffizienz an porcinen Endothelzellkulturen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass AAV-2 die mit Abstand höchste Transfektionseffizienz (>88%) erzielt (unveröffentlichte Studie). Rattenendothelzellkulturen waren zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar. Erst nachdem gegen Ende der Transplantationsversuche entsprechende Zellen über Frau Dr. Martina Seifert, Charité Berlin, zugänglich wurden, konnte die *in vitro* Testung der verschiedenen Serotypen Spezies-spezifisch wiederholt werden. Überraschenderweise zeigte sich hier, im Vergleich zu den Versuchen, die an porcinen Zellen durchgeführt wurden, ein völlig konträrer Befund: Bei keinem der getesteten Serotypen konnte eine Transgen-Expression (GFP) der Zellen erzielt werden (unveröffentlichte Studie).

Diese *in vitro* Versuche beweisen nicht nur eine ausgeprägte Spezies-Spezifität der Vektoren an Endothelzellen, sie geben auch eine mögliche Erklärung, warum eine Expression des Transgens im Rattenherzen nie zu erzielen war: Sowohl in den Koronarien, als auch in den Herzhöhlen kamen die Vektoren bei der Injektion nur mit Endothelzellen, als luminale Gefäß- bzw. Herzwandbegrenzung, in Kontakt. In der Annahme, dass Rattenendothelzellen sowohl *in vivo*, wie auch *in vitro* eine vergleichbare Transduzierbarkeit (durch AAV-2) zeigen, konnte keine Transgenexpression erzielt werden. Es erscheint weiterhin möglich, dass der dichte Verband der Endothelzellschicht, zusammengehalten durch Tight-junctions, eine Barriere darstellt, die verhindert, dass tiefergelegene Zellschichten, wie beispielsweise die Myozyten, durch die Vektoren erreicht werden.

4 Diskussion

Unklar bleibt jedoch weiterhin der Grund, warum regelmäßig nach intrakoronarer Applikation der Vektoren transgene DNA, nicht jedoch mRNA in dem analysierten Herzgewebe zu finden war. Die Ergebnisse der PCR deuten daraufhin, dass eine Aufnahme der Vektoren in die Zelle stattfindet, intrazelluläre Mechanismen jedoch eine Produktion der mRNA und die Umsetzung in das Protein verhindern. Nachdem das Gewebe für die PCR lysiert wurde, ist keine klare Aussage zu treffen, welche Zellen hier die Vektoren aufgenommen haben. Sollte die Annahme jedoch zutreffen, dass eine Endothelzellbarriere die Aufnahme der Vektoren in andere kardiale Zellen verhindert, so ist davon auszugehen, dass es die Endothelzellen selber sind, in denen die transgene DNA zu finden ist.

Sowohl die Literatur [Maeda, 2000], wie auch ein Teilergebnis der Studie, zeigen, dass Myozyten mittels des verwendeten AAV-2 transduziert werden können. Die direkte Injektion der Vektoren in den Oberschenkelmuskel führte zu einer deutlichen Genexpression in den Myozyten.

Auch die Leber zeigte nach systemischer Transduktion eine nachweisbare Transgenexpression. Eine Erklärung warum hier, nicht jedoch am Herzen eine Genexpression zu finden ist, könnte in der besonderen Beschaffenheit des Leberendothels liegen. So besitzt es großflächige Poren über die physiologischerweise ein direkter Stoffaustausch der Hepatozyten mit dem Blut ermöglicht wird [Braet, 2002]. Über sie könnte die Aufnahme der Vektoren in Leberzellen ermöglicht werden, die in der Folge zur Expression des Transgens führt. Die Barrierefunktion des Endothels, wie sie in anderen Gefäßen und Organen zu finden ist, besteht in der Leber nicht. So ist es auch verständlich, dass eine Erhöhung des Injektionsdrucks der Vektoren, über eine vermehrte Vektoraufnahme, in der Leber zu einer stärkeren Genexpression führt [Feng, 2004]. Aufgrund des Fehlens solcher Poren im vaskulären Herzendothel konnte dieser Effekt am Herzen nicht beobachtet werden.

Alle vorliegenden Befunde deuten daraufhin, dass die Endothelzellschicht der Gefäße eine zentrale Rolle bei der Transduktion von Organen mittels AAV-2 spielt. Die beschriebenen Versuche haben gezeigt, dass Endothelzellen selber keine Transgenexpression zeigen und nur der direkte Kontakt von anderen Zellen, wie zum Beispiel Myozyten oder Hepatozyten, zum Genvektor zu einer Expression des Transgens führt.

