

**Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik,  
Klinikum Großhadern,  
Ludwig-Maximilians-Universität, München  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Reichart**

# **AAV 2 vermittelte Transduktion von porcinem Myokard im Transplantationsmodell**

**Dissertation**

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

**vorgelegt von**

**Alexandra Schulz**

**aus Lemgo**

**2009**

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilian  
Universität München

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Michael Schmoeckel

**Mitberichterstatter:** Prof. Dr. Gunnar Schotta  
Prof. Dr. Hans Ulrich Kreider – Stempfle

**Betreut durch:** Prof. Dr. med. M. Schmoeckel

**Mitbetreut durch:** Dr. med. L. Burdorf

**Dekan:** Herr Prof. Dr. Dr.h.c. Maximilian Reiser

**Tag der mündlichen Prüfung:** 12.11.2009

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einführung</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 Hintergrund</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Zielsetzung</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 Grundlagen</b> .....	<b>11</b>
1.3.1 Transduktion .....	11
1.3.2 Adeno-assoziierte Virusvektoren (AAV).....	11
1.3.3 Markergene .....	14
1.3.4 Transplantatabstoßung.....	17
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2 Versuchstiere</b> .....	<b>26</b>
<b>2.3 Vektoren und Histamingabe</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5 Durchführung der Transduktionsversuche</b> .....	<b>32</b>
2.5.1 Narkose.....	32
2.5.2 Monitoring .....	33
2.5.3 Operationstechnik .....	33
2.5.4 Postoperativer Verlauf .....	40
2.5.5 Organexplantation .....	41
2.5.6 Histopathologische Untersuchungen .....	41

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
<b>3.1 Etablierung von Operationsmodell und -technik</b> .....	<b>44</b>
<b>3.2 Ergebnisse der AAV-Transduktion</b> .....	<b>47</b>
3.2.1 Erhobene Parameter .....	47
3.2.2 Effizienz der Transduktion .....	65
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>70</b>
<b>4.1 Erreichen der Zielsetzung</b> .....	<b>70</b>
<b>4.2 Fazit und Ausblick</b> .....	<b>90</b>
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>92</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>95</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>109</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>111</b>
<b>9. Danksagung</b> .....	<b>112</b>
<b>10. Lebenslauf</b> .....	<b>113</b>

## 1. Einführung

### 1.1 Hintergrund

Die erste erfolgreiche Herztransplantation (HTX) in Deutschland wurde am 7. Mai 1981 am Deutschen Herzzentrum in München durchgeführt [DSO 2008]. Seither sind in Deutschland 9465 Herzen transplantiert worden – allein 2007 wurden 394 HTX durchgeführt [DSO 2008]. Die häufigsten Grunderkrankungen der Patienten, für die eine HTX die letzte lebensrettende Therapieoption darstellt, sind aktuell die Kardiomyopathie, welche häufig durch koronare Herzkrankheit, Klappenfehler oder kongenitale Erkrankungen ausgelöst wird [Eurotransplant International Foundation 2008]. Im Verlauf ihrer Krankheitsgeschichte nehmen diese Patienten eine Vielzahl von organunterstützenden, medikamentösen, chirurgischen und konservativen Therapien in Anspruch. Im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz stellt die HTX für ein Prozent der Patienten den Goldstandard der langfristigen Therapieoptionen dar [Klotz S 2006, Kindermann W 2008, Waldenberg F 2008].

Patienten, die auf eine HTX angewiesen sind, werden aktuell mit dem Problem einer deutlichen Diskrepanz zwischen Transplantatangebot und – nachfrage konfrontiert. 2007 waren in Deutschland 774 Empfänger zur HTX gelistet. Im gleichen Zeitraum wurden jedoch nur 377 Herzen zur Transplantation gespendet [Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung 2008, DSO 2008]. Betrachtet man die Statistik, konnte damit weniger als 20% des Bedarfs der 12 000 Transplantationsgelisteten Patienten gedeckt werden [Spiegel Online 2007].

Dieses Missverhältnis macht deutlich, dass der hohen Nachfrage nach Transplantaten begegnet werden muss. Es ist daher erklärtes Ziel, das Angebot an Transplantaten durch Förderung der Spendenbereitschaft in der Bevölkerung auf der einen Seite und Förderung der Teilnahmebereitschaft des medizinischen Fachpersonals auf der anderen, sowie durch Bildung von Kooperationen zur länderübergreifenden Vermittlung der Transplantate zu steigern. Darüber hinaus müssen alle erdenklichen Anstrengungen unternommen werden, vorhandene, bereits transplantierte Organe zu erhalten und ihre maximale Funktionsdauer zu gewährleisten [DSO 2008, Mauer D. 2003, Bein T 2003].

### **Gentherapie in der Transplantationsmedizin**

In diesem Zusammenhang spielt die Therapie und Prophylaxe der Transplantatabstoßung und die Verlängerung des Graftüberlebens eine bedeutende Rolle. Im ersten postoperativen Jahr ist die akute Abstoßungsreaktion eine der häufigsten Ursachen für das Versterben herztransplantierte Patienten [Hosenpud JD 2000]. Trotz Verlängerung des Transplantatüberlebens aufgrund erheblicher medizinischer und pharmakologischer Entwicklungen in den vergangenen Jahren, überleben im Durchschnitt nur 80% der Patienten das erste Jahr und 62% das fünfte Jahr nach HTX [Klotz S 2006, Kindermann W 2008, Waldenberg F 2008].

Zentrales postoperatives Ziel ist es daher, Abstoßungen der transplantierten Herzen zu verhindern und damit eine wichtige Voraussetzung für ein langes Transplantatüberleben und die Beschwerdefreiheit des Patienten zu schaffen. Bisher werden immunsuppressiv wirkende Medikamente eingesetzt, welche über ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil verfügen und zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität und – erwartung der Patienten führen [Kindermann W 2008, Mason J 1990]. Aktuell werden daher Anstrengungen unternommen, alternative Therapien in diesem Bereich zu entwickeln.