4 Diskussion

Welche Schritte können bei Kenntnis dieser Ergebnisse unternommen werden um einen vektorvermittelten Gentransfer in ein Herz zu bewerkstelligen?

Bei der intrakoronaren Applikation der Vektoren wird, unabhängig vom angewandten Versuchsmodell, das Überwinden der vaskulären Endothelzellschicht oder aber die Transfektion der Endothelzellen selber, im Ziel der Bemühungen stehen müssen.

Durch Zugabe von Substanzen wie Histamin, Substanz P oder VEGF, die zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität führen [Nguyen, 1995; Baldwin, 2001; Breen, 2007], kann es möglich sein, die Barrierefunktion der Gefäßauskleidung soweit zu vermindern, dass Vektoren zu tiefergelegenen Zellschichten diffundieren und hier eine Transduktion ermöglicht wird. Der Einsatz dieser Substanzen wurde bereits in Studien [Raake, 2008, Kaspar, 2005] erfolgreich bei der Transduktion von Herzen durchgeführt. Insbesondere durch Zusatz von VEGF konnte die Genexpressionsrate gesteigert werden [Raake, 2008].

Ob die alleinige Zugabe dieser Agenzien zum AAV-2 bereits zur Expression des Transgens führen würde, bleibt ungewiss.

In der vorliegenden Studie kam es bei der Verwendung von AAV-2-Vektoren weder *in vitro*, noch *in vivo* zu einer Transgenexpression in Rattenendothelzellen. Auch die Serotypen 1 und 3-5 stellten sich hierfür im Zellkulturversuch als ungeeignet dar.

Neueste Veröffentlichungen zeigen jedoch, dass eine andere Applikationsweise mit verlängerter Applikationszeit der Vektoren am Herzen hier zum Ziel führen kann: Im einem Langendorff-Reperusionsmodell, bei dem die Vektoren (AAV-1, -2 und -5) über 30 min rezirkuliert wurden, zeigte sich bei Verwendung von AAV-1 die höchste Genexpressionsrate [Schirmer, 2007]. Auch bei AAV-2 und -5 konnte das Markergen (GFP) in der Folge nachgewiesen werden. Noch höhere Expression erbrachte in diesem Transduktionsmodell die Anwendung von AAV-2/9 – einer Mutationen von Adeno-assoziierten-Virus Vektoren [Miyagi, 2008]. Sehr deutlich konnte hier auch eine Vektortiter-abhängige Transfektionsrate dargestellt werden: Bei Transduktion des Organs mit einem Vektortiter von 2×10^{12} genome copies [GC]/ ml konnte eine myokardiale Expressionsrate von über 71% der Zellen erzielt werden.

4 Diskussion

Auch in dem in der Studie etablierten Transduktionsmodell, konnten wir in ersten Folgeversuchen, bei Verwendung anderer Vektoren, eine Genexpression im Herzgewebe feststellen. Sowohl lentivirale Vektoren, als auch die AAV-Mutation AAV-2/6 kamen hierbei für den Gentransfer zum Einsatz [Burdorf, 2007]. Aus den Abbildungen 9 und 10 ist ersichtlich, dass eine Transgenexpression im Herzen bei Verwendung dieser Vektoren möglich ist. Auch hier wurden wiederum im Wesentlichen Myozyten transduziert.

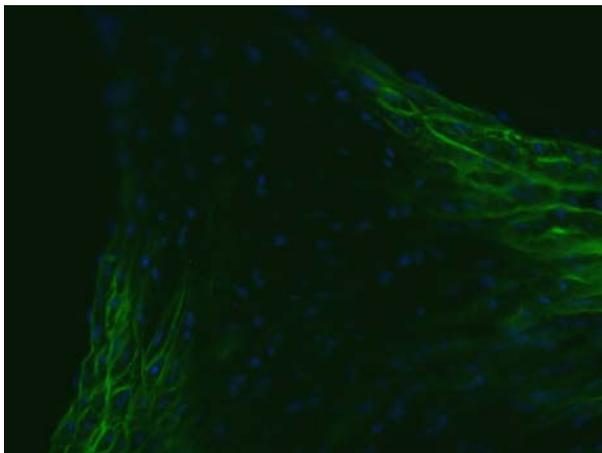


Abb. 9

Darstellung eines Rattenherz-Septums in der Fluoreszenzmikroskopie nach Transduktion mit einem lentiviralen Vektors. Es zeigte sich bereits nach 10 Tagen eine intensive GFP Expression.

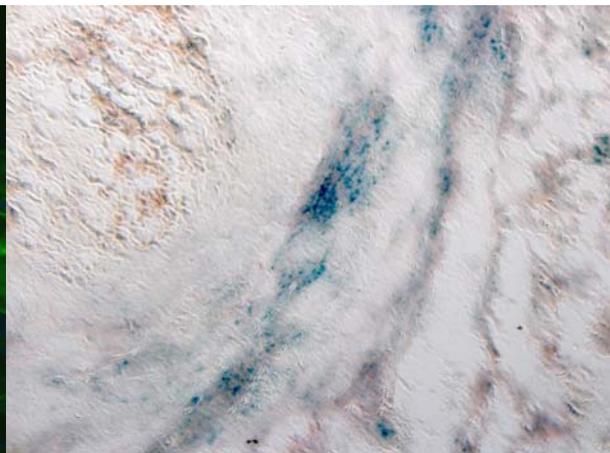


Abb. 10

Die Darstellung zeigt Myokard in der X-Gal-Färbung welches mittels AAV-2/6 transduziert wurde. Zu erkennen ist die blaue Anfärbung der LacZ-exprimierenden Zellen.

Ist die Transduktion der Endothelzellen beim Einsatz des Gentransfers im Herzen zwangsläufig erforderlich, oder ist eine Transgenexpression, beispielsweise in Myozyten, für einen therapeutischen Einsatz ausreichend?

Um diese Frage beantworten zu können, ist es wichtig, zu klären, welche Transgene eingesetzt und welche therapeutischen Effekte hierdurch erzielt werden sollen. Transgene, bei denen das Genprodukt (Protein) an der Gefäßoberfläche exprimiert werden soll, müssen entsprechend von den Endothelzellen aufgenommen werden. Als Beispiel ist das

4 Diskussion

Thrombomodulin zu nennen, welches als transmembraner Rezeptor für Thrombin fungiert und eine zentrale Rolle in der Hemmung der Blutgerinnung einnimmt. Nur bei Expression an der vaskulären Endotheloberfläche kann diese Funktion erfolgen.

Anders stellt es sich bei Transgenen dar, deren Genprodukt sezerniert wird und nicht an die transduzierte Zelle gebunden ist. Beispiele für Transgene, welche in dieser Weise eingesetzt werden könnten, sind Gene, die zu einer Kostimulationsblockade führen (z.B. CTLA4Ig [Wang, 2006]) und somit die Abstoßung eines (Xeno-)Transplantats verhindern können. Entsprechend des Wirkungsorts des transgenen Proteins muss also entschieden werden, welche Zellen durch die Vektoren transduziert werden sollen. Eine Genexpression in Endothelzellen ist, wie dargestellt, nicht in jedem Fall erforderlich.

Der Einsatz, sowie die Bedeutung der Gentechnologie und der gentechnischen Veränderung von Zellen, nehmen in den letzten Jahren stetig zu. Fast in allen Bereichen der modernen Medizin gibt es mögliche Anwendungen, die mit Nachdruck erforscht werden. So ist es nicht verwunderlich, dass auch im Bereich der Transplantationsmedizin viele Studien durchgeführt werden, durch die eine Verbesserung der Organfunktion, Senkung der medikamentösen immunsuppressiven Therapie oder gar die Transplantation xenogener Organe in Menschen ermöglicht werden soll.

Mit diesem Ziel wurde auch die vorliegende Arbeit geplant und durchgeführt. Hierbei konnte ein Transplantationsmodell erfolgreich etablieren werden, an dem Vektoren in ein Rattenherz injiziert und der erfolgte Gentransfer untersucht werden kann. Bei Verwendung des AAV-2 Vektors war es jedoch auch nach den beschriebenen Änderungen der Applikationsmethode nicht möglich, eine Expression des Markergens im Herzen zu detektieren.

Die aktuelle Literatur zeigt jedoch Wege und Möglichkeiten auf, bei denen durch Anwendung neuer Vektoren, geänderter Applikationsarten und verlängerter Applikationszeit sowie des Zusatzes von Gefäßpermeabilitäts-erhöhenden Substanzen, ein Gentransfer am Herzen mit hoher Expressionsrate erzielt werden kann.