In diesem Zusammenhang gewinnen gentherapeutische Ansätze zunehmend an Bedeutung. Hierbei handelt es sich um das gezielte Einbringen von DNA-Molekülen in eine Zielzelle und die anschließende Expression des transgenen Proteins. Zahlreiche kardiovaskuläre Erkrankungen können durch Gentherapie bereits erfolgreich klinisch therapiert werden [Chu Y 2007].

Um eine Verlängerung der Transplantationsüberlebenszeit erreichen zu können, müsste ein Gentransfer von Genen mit immunsuppressiven, immunmodulatorischen und damit Transplantat-protektiven Eigenschaften erfolgen. Insbesondere sind in diesem Zusammenhang bereits Studien zum Gentransfer von anti-inflammatorischen Zytokinen (z.B. vIL-10, IL-10, TGF- $\beta$ ) und CTLA4-IG erfolgreich durchgeführt worden. Diese Studien konnten eine Verlängerung der Transplantatazeptanz und Transplantatüberlebenszeit aufzeigen [Salgar SK 2004, Hayashi S 2005, Dai Z 1999].

### **Viraler Gentransfer in der Gentherapie**

Da reine DNA gemäß aktueller Studien nicht geeignet ist, die meisten Gewebearten und Zellen effizient zu transduzieren [Chu Y 2007], werden hierfür Vektorsysteme benutzt. Ein zum Gentransfer geeignetes Vektorsystem zeichnet sich durch ein hohes Maß an Effizienz und Sicherheit aus, dem eine möglichst geringe Immunogenität und Toxizität und ein geringer Produktionsaufwand gegenüberstehen. Nicht-virale Verfahren verfügen dabei über ein hohes Maß an Biosicherheit, sind jedoch weniger effizient hinsichtlich ihrer Transduktionsfähigkeit [Nishikawa M 2001]. Virale Vektoren hingegen schleusen ihre Information gezielt in das Wirtsgenom ein. Dabei finden in diesem Zusammenhang besonders adeno-assoziierte Vektoren Verwendung, da sie im Gegensatz zu Adenoviralen Vektoren eine geringe Immunantwort hervorrufen und zu einer stabilen, effizienten Transduktion führen [Chu Y 2007].

**Die Wahl des geeigneten Vektorsystems ist dabei in Hinblick auf die konkrete Fragestellung zu treffen:**

**Relevant sind dabei**

- **die Art des zu transduzierenden Gewebes**
- **die Teilungsintensität der Zielzellen**
- **der Expressionsort des Proteins**
- **die Expressionshöhe und**
- **die Regulierbarkeit des Transgens.**

Eine besondere Möglichkeit stellt im Rahmen der Herztransplantation die lokale Expression eines entsprechenden Transgens dar. Dies bietet dem Patienten den Vorteil, einer lokal auf das Transplantat begrenzten, nicht systemisch wirkenden Immunsuppression [Bagley I 2003]. Bisher auftretende Nebenwirkungen, welche die Lebensqualität der Betroffenen deutlich einschränken können, würden damit erheblich reduziert werden [Chu Y 2007].



## 1.2 Zielsetzung

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Fragestellungen lassen sich in zwei zentrale Zielsetzungen gliedern:

### 1. Ziel:

**Etablierung eines Perfusionsmodells, welches vor der Transplantation die Applikation von Genvektoren an einem schlagenden Herzen unter physiologischen Bedingungen ermöglicht.**

Während der Perfusionsphase sollten dabei folgende Parameter erreicht werden:

- Normothermie
- Physiologischer Perfusionsdruck
- Normoxämie und Normokapnie

Unser Ziel war es, eine Perfusion des schlagenden Herzens über einen Zeitraum von mindestens 30 Minuten zu ermöglichen. Anhand der erhobenen Parameter, konnte die Funktionalität der Perfusion beurteilt werden.

Dabei sollten folgende Zielgrößen erreicht werden:

- Sinusrhythmus des Spenderherzens
- Physiologische Herzfrequenz des Transplantats
- Physiologischer Säure-Basen Haushalt im System
- Inspektorisch unauffälliges Organ

Konnten wir diese Werte erreichen, sahen wir eine optimale Protektion des Gewebes und eine gute Organfunktion als gegeben an.

**2. Ziel:**

**Beweis eines stabilen, effizienten und selektiven Gentransfers mittels des verwendeten rAAV 2 bei intrakoronarer Perfusion im etablierten Perfusionsmodell**

Die Perfusionsmethode sollte die optimalen Rahmenbedingungen für einen effizienten Gentransfer mittels rAAV 2 am Herzen schaffen. Neben den physiologischen Bedingungen setzten wir voraus, dass für dieses Ziel die Applikation einer möglichst hohen Vektordosis nötig ist. Eine maximale Vektorkonzentration sollte durch die folgenden Voraussetzungen geschaffen werden:

- Applikation hoher Vektorkonzentration und – menge
- lange Applikationszeit
- geringes, rezirkulierendes Blutvolumen

## 1.3 Grundlagen

### 1.3.1 Transduktion

Als virale Vektoren werden in der Genetik und Biotechnologie gezielt veränderte Viruspartikel verstanden, die genetisches Material *in vivo* oder *in vitro* in eine Empfängerzelle einschleusen. Sie basieren wahlweise auf Adenoviren, Herpes Simplex Viren, verschiedenen Retroviren oder den Adeno-assoziierten Viren (AAV) [Kügler S 2003]. Transportiert ein Virus-Vektor DNA in eine Zelle, wird dieser Vorgang als Transduktion und die entstandene Zelle als transduzierte Zelle bezeichnet. Virale Vektoren werden vornehmlich in der Gentechnologie, der Gentherapie und der Grundlagenforschung verwendet [Knippers R 2006, Flint SJ 2003]. Die Wahl des idealen viralen Gentransfersystems kann daher abhängig von der Art und der Organzugehörigkeit des Zielgewebes sein [Kügler S 2003].