5 Zusammenfassung

Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Modell zu etablieren, welches die Möglichkeit bietet, einen selektiven Gentransfer in ein Rattenherz durchführen zu können. Gewählt wurde hierfür das Modell der heterotopen abdominalen Herztransplantation, bei dem vor der Explantation des Spenderherzens die Genvektoren in die, nach distal ligierte, Aorta ascendens injiziert werden können. Für die sichere Durchführung dieses mikrochirurgischen Eingriffs waren 30 Transplantationen erforderlich.

Das etablierte Modell wurde nun im zweiten Teil der Arbeit eingesetzt, um den Gentransfer eines Markergens zu untersuchen. Als Vektoren kamen hierbei Adeno-assoziierte-Virus-Vektoren vom Serotyp 2 und als Markergen GFP zum Einsatz. Die intrakoronare Injektion erfolgte am kardioplegierten, hypothermen Spenderherz indirekt über die Aorta ascendens. Die Grafts wurden im Anschluss transplantiert und nach einer Zeit von 28 Tagen zur Analyse der Transgenexpression wieder explantiert.

Das Ergebnis zeigte, dass lediglich transgene DNA im analysierten Herzgewebe gefunden werden konnte. Eine Markergenexpression oder der Nachweis transgener mRNA konnte nicht erbracht werden.

In der Folge wurde die Applikationsmethode der Vektoren in verschiedener Weise modifiziert:

So wurde eine Erhöhung des Injektionsdrucks durch Klemmen des Truncus pulmonalis erreicht. Ebenso wurden die AAV-Vektoren am normothermen, noch schlagenden Herzen appliziert und eine Umstellung des Markergens von GFP auf LacZ durchgeführt.

Keine der Änderungen konnte jedoch zu einer Expression des Markergens führen.

Neben den Transplantationsversuchen wurden auch eine systemische, intravenöse Transduktion, bei der die Vektoren über die Femoralvene injiziert wurden und eine direkte Transduktion eines Skelettmuskels durchgeführt. Bei der i.v. Gabe der Vektoren konnte nach vier Wochen eine Expression des Transgens in der Leber, nicht jedoch am Herzen festgestellt

5 Zusammenfassung

werden. Im transduzierten Muskelareal der direkten Skelettmuskel-Injektion konnte eine Transgenexpression ebenso gezeigt werden.

Im Rahmen der durchgeführten Studie war es möglich ein Gentransfer-Modell zu etablieren, welches sicher durchzuführen ist und mit Hilfe dessen, virale Vektoren selektiv einem Herzen zugeführt werden können. Trotz multipler Änderungen gelang es bei Verwendung des AAV-2 nicht, eine Markergenexpression im transplantierten und transduzierten Herzen zu erzielen. Nachdem *in vitro* Studien [Schuhmann, unveröffentlichte Studie] gegen Ende der Transplantationsversuche gezeigt haben, dass Rattenendothelzellen mittels des verwendeten AAV-2 Vektors nicht zu transduzieren sind, ist anzunehmen, dass die Endothelzellschicht der Blutgefäße bei den *in vivo* Versuchen eine Art Barriere darstellt, die für die Vektoren nicht zu überwinden ist. Lediglich dort, wo ein direkter Kontakt zu anderen Zellarten, wie beispielsweise den Myozyten bei der direkten intramuskulären Injektion oder den Hepatozyten (aufgrund des porösen, gefensterten Endothels) bei der systemischen Applikation, möglich ist, kam es zu einer Expression des Markergens.

Der aktuellen Literatur ist zu entnehmen, dass andere Vektoren (z.B. lentiviraler Herkunft) oder auch Modifikationen der Adeno-assoziierte-Vektoren (z.B. AAV-2/6 oder AAV-2/9) besser geeignet zu sein scheinen, einen Gentransfer in ein Rattenherz durchzuführen.