In dem von uns durchgeführten Versuch sollte kardiales Gewebe transduziert werden. Zu diesem Zweck verwendeten wir gezielt rekombinante Adeno-assoziierte Virus-Vektoren vom Serotyp 2 (rAAV 2). Diese hatten sich zum Zeitpunkt unserer Versuchsdurchführung im Rahmen zahlreicher Studien, welche im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher betrachtet werden, als vielversprechend geeignet für die Transduktion von verschiedenen Gewebearten erwiesen.

### 1.3.2 Adeno - assoziierte Virusvektoren (AAV)

Die Adeno-assoziierten Viren (AAV) sind Parvoviren aus der Gruppe der Dependoviren [Muzycka N 1992, Palomque J 2007]. Das Genom der Wildtyp Spezies ist in das Genom der meisten Menschen integriert und konnte bisher mit keinen Krankheitssymptomen assoziiert werden [Kügler S 2007, Praks WP 1970, Jayandharan GR 2008, Müller C 2008]. Die AAV verfügen über ein einzelsträngiges, lineares DNA Genom von etwa 4,7 kb Größe [Palomque J 2007, Jayandharan GR 2008] und ein unbehülltes, ikosaedrisches Kapsid von etwa 20 bis 30 nm Durchmesser [Xie Q 2002, Berns KL 1972, Yang L 2004]. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 5,5 und 6,2 Millionen Dalton. Damit bilden die AAV die kleinste, bisher bekannte Gruppe der eukaryotischen DNA Viren [Yang L 2004]. Als Dependoviren werden die AAV bezeichnet, da sie sich nur mit Hilfe einer Superinfektion durch ein Helfervirus, durch Adenoviren, Herpes-simplex Viren, Papillomaviren, humanes Herpes Virus Typ 6 oder humanes Cytomegalievirus vermehren. [Kügler S 2007,

Palomque J 2007, Myzycka N 1992, Berns KL 1990, Bartlett JS 1996]. AAV-basierte Vektorsysteme haben sich besonders zur Transduktion von muskulärem Gewebe als geeignet erwiesen. Diese Eigenschaft wird ferner positiv durch die kleine Teilchengröße der Vektoren unterstützt, welche eine vereinfachte Diffusion in muskuläres Gewebe und extrazelluläre Matrix ermöglicht [Palomque J 2007].

### **Lebenszyklus AAV**

Der Lebenszyklus der AAV kann in eine latente und eine lytische Phase unterteilt werden. Die latente Phase ist dadurch gekennzeichnet, dass das Virion in die Wirtszelle aufgenommen und entpackt wird. Zu diesem Zeitpunkt fördern virale Regulatorproteine die Integration ins Wirtsgenom und hemmen zugleich eine weitergehende Replikation und Expression der viralen DNA. Das Genom des AAV wird im Rahmen dieser latenten Infektion bevorzugt ortsspezifisch in das humane Chromosom 19, in 19q-14.4qter, integriert [Kotin RM 1991, Samulski RJ 1991, Weitzmann MD 1994, Schipper ML 2006]. Die zweite lytische Phase ist abhängig von der Anwesenheit der Helferviren. Diese stellen Gene zur Verfügung, die die Genexpression regulieren und für virale DNA Polymerasen oder auch Helikasen kodieren. [Kügler S 2007, Berns KL 1996]. Durch Infektion der Wirtszelle mit einem Helfervirus kann eine produktive Replikation eingeleitet werden. Die Infektion der Wirtszelle selber erfolgt im Rahmen einer rezeptorvermittelten Endozytose. Die AAV-Partikel werden in Clathrin umhüllten Vesikeln in die Zelle aufgenommen und zum Nukleus transportiert [Bartlett JS 2000, Summerford C 1999, Summerford C 1999, Plattner H 2006].

### **Vorteile AAV**

Es sind derzeit mehr als 120 Varianten der AAV bekannt und die Entwicklung neuer Serotypen schreitet stetig voran [Palomque J 2007, Gao GP 2002]. AAV-basierende Vektoren bieten zahlreiche Vorteile gegenüber anderen Vektorsystemen. Mit ihrer Hilfe können sowohl Zellen *in vivo* und *in vitro* als auch in der Zellteilung befindliche sowie sich nicht teilende Zellen transduziert werden [Schipper ML 2006]. Ferner ermöglichen sie *in vivo* eine schnelle, effiziente und langfristige Expression der transgenen Information [Danos O 2008, Pacak CA 2006, Mc Carty D 2001 Gao GP 2006] und bieten ein geringes Risiko für Mutation durch Insertion [Fechner H 2008].

Bei der Herstellung rekombinanter AAV-Vektoren (rAAV) wird das virale Genmaterial aus dem Vektor entfernt und durch die genetische Information ersetzt, welche in die Zielzelle eingeschleust werden soll. Die genetische Manipulation des Virus führt zum Verlust der Replikationsfähigkeit. Aus diesem Grund gelten AAV basierte Vektorsysteme als die sichersten viralen Vektoren und finden unter der biologischen Sicherheitsstufe eins (S1) Verwendung [Pinkenburg O 2004]. Vektoren, welche auf rAAV basieren, erfüllen im weitesten Sinne die Anforderungen des idealen Vektorsystems: Sie können einfach und in großer Menge produziert werden, sind gewebespezifisch, werden an einer bekannten Position im Genom inseriert, haben ein großes Fassungsvermögen für genetische Informationen und rufen eine minimale Immunantwort hervor [Yang L 2004]. Ferner kann ihre Expression kontrolliert und reglementiert werden – wobei sie sehr effizient *in vivo* umgesetzt werden [Kwon I 2008].

Verschiedene Studien im Tiermodell haben erfolgreiche Resultate unter Verwendung von rAAV hervorgebracht [Acland GM 2001, Wang L 2002, De B 2004]. Aktuell werden im Rahmen der Gentherapie beim Menschen rAAV basierte Vektorsysteme bereits erfolgreich zur Therapie von zahlreichen Erkrankungen wie Hämophilie B und Cystischer Fibrose eingesetzt [Kay MA 2000, Manno CS 2003, Wright JF 2008, Müller C 2008, Carter BJ 2005, Warrington KH 2006, Fiandaca M 2008].

### **Nachteile rAAV**

Nachteilig wirkt sich aus, dass die Größe der einzubringenden Fremd - DNA auf eine Kapazität von 4,7 kbp begrenzt ist [Yang L 2004]. Aus diesem Grund sind Strategien entwickelt worden, um diese Kapazität zu erhöhen. AAV verfügt über die Fähigkeit, in infizierten Zellen Konkatemere zu bilden. Somit kann ein Gen verteilt und aus der mRNA durch Herausspleißen wieder rekonstruiert werden [Schipper ML 2006, Sun L 2000, Yan Z 2000, Nakai H 2000, Duan D 2001]. Ferner haben Studien gezeigt, dass bis zu 40% der Patienten bei wiederholter Gabe von verschiedenen AAV Serotypen Antikörper gegen AAV Kapside ausbilden. Häufig besteht seit Kindheit eine Immunität gegen die Wildtyp Variante, welche die Einsetzbarkeit von AAV-Vektoren in der Gentherapie einschränkt [Palomque J 2007, Müller C 2008, Doenecke A 2008]. Die zelluläre Immunantwort auf AAV ist jedoch schwächer ausgebildet als bei der Verwendung anderer Vektorsysteme [Beck SE 1999, Chirmule N 2000, Hernandez YJ 1999]. Ursächlich für diese schwache Immunantwort ist die Tatsache,

dass besonders antigenpräsentierende Zellen nur schlecht durch AAV infiziert werden [Jooss K 1998].

### **rAAV 2**

Im Mittelpunkt des Forschungsinteresses und zahlreicher klinischer Testreihen stand bisher verstärkt der AAV Serotyp 2 [Muzycka N 1992, Müller C 2008, Rabinowitz JE 2000]. Die einzelnen Serotypen unterscheiden sich voneinander durch die Aminosäuresequenzen ihrer Kapsidproteine. Diese Eigenschaft wird gezielt genutzt, um ein Ansprechen der verschiedenen Serotypen der rAAV auf bestimmte Oberflächenproteine zu erreichen oder zu verhindern.

AAV2 ist bisher verstärkt zur Untersuchung und Therapie kardialer Dysfunktionen benutzt worden [Palomque J 2007]. Verantwortlich für die spezifischen Bindungseigenschaften von AAV2 auf Zelloberflächen ist seine Affinität zum Heparin Sulfat Proteoglycan (HPSG) Rezeptor. Um eine Interaktion der Vektoren zur Antikoagulanz Heparin auszuschließen, haben wir in unseren Versuchen stattdessen Argatroban verwendet, für welches keine Affinität zum AAV bekannt ist. Ferner bindet AAV2 an die Ko-Rezeptoren FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) und Alpha  $\alpha$ -v- betha 5 Integrin [Yang L 2004].

### **1.3.3 Markergene**

Um die Effizienz eines Gentransfers qualitativ und quantitativ erfassen zu können, werden Reportergene als Marker verwendet. Diese können in Zusammenhang mit rAAV 2 basierten Vektorsystemen verwendet werden. Über die klassisch verwendeten Reportergene kann die Verteilung markierter Information, die Funktionalität von DNA-Sequenzen und das Maß der Genexpression nachvollzogen und quantifiziert werden [Danos O 2008, Montenarh M 2007, Kück U 2006]. Reportergene sind aufgrund ihrer Eigenschaften eindeutig zu detektieren. Daher kann durch das Abbilden Ihrer Expression der zu untersuchende Signalweg eindeutig dargestellt werden. In Kombination mit der Verwendung von rAAV 2 ist keinem Reportergen der Vorzug zu geben, Ihre Auswahl muss angesichts der im Versuch vorliegenden Anforderungen erfolgen [Schippel ML 2006]. In unseren Versuchen haben wir als Reportergene sowohl das Green Fluorescent Protein (GFP) als auch Luciferase und die  $\beta$ -Galactosidase (LacZ) verwendet.

### **Green Fluorescent Protein (GFP)**

GFP ist ein von der Qualle *Aequorea victoria* stammendes Protein, dessen Expression über einen längeren Zeitraum *in vivo* untersucht werden kann. In der Zelle ist eine Lokalisation seines Expressionsortes möglich. Die betrachteten Zellen müssen zu diesem Zweck nicht vorbehandelt werden [Schipper ML 2006, Montenarh M 2007]. GFP verfügt über eine Größe von 27kDa und umfasst als Monomer oder Dimer 238 Aminosäuren. Es zeichnet sich durch eine grüne Autofluoreszenz aus. Seine Anregung erfolgt durch blaues Licht. Es strahlt grünes Licht ab, welches mit dem Fluoreszenzmikroskop erfasst werden kann [Kügler S 2007, Kück U 2006, Hastings JW 1969]. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge des exprimierten Proteins [Hastings JW 1969]. Derzeit sind vierundzwanzig verschiedene natürlich vorkommende GFP-Proteine bekannt [Cormier MJ 1974, Levine LD 1982, Morin JG 1971], die über deutlich unterschiedliche Emissionsmaxima verfügen. Die Emissionswellenlänge des grünen Lichtes von GFP liegt bei 507 nm [Chalfie M 1994, Prasher DC 1992].

Vorteile bei der Nutzung von GFP liegen in dessen Stabilität gegenüber Temperatur und Substanzen wie Acrylamid, Halogeniden oder molekularem Sauerstoff [Rao BDN 1980]. Als Nachteil bei der Verwendung von GFP ist sein im Vergleich zum Gebrauch anderer Reportergene schwächeres Fluoreszenzsignal zu nennen, welches durch einen Ausfall von inclusion bodies weiter reduziert werden kann [Chalfie M 1998]. Ferner bildet sich der fluoreszierende Farbstoff zeitversetzt erst zwei Stunden nach Synthese des GFP.