6 Literaturverzeichnis

- 1: **Abadie J, Blouin V, Guigand L, Wyers M, Cherel Y.**
Recombinant adeno-associated virus type 2 mediates highly efficient gene transfer in regenerating rat skeletal muscle. *Gene Ther.* 2002 Aug;9(15):1037-43.
- 2: **Asfour B, Baba HA, Scheld HH, Hruban RH, Hammel D, Byrne BJ.**
Uniform long-term gene expression using adeno-associated virus (AAV) by ex vivo recirculation in rat-cardiac isografts. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 Dec;50(6):347-50
- 3: **Atchison RW, Casto BC, Hammon WM.**
Adenovirus-Associated Defective Virus Particles.
Science. 1965;149:754–6.
- 4: **Baldwin AL, Thurston G.**
Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability.
Crit Rev Biomed Eng. 2001;29(2):247-78.
- 5: **Braet F, Wisse E.**
Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review.
Comp Hepatol. 2002 Aug 23;1(1):1.
- 6: **Breen EC**
VEGF in biological control.
J Cell Biochem. 2007 Dec 15;102(6):1358-67.
- 7: **Brown MD, Schätzlein AG, Uchegbu IF.**
Gene delivery with synthetic (non viral) carriers.
Int J Pharm. 2001 Oct 28; 229, 1-21

6 Literaturverzeichnis

- 8: **Büeler H**
Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy.
Biol. Chem. 1999 Jun;380(6):613-229:
- 9: **Büning H, Braun-Falco M, Hallek M.**
Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy.
Cells Tissues Organs. 2004;177(3):139-50.
- 10: **Büning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M.**
Recent developments in adeno-associated virus vector technology.
J Gene Med. 2008 May 2. (Article online in advance of print)
- 11: **Büning H, Ried MU, Perabo L, Gerner FM, Huttner NA, Enssle J, Hallek M.**
Receptor targeting of adeno-associated virus vectors.
Gene Ther. 2003 Jul;10(14):1142-51.
- 12: **Burdorf L, Hofmann A, Postrach J, Messow D, Gleich B, Weyh T, Thein E, Mordstein V, Reichart B, Pfeifer A, Schmoeckel M.**
Magnetofection-enhanced lentiviral mediated gene transfer to cardiac cells in a heterotopic heart transplantation model.
Xenotransplantation. 2007 Jul ;14 (4):372 17669203
- 13: **Choi V, McCarty D, Samulski RJ**
AAV Hybrid Serotypes: Improved Vectors for Gene Delivery.
Curr Gene Ther. 2005 June; 5(3): 299-310
- 14: **Chu D, Sullivan CC, Weitzman MD, Du L, Wolf PL, Jamieson SW, Thistlethwaite PA.**
Direct comparison of efficiency and stability of gene transfer into the mammalian heart using adeno-associated virus versus adenovirus vectors.
J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Sep;126(3):671-9.
-

6 Literaturverzeichnis

- 15: **Escriou V, Ciolina C, Helbling-Leclerc A, Wils P, Scherman D.**
Cationic lipid-mediated gene transfer: analysis of cellular uptake and nuclear import of plasmid DNA. *Cell Biol Toxicol.* 1998 Mar;14(2):95-104.
- 16: **Feng DM, He CX, Miao CY, Lu B, Wu WJ, Ding YF, Xue JL.**
Conditions affecting hydrodynamics-based gene delivery into mouse liver in vivo. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004 Dec;31(12):850-5.
- 17: **Fenno LE, Ptaszek LM, Cowan CA.**
Human embryonic stem cells: emerging technologies and practical applications. *Curr Opin Genet Dev.* 2008 Jul 11. (Article online in advance of print)
- 18: **Grieger JC, Samulski RJ**
Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virol.* 2005 Aug;79(15):9933-44.
- 19: **Grimm D, Pandey K, Nakai H, Storm TA, Kay MA.**
Liver transduction with recombinant adeno-associated virus is primarily restricted by capsid serotype not vector genotype. *J Virol.* 2006 Jan;80(1):426-39
- 20: **Hacker UT, Gerner FM, Büning H, Hutter M, Reichenspurner H, Stangl M, Hallek M.**
Standard heparin, low molecular weight heparin, low molecular weight heparinoid, and recombinant hirudin differ in their ability to inhibit transduction by recombinant adeno-associated virus type 2 vectors. *Gene Ther.* 2001 Jun;8(12):966-8
- 21: **Kaplitt MG, Xiao X, Samulski RJ, Li J, Ojamaa K, Klein IL, Makimura H, Kaplitt MJ, Strumpf RK, Diethrich EB.**
Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector. *Ann Thorac Surg.* 1996 Dec;62(6):1669-76.
-

6 Literaturverzeichnis

- 22: **Kaspar BK, Vissel B, Bengoechea T, Crone S, Randolph-Moore L, Muller R, Brandon EP, Schaffer D, Verma IM, Lee KF, Heinemann SF, Gage FH.**
Adeno-associated virus effectively mediates conditional gene modification in the brain.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Feb 19;99(4):2320-5.
- 23: **Kaspar BK, Roth DM, Lai NC, Drumm JD, Erickson DA, McKirnan MD, Hammond HK.**
Myocardial gene transfer and long-term expression following intracoronary delivery of adeno-associated virus. J Gene Med. 2005 Mar;7(3):316-24.
- 24: **Lensch MW, Daheron L, Schlaeger TM.**
Pluripotent stem cells and their niches.
Stem Cell Rev. 2006;2(3):185-201.
- 25: **Li J, Wang D, Qian S, Chen Z, Zhu T, Xiao X.**
Efficient and long-term intracardiac gene transfer in delta-sarcoglycan-deficiency hamster by adeno-associated virus-2 vectors. Gene Ther. 2003 Oct;10(21):1807-13.
- 26: **Li R, Takazawa K, Suzuki H, Hariya A, Yamamoto T, Matsushita S, Hirose H, Amano A.**
Synergistic effect of triptolide and tacrolimus on rat cardiac allotransplantation.
Jpn Heart J. 2004 Jul;45(4):657-65.
- 27: **Li S, Huang L.**
Nonviral gene therapy: promises and challenges.
Gene Ther. 2000 Jan;7(1):31-4.
- 28: **Maeda Y, Ikeda U, Shimpo M, Shibuya M, Monahan J, Urabe M, Ozawa K, Shimada K.**
Adeno-associated virus-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer into cardiac myocytes. J Cardiovasc Pharmacol. 2000 Oct;36(4):438-43.
-

6 Literaturverzeichnis

- 29: **Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA.**
Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 2006 Mar;12(3):342-7.
- 30: **Miyagi N, Rao VP, Ricci D, Du Z, Byrne GW, Bailey KR, Nakai H, Russell SJ, McGregor CG.**
Efficient and durable gene transfer to transplanted heart using adeno-associated virus 9 vector. *J Heart Lung Transplant.* 2008 May;27(5):554-60.
- 31: **Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T.**
Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology.* 2004;330:375-83.
- 32: **Nguyen LS, Villablanca AC, Rutledge JC.**
Substance P increases microvascular permeability via nitric oxide-mediated convective pathways. *Am J Physiol.* 1995 Apr;268(4 Pt 2):R1060-8.
- 33: **Palomeque J, Chemaly ER, Colosi P, Wellman JA, Zhou S, Del Monte F, Hajjar RJ.**
Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo. *Gene Ther.* 2007 Jul;14(13):989-97.
- 34: **Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ.**
Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 1992 Feb 15;111(2):229-33.
-

- 35: **Raake PW, Hinkel R, Müller S, Delker S, Kreuzpointner R, Kupatt C, Katus HA, Kleinschmidt JA, Boekstegers P, Müller OJ.**
Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors.
Gene Ther. 2008 Jan;15(1):12-7.
- 36: **Schirmer JM, Miyagi N, Rao VP, Ricci D, Federspiel MJ, Kotin RM, Russell SJ, McGregor CG.**
Recombinant adeno-associated virus vector for gene transfer to the transplanted rat heart.
Transpl Int. 2007 Jun;20(6):550-7.
- 37: **Sakurai H, Sakurai F, Kawabata K, Sasaki T, Koizumi N, Huang H, Tashiro K, Kurachi S, Nakagawa S, Mizuguchi H.**
Comparison of gene expression efficiency and innate immune response induced by Ad vector and lipoplex. J Control Release. 2007 Feb 26;117(3):430-7
- 38: **Schmoeckel M, Nollert G, Shahmohammadi M, Young VK, Chavez G, Kasper-König W, White DJ, Müller-Höcker J, Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Hammer C, Reichart B.**
Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogeneic perfused working hearts. Transplantation. 1996 Sep 27;62(6):729-34.
- 39 : **Srivastava A**
Adeno-associated virus-mediated gene transfer.
J Cell Biochem, 2008 May 23. (Article online in advance of print)
- 40: **Tai HC, Ezzelarab M, Hara H, Ayares D, Cooper DK.**
Progress in xenotransplantation following the introduction of gene-knockout technology.
Transpl Int. 2007 Feb;20(2):107-17.
-