### **Luciferase**

Das Reportergen Luciferase ist ein bei Leuchtkäfern und Leuchtbakterien vorkommendes Enzym. Es katalysiert unter Emission von Licht in Gegenwart von ATP und  $Mg^{2+}$  die oxidative Decarboxylierung von Luciferin [Kück U 2006]. Soll die Expression eines Gens mit Hilfe der Verwendung von Luciferase quantifiziert werden, wird das zu beschreibende Gen durch die Luciferase ersetzt. Zum Nachweis der Luciferaseexpression werden die Zellen lysiert, und das Zellhomogenat wird mit Luciferin und ATP gemischt. Dabei auftretende Lumineszenz zeigt die Expression von Luciferase an. Diese Reaktion kann quantitativ mit einem Photomultiplier-Detektor erfasst werden [Schipper ML 2006, Montenarh M 2007, Kück U 2006].

### **$\beta$ -Galactosidase Gen (LacZ)**

LacZ stammt aus dem Lac-Operon des Bakteriums *Escherichia coli* und spaltet Lactose in Galactose und Glucose. Der Nachweis der LacZ Reportergen Aktivierung erfolgt durch die Stoffwechsellistung der  $\beta$ -Galaktosidase und dem Maß dieser Aktivität. Die Enzymaktivität kann mit Hilfe von chromogenen Substanzen sichtbar gemacht werden. Dabei kann unter Zugabe von Chlorphenolrot- $\beta$ -D-Galactopyranosid eine photometrische Analyse des roten Reaktionsproduktes bei 595 nm erfolgen. Ferner kann die kostenintensivere Messung durch Chemilumineszenz oder die fluorimetrische Messung der farbigen Substrate durchgeführt werden. LacZ wird als Reportergen eingesetzt, wenn das Ziel eine quantitative Messung von Genprodukten ist [Schipper ML 2006, Montenarh M 2007, Kück U 2006].



### 1.3.4 Transplantatabstoßung

Derzeit beträgt die perioperative Letalität im Rahmen der HTX zwischen 3% und 12% [Kindermann W 2008]. Im postoperativen Verlauf stellt die akute Abstoßungsreaktionen eine der häufigsten Todesursachen von herztransplantierten Patienten innerhalb des ersten Jahres nach HTX dar [Hosenpud JD 2000]. Um diese Komplikation frühzeitig erkennen und ihr therapeutisch begegnen zu können, werden transplantierte Patienten engmaschig kontrolliert.

#### Formen der Transplantatabstoßung

Nach ihrem zeitlichen Auftreten werden hyperakute, akzelerierte, akute und chronische Abstoßungen unterschieden. Nach der Pathogenese unterscheidet man humorale und zelluläre Abstoßungsreaktionen [Kindermann W 2008, Lauchart W 2006, Baba HA 2002].

- Die **hyperakute Abstoßung** setzt bereits während der Transplantation ein und ist auf das Vorliegen von präformierten Antikörpern zurückzuführen. Diese erkennen Blutgruppenantigene und polymorphe MHC-Antigene und bewirken eine sehr heftige Abstoßungsreaktion [Gould DS 1999]. Es kommt zu einer intravasalen Koagulation und Komplementaktivierung im Transplantat [Braun WE 2003].
- Die **akzelerierte Abstoßung** tritt zwischen dem 2. und 5. Tag nach Transplantation auf und ist ebenfalls auf eine frühere Sensibilisierung des Empfängers zurückzuführen. Im Gegensatz zur hyperakuten Abstoßung müssen zum Zeitpunkt der Transplantation aber noch keine reaktiven Antikörper nachweisbar sein. Grundlage der akzelerierten Abstoßung sind reaktivierte B und T Lymphozyten [Kieselbach B 2004].
- Die **akute Abstoßungsreaktion** tritt innerhalb des ersten Jahres nach Transplantation auf und kann gemäß ihrer zugrundeliegenden Pathophysiologie in eine akute zelluläre und eine akute humorale Form eingeteilt werden [Baba HA 2002]. Die zelluläre Form wird überwiegend durch Lymphozyten, die humorale Abstoßung durch Antikörper hervorgerufen.
- Die **chronische Abstoßung** ist eine Form der multifaktoriellen Abstoßung und die häufigste Ursache für ein Transplantatversagen nach dem dritten Jahr

[Suthanthiran M 1997]. Erst Wochen bis Jahre nach Transplantation stellt sich eine Transplantatvaskulopathie ein. Neben der Abstoßung im immunologischen Sinne sind auch andere Faktoren an der progredienten Schädigung des Transplantats beteiligt. Entzündungszeichen sind nicht zwingend nachzuweisen, die Blutgefäße sind irreversibel verengt. Funktional wandern CD4-T-Effektorzellen vom TH1-Typ in die Gefäße ein und stimulieren Makrophagen und Endothelzellen. Durch die Einwanderung von Monozyten, welche ihrerseits zu Makrophagen differenzieren und TNF- $\alpha$  und IL-1 produzieren, wird eine chronische Entzündung unterhalten. Diese führt im Verlauf zu einer Fibrosierung und Sklerosierung und damit zu einer Verengung der Gefäßwände. Final entstehen dabei Koronarsklerosen. Die chronische Abstoßung kann nicht erfolgreich therapiert werden und führt hinsichtlich der Gefahr eines Verlustes der Organfunktion zu der Notwendigkeit einer Retransplantation oder alternativ zur Anlage eines Bypasses.

Art und Intensität der Abstoßungsreaktion wird beeinflusst vom Zustand des Transplantats und von der Reaktion des Empfängers auf das transplantierte Fremdgewebe, welche auf dem Erkennen der „human leukocyte antigens“ (HLA)-Antigene beruht. Diese werden auf den Spenderzellen exprimiert und im Major-Histokompatibilitätskomplex (MHC) mit getrennten Regionen der MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Genen auf Chromosom 6p21.1-21.3 kodiert [Granja CB 1996].