6 Literaturverzeichnis

- 41: **Takeda S, Takahashi M, Mizukami H, Kobayashi E, Takeuchi K, Hakamata Y, Kaneko T, Yamamoto H, Ito C, Ozawa K, Ishibashi K, Matsuzaki T, Takata K, Asano Y, Kusano E.**
Successful gene transfer using adeno-associated virus vectors into the kidney: comparison among adeno-associated virus serotype 1-5 vectors in vitro and in vivo.
Nephron Exp Nephrol. 2004;96(4):e119-26.
- 42: **Taymans JM, Vandenberghe LH, Haute CV, Thiry I, Deroose CM, Mortelmans L, Wilson JM, Debyser Z, Baekelandt V.**
Comparative analysis of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 7, and 8 in mouse brain. Hum Gene Ther. 2007 Mar;18(3):195-206.
- 43: **Teixeira LA, Fricke CH, Bonorino CB, Bogo MR, Nardi NB.**
An efficient gene transfer system for hematopoietic cell line using transient and stable vectors. J Biotechnol. 2001 Jun 15;88(2):159-65.
- 44: **Wang AY, Peng PD, Ehrhardt A, Storm TA, Kay MA.**
Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. Hum Gene Ther. 2004 Apr;15(4):405-13.
- 45: **Wang GM, Ma JB, Jin YZ, Feng YG, Hao J, Gao X, Xie SS**
Long-term survival of cardiac allografts induced by cyclophosphamide combined with CTLA4Ig-gene transfer mediated by adenoviral vector. Transplant Proc. 2006 Nov;38(9):3043-5.
- 46: **Warrington KH Jr, Herzog RW**
Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer.
Hum Genet. 2006 Jul;119(6):571-603.
- 47: **Zentilin L, Giacca M.**
Adeno-Associated Virus Vectors: Versatile Tools for in vivo Gene Transfer
Contrib Nephrol. 2008;159:63-77
-

48 : **Zaiss AK, Muruve DA**

Immune responses to adeno-associated virus vectors.

Curr Gene Ther. 2005 Jun;5(3):323-31.

7 Anhang

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Burdorf L, Schuhmann N, Postrach J, Thein E, Hallek M, Reichart B, Büning H, Schmoeckel M.

AAV-mediated gene transfer to cardiac cells in a heterotopic rat heart transplantation model.
Transplant Proc. 2007 Mar;39(2):567-8.

Burdorf L, Schuhmann N, Büning H, Postrach J, Mordstein V, Hallek M, Bittmann I, Reichart B, Schmoeckel M.

In vivo AAV mediated gene transfer to cardiac endothelial cells is possible but species-specific

Thorac cardiovasc Surg 2006; 54; DOI: 10.1055/s-2006-925872

8 Danksagung

Mein Dank für die hervorragende Unterstützung meiner Promotionsarbeit gilt im Besonderen Herrn Prof. Dr. M. Schmoeckel und Prof. Dr. B. Reichart. Beide haben mir die Möglichkeit gegeben, Mitglied der DFG transregio-Forschergruppe „Xenotransplantation“ zu werden und im Rahmen dieses Projekts intensiv an der vorliegenden Studie zu arbeiten.

Die Transplantationsversuche wurden von Herrn cand. med. J. Postrach assistiert. Vielen Dank für die zeitintensive und hilfreiche Mitarbeit.

Für die Herstellung der Vektoren, die Transduktionsanalysen der Organe und insbesondere die freundliche, kollegiale Zusammenarbeit möchte ich mich herzlich bei Frau N. Schuhmann und Frau Dr. H. Büning, Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, bedanken.

Unterstützung und Beratung bei der Durchführung meiner Versuche erhielt ich auch von Frau PD Dr. U. Brandl und Herrn Dr. E. Thein. Hierfür und für die jederzeit tolle Arbeitsatmosphäre danke ich sehr.

Die vorliegende Arbeit ist Teil des Forschungsprojekts der DFG transregio-Forschergruppe „Xenotransplantation“. Die Finanzierung dieser Studie erfolgte über die Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant SCHM 1269/3-1, HA 1680/8-1), für die ich mich bedanken möchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit und in jeder Hinsicht – beruflich wie auch privat - unterstützt und gefördert haben. Ohne sie wäre dieser berufliche Gang nicht möglich gewesen. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

9 Lebenslauf

Information zur Person

Name: Lars Burdorf
Eltern: Dipl. Ing. Dag Burdorf
Vera Burdorf, geb. Dude
Geburtstag und -ort: 20.12.1971, Bonn, Deutschland
Nationalität: Deutsch
Familienstand: Ledig, keine Kinder