Im Fall einer Transplantation sind zwei verschiedene Wege der Antigenpräsentation zu unterscheiden, auf denen Alloantigene als fremd erkannt werden: der direkte und der indirekte Weg. Im Rahmen des direkten Weges werden körperfremde MHC-Moleküle selbst auf den antigenpräsentierenden Zellen der Spenderzellen als fremd erkannt und von den Empfänger-T-Zellen bekämpft. In diesem Zusammenhang können sowohl präsentierte Peptide als auch Bereiche des fremden MHC Moleküls selber erkannt werden. Beim indirekten Weg erfolgt eine Präsentation fremder, aus abgebauten Spenderzellen stammender Peptide über MHC Moleküle des Empfängers [Braun WE 2003].

### **Monitoring**

Um eine Transplantatabstoßung frühzeitig zu erkennen, ist ein engmaschiges Monitoring nötig. In diesem Zusammenhang ist im Vorfeld einer Transplantation auszuschließen, dass eine Präsensibilisierung des Empfängers gegen Gewebe des Spenders besteht [Gouls DS 1999]. Daher wird ein Lymphozytentoxizitätstest, eine HLA-Testung des Empfängers und des Spenders, durchgeführt. Die Ermittlung der Kompatibilitätsmerkmale erlaubt eine Abschätzung der Organfunktion nach der Transplantation. Darüber hinaus können postoperativ gemessene spenderspezifische Antikörper so besser bewertet werden. Eine HLA-Inkompatibilität von Spender und Empfänger ist eine Kontraindikation zur Transplantation. Eine eindeutige HLA-Übereinstimmung ist jedoch aufgrund der Polymorphie und Polygenität der menschlichen MHC-Moleküle praktisch nur bei Geschwistern möglich. Ferner deckt die HLA-Typisierung vor Transplantationen nicht das gesamte Spektrum der HLA-Moleküle ab, so dass auch bei Übereinstimmung auf Nukleotidebene durchaus Unterschiede bestehen können [Kieselbach B 2004]. Postoperativ sind zur Abstoßungsdiagnostik in regelmäßigen Abständen Myokardbiopsien zu entnehmen.

### **Medikamentöse immunsuppressive Therapie**

Den entscheidenden Durchbruch in der Organtransplantation stellte die Einführung immunsuppressiver Therapieschemata unter Verwendung des Immunsuppressivums Cyclosporin A in Verbindung mit Azathioprin und Steroiden seit den frühen 1980er Jahren dar [Wilhelm MJ 2002, Karow T 2008]. Diese haben zu einer deutlichen Steigerung der durchschnittlichen Überlebenszeiten durch Senkung der Abstoßungsrate nach HTX geführt. Cyclosporin A war als Calciuminhibitor das erste selektiv eingreifende Immunsuppressivum [Hummel M 2004]. Die bereits im Vorfeld verwendeten Kortikoide und Azathioprin wirken dagegen unspezifisch durch Hemmung des Entzündungsprozesses und der Zellteilung. Neben den Vorteilen, die diese neue Medikamentenkombination mit sich brachte, zeigte sich jedoch auch bald ihr ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil.

Die Bestrebungen gehen aktuell dahin, nebenwirkungsarme Medikamentenkombinationen zu wählen [Kröger MJ 2004]. Zu den heute verwendeten Immunsuppressiva zählen weiterhin Glukokortikoide, welche unspezifisch antiphlogistisch und

immunsuppressiv über eine Hemmung der Freisetzung von Interleukin 1 wirken und damit sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort betreffen. Da ihr Nebenwirkungsprofil jedoch sehr groß ist, wird die Verwendung steroidarmer Kombinationstherapien sowie das Absetzen von Steroiden in abstoßungsarmen Intervallen angestrebt. Weiterhin finden Calcineurininhibitoren wie Tacrolimus und Cyclosporin A Verwendung. Diese bilden einen Komplex mit den Rezeptorproteinen und unterbrechen so die Signalkaskade der T-Zell-Rezeptoren. Die Bildung und Freisetzung von IL-2 aus den T Helfer Zellen wird damit unterbunden [Karow T 2008, Schwinger RHG 2006]. Sirolimus hingegen hemmt spezifisch über m-Tor die Aktivierung der T-Zellen. Es inhibiert damit an späterer Stelle die T-Zellaktivierung als Cyclosporin und Tacrolimus. Mycophenolat Mofetil bewirkt über eine nichtkompetitive, reversible Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase eine selektive Proliferationshemmung der Lymphozyten [Lauchart W 2006, Karow T 2008]. Ferner werden Lymphozyten-Antikörper im Rahmen der immunsuppressiven Therapie eingesetzt. Hier sind besonders Muromonab, Basiliximab, Daclizumab und im polyklonalen Bereich Antihuman-T-Zell-Immunsere zu nennen. Diese sind gegen Antigene der T-Lymphozyten und gegen Rezeptoren des IL-2 gerichtet und blockieren so die Lymphozyten oder hemmen ihre Aktivierung [Lauchart W 2006, Karow T 2008]. Ferner werden in diesem Zusammenhang ebenfalls zytotoxische Substanzen wie die Antimetabolite Azathioprin und Methotrexat und Alkylantien wie Cyclophosphamid eingesetzt. Bei der immunsuppressiven Therapie wird eine geringe und dauerhafte Therapie dieser sonst im Bereich der Chemotherapie verwendeten Medikamente benutzt. Die Wirksamkeit erklärt sich, in einer gegenüber den Stammzellen im Knochenmark verstärkten Empfindlichkeit des lymphatischen Gewebes gegenüber diesen Substanzen [Karow T 2008, Schwinger RHG 2006].