Schulische Ausbildung

1977-1980 Grundschule Munkbrarup
1980-1982 Grundschule Deutsche Schule Paris, Frankreich
1982-1984 Gymnasium Deutsche Schule Paris, Frankreich
1984-1991 Andrae-Gymnasium Herrenberg

1991 Abitur / Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1991-1993 Rettungshelfer, Deutsches Rotes Kreuz Herrenberg

Medizinische Ausbildung

1993-2001 Studium der Human Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München
Abschluss: Ärztliche Prüfung / Teilapprobation, 17.05.2001
Approbation, 16.01.2003

Famulaturen (1994/1995): Abteilung für Herzchirurgie, Krankenhaus München-Bogenhausen
Abteilung für Plastische Medizin, Krankenhaus München-Bogenhausen
Dr. B. Simon, Pädiatrische Praxis, München

Praktisches Jahr : 03.2000-07.2000 Medizinische Klinik I,
Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München
07.2000-01.2001 Chirurgische Klinik,
Innenstadtklinik, Ludwig-Maximilians-Universität, München
01.2001-04.2001 Dr. von Haunersches Kinderspital
Ludwig-Maximilians-Universität, München

Bibliographie

Burdorf L, Schuhmann N, Postrach J, Thein E, Hallek M, Reichart B, Büning H, Schmoeckel M. AAV-mediated gene transfer to cardiac cells in a heterotopic rat heart transplantation model. *Transplant Proc.* 2007 Mar;39(2):567-8.

Burdorf L, Schuhmann N, Schulz A, Kohn M, Thein E, Brandl U, Hallek M, Reichart B, Büning H, Schmoeckel M. The in situ Langendorff perfusion system: A new method for viral mediated gene transfer to porcine hearts prior transplantation
Thorac cardiovasc Surg. 2008, 56; SUPP/1, pages MO46

Burdorf L, Hofmann A, Postrach J, Messow D, Gleich B, Weyh T, Thein E, Mordstein V, Reichart B, Pfeifer A, Schmoeckel M.
Magnetofection-enhanced lentiviral mediated gene transfer to cardiac cells in a heterotopic heart transplantation model.
Xenotransplantation. 2007 Jul ;14 (4):372 17669203

Burdorf L, Schuhmann N, Büning H, Postrach J, Mordstein V, Hallek M, Bittmann I, Reichart B, Schmoeckel M.
In vivo AAV mediated gene transfer to cardiac endothelial cells is possible but species-specific
Thorac cardiovasc Surg 2006; 54; DOI: 10.1055/s-2006-925872

Brandl U, Jöckle H, Erhardt M, Michel S, **Burdorf L**, Brenner P, Bittmann I, Rössle M, Mordstein V, Hammer C, Thein E, Reichart B, Schmoeckel M.
Reduced Fibrin Deposition and Intravascular Thrombosis in hDAF Transgenic Pig Hearts Perfused With Tirofiban.
Transplantation. 2007 Dec 27;84(12):1667-76.

Detter C, Wipper S, Russ D, Iffland A, **Burdorf L**, Thein E, Wegscheider K, Reichenspurner H, Reichart B. Fluorescent cardiac imaging: a novel intraoperative method for quantitative assessment of myocardial perfusion during graded coronary artery stenosis.
Circulation. 2007 Aug 28;116(9):1007-14. Epub 2007 Aug 7.

Brandl U, Erhardt M, Michel S, Jöckle H, **Burdorf L**, Bittmann I, Rössle M, Mordstein V, Brenner P, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M.
Soluble Galalpha(1,3)Gal conjugate combined with hDAF preserves morphology and improves function of cardiac xenografts.
Xenotransplantation. 2007 Jul;14(4):323-32.

Brandl U, Michel S, Erhardt M, Brenner P, **Burdorf L**, Jöckle H, Bittmann I, Rössle M, Mordstein V, Baschnegger H, Bauer A, Hammer C, Reichart B, Schmoeckel M.
Transgenic animals in experimental xenotransplantation models: orthotopic heart transplantation in the pig-to-baboon model.
Transplant Proc. 2007 Mar;39(2):577-8.

Brandl U, Erhardt M, Jöckle H, Michel S, Thein E, Bittmann I, Brenner P, **Burdorf L**, Hammer C, Schmoeckel M, Reichart B.
Fluorescent microspheres reveal different regional blood flow in hyperacutely rejected nontransgenic and hDAF pig hearts.
Transplant Proc. 2006 Apr;38(3):733-4