Auch die aktuell verwendeten Substanzen und Kombinationstherapien bringen noch immer ein umfassendes Nebenwirkungsprofil mit sich. Als Folge der lebenslangen postoperativen Immunsuppression ist eine deutliche Steigerung der opportunistischen Infektionsrate hinsichtlich viraler, mykotischer und bakterieller Infektionen beim Transplantatempfänger zu verzeichnen. Ferner besteht eine erhöhte Inzidenz maligner Neoplasien, Hyperlipidämie und -urikämie, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie, Adipositas, Osteoporose, sowie Funktionsstörungen von Niere, Magen-Darm, Leber und dem Zentralnervensystem [Kindermann W 2008,

Mason J 1990]. Daher werden Kombinationstherapien verwendet [Schwinger RHG 2006, Salaman JR 1986, Costanzo-Nordin MR 1990], die in der Lage sind, das Nebenwirkungsprofil der Medikamente zu begrenzen. Dennoch stellen sie eine erhebliche Belastung für den Patienten und eine Limitation des Transplantatüberlebens dar. Langfristig ist daher das Erreichen einer Toleranz des Empfängers gegenüber dem Spenderorgan das angestrebte Ziel [Wilhelm MJ 2002].

Die vorangegangenen Ausführungen lassen erkennen, dass die aktuell in der Klinik angewandte medikamentöse Therapie der Abstoßung transplantierten Organe durch die Verwendung von Immunsuppressiva eine erhebliche Bandbreite von Nebenwirkungen mit sich bringt. Diese führen zu einer starken Einschränkung der Lebensqualität der Patienten und der Überlebenszeit der Transplantate.

Fraglich ist, ob durch den gezielten Gentransfer immunmodulatorischer Proteine eine Reduktion des Bedarfs an immunsuppressiver Therapie und damit eine deutliche Reduktion des Nebenwirkungsprofils und des Graftüberlebens erreicht werden kann.

Einen Ansatz, diesen Gentransfer optimiert zu realisieren, stellt die von uns entwickelte *in-situ* Langendorff Perfusionsmethode dar. Das Prinzip dieser neuartigen Perfusionsmethode soll im nachfolgenden Abschnitt eingehend beschrieben werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### Fäden

Ethibond Excel 2-0, Ethicon, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien

Monocryl 3-0, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien

Monocryl 4-0, Ethicon INC, Somerville, New Jersey, USA

Prolene 2-0, Ethicon INC, Somerville, New Jersey, USA

Prolene 5-0, Ethicon, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien

Prolene 6-0, Ethicon, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien

Vicryl 3-0, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien

#### Gebrauchsutensilien

Aortic Arch Cannula, 77110 (10 French), Stöckert, Mirandola, Italien

Arterielle Schleuse (6 French), Arrow, Erding

Bedsidetest, Biotech, Dreieich

Desinfektionslösung Kodan, Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt

Einfach-Dom-Set, Becton Dickinson Critical Care Systems inc., Sandy, USA

EKG Elektroden Skintact F 40, Skintact, Innsbruck, Österreich

Hahnbank für Infusionstherapie, B-Braun, Melsungen

Handschuhe steril Biogel, Canute Court, Cheshire, England

Handschuhe unsteril, Sempermed, Wien, Österreich

Infusionsgerät, V86-P-R, 43.4357, Codan, Lensahn

i.v. Katheter, Braunüle 18 G, 20 G, B Braun Melsungen AG, Melsungen

Kauterelektrode, Valleylab, Boulder, USA

Leukoplast, BSN medical GmbH&Co KG, Hamburg

Mullbinden Nobagaze, Noba Verbandsmittel Danz GmbH, Wetter

Multi-Adapter, Sarstedt, Nürnberg

Nadel BD Microlance 3 (20G 1,5“, 25G 1“), Becton Dickinson GmbH, Fraga, Spanien

Neutralelektrode Poly Hesine, Tyco Healthcare UK Ltd., Valleylab, USA

OP Gesichtsmasken Surgine, Mölnlycke Healthcare Inc., Newtown, USA

Perfusorleitung, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg

Pflaster, Ethicon GmbH, Norderstedt

Saugeraufsatz, REF KEX 80, Cardinal Health, McGaw Park, USA

Serum Röhrchen weiss, rot, grün, Sarstedt, Nürnbergrecht

Skalpell No.11, Feather Safety Razor CO LTD, Osaka, Japan

Skalpell No.22, Feather Safety Razor CO LTD, Osaka, Japan

Spritze 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, Becton Dickinson SA, Fraga, Spanien

Spritze 100 ml, Medi Syst, Rheinstetten

Sprühpflaster Band Aid, Johnson&Johnson

Sterile Abdeckung grün Secu Drape, Sengewald Klinikprodukte, Rohrdorf-Thansau

Sterile Abdeckung Convertors, Cardinal Health, McGaw Park, USA

Sterile Mullkompressen, Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter

Tubus orotracheal 5,0 mm, Hi-Lo Lanz, Mallinkrod Medical, Athlone, Ireland

Unsterile Kompressen, Verbandmittel Danz GmbH, Wetter

Venous Arch Cannula (10 French), V123-10, Stöckert, Mirandola, Italien

Waschlösung Baktolin basic, Bode Chemie, Hamburg

Wundverband Cutiplast steril, Beiersdorf AG, Hamburg

### **Gerätschaften**

Beatmungsgerät Servo 900, Siemens, Elema, Schweden

Blutgasanalysegerät, Chiron Diagnostics Bayer Healthcare Essex, England

Defibrillator Sirecust 302, Siemens

EKG Gerät Sirecust 404, Siemens, Elema, Schweden

Infrarotleuchte

Madrein-Draht

Sauger

Temperatursonde rektal

Wärmematte

### **Instrumente**

Arterienklemme Kocher geraden, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen

Arterienklemme gerade, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen

Carotis Sperrer, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen

Haken nach Roux mittel, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen

Haken nach Roux groß, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen

Langenbeck Wundhaken, Griff vertikal zum Blatt, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Metzenbaumschere, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Miculicz Klemme, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Mosquitoklemme, Jacobson, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Nadelhalter, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Overholt-Klemme, Allgaier Instrumente, Frittlingen/ Tuttlingen  
Pinzette anatomisch, mittelbreit, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Pinzette chirurgisch, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Präparierklemme gebogen, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Präparierschere fein, gebogen, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Präparierschere fein, gerade, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Schlauchklemme, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Thoraxsperrerr, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Tuchklemme, gerade, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Tupferzange, BBraun, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Tupferzange, Heywood-Smith, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Volkman Wundhaken, 4 - Zähne, scharf, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Wundhaken, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen  
Wundsperrerr, Aesculap AG/ BBraun, Tuttlingen

### **Medikamente**

Argatra 100 mg/ml (Argatroban), Mitsubishi Pharma Deutschland, Düsseldorf  
Atropinsulfat B.Braun 0,5 mg (Atropin), B-Braun Melsungen AG, Melsungen  
Bepanthen Augen-und Nasensalbe (Dexpanthenol), Bayer Vital, Leverkusen  
Diazepam-ratiopharm 10 (Diazepam), Ratiopharm, Ulm  
Fentanyl Janssen 0,5 mg (Fentanyl), Janssen Cilag, Neuss  
Isofluran - Baxter (Isofluran), Baxter, Chicago, USA  
Isopropanol 70 % (Isopropanol), Bombastus-Werke AG, Freital  
Isotone Kochsalz Infusionslösung 0,9%, B. Braun, Melsungen  
Kardioplegielösung Custodiol, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hahnlein  
Ketamin - hameln (Ketamin), 50 mg/ml, Hameln Pharma plus GmbH, Hameln  
Midazolam - ratiopharm 5 mg/1 ml (Midazolam), Ratiopharm, Ulm  
Pancuronium Inresa (Pancuroniumbromid), Inresa, Freiburg  
Prograf 0, 5 mg (Tacrolimus), Axicorp Pharma GmbH, Friedrichsdorf



Propofol 2% (Propofol), MCT Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg

Stresnil (Azaperon) Janssen Cilag GmbH, Neuss

Temgesic (Buprenorphin) Essex Pharma GmbH, München

Urbason 16 mg (Methaylprednisolon), Aventis Pharma, Wien, Österreich

Voluven 6% 500 ml, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg

Xylocain Gel 2% (Lidocain), Astra Zeneca GmbH, Wedel

### **Perfusionssystem**

Dreiwegehahn Discofix, B Braun Melsungen AG, Melsungen

Kombistopper, B Braun Melsungen AG, Melsungen

Oxygenator D902, Lilliput2, Cobe Cardio-vascular Inc, Arvada, CO, USA

Reservoir (Durchmesser 7 cm, Höhe 14 cm), Eigenbau

Rollerpumpe MCP, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz

Schlauchverlängerungen Silikon, Raumedic-ECC, Rehau AG & Co, Rehau

## 2.2 Versuchstiere

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Tierversuche wurden nach den Vorschriften des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der Regierung von Oberbayern unter dem Tierversuchsantrag 55.2-1-54-2531-36-05 genehmigt.

Als Versuchstiere wurden deutsche Landschweine verwendet. Die Tiere entstammten dem Lehr- und Versuchsgut der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim.

Um Blutgruppen - assoziierte Abstoßungsreaktionen auszuschließen, war Blutgruppengleichheit zwischen Spender- und Empfängertier Voraussetzung für die Verwendung im Versuch. Die Blutgruppe der Tiere wurde unter Verwendung humaner Bedside - Tests ermittelt. Nur Wurfgeschwister, deren Blutgruppen übereinstimmten, wurden im Transplantationsversuch verwendet. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des Instituts für Chirurgische Forschung, Marchioninistr. 27, 81377 München in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Sie erhielten eine Ferkeldiät und Wasser ad libitum. Am Vorabend der Operation wurden die Tiere nüchtern belassen.

## 2.3 Vektoren und Histamingabe

Als Vektoren verwendeten wir im Versuch rAAV 2 in Verbindung mit den Markergenen LacZ, Luciferase und GFP. Die Vektoren wurden uns von Frau Dr. Natascha Schuhmann zur Verfügung gestellt, die dem von Frau Dr. Hidegard Büning geleiteten Labor für AAV-Vektorentwicklung der Uniklinik Köln angehört. Die im einleitenden Teil dieser Arbeit beschriebenen Studien hatten erkennen lassen, dass rAAV 2 für die Verwendung im Rahmen der beschriebenen Versuche geeignet ist. Ferner hatten nicht veröffentlichte *in vitro* Studien der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Hidegard Büning an porcinen Endothelzellkulturen ergeben, dass bei Verwendung von rAAV 2 eine hohe Transfektion von 88,4% erreicht werden konnte. Die verwendete Vektormenge betrug zwischen  $2 \times 10^{12}$  und  $2,3 \times 10^{13}$  Vektorpartikel.

Histamin fungiert als permeabilitätssteigernde Substanz und ermöglicht über eine Lockerung der Tight Junctions und Endothelbarrieren der Gefäße eine homogene Transduktion des Herzmuskels [Wang Z 2005]. Daher kann durch die Applikation von Histamin die transvasale Transduktion eines Organs begünstigt werden [Ikeda Y 2002]. Wir applizierten daher in unseren Versuchen bei einem Teil der

Versuchstiere Histamin (100 ug), welches kurz vor der regulären Vektorapplikation dem im Perfusionssystem zirkulierenden Blut zugemischt wurde.

#### **2.4 Etablierung der Perfusionsmethode**

Das erste Ziel unserer Versuche bestand darin, ein Modell zu etablieren, das die extrakorporale Perfusion eines schlagenden Herzens unter physiologischen Bedingungen ermöglicht. Aufgrund der Ergebnisse zahlreicher Studien, welche im Diskussionsteil dieser Arbeit dargestellt werden, betrachteten wir das Aufrechterhalten physiologischer Bedingungen im Versuch als ideale Voraussetzung für einen effizienten Gentransfer. Daher sollte das Perfusionssystem die folgenden Kriterien erfüllen:

- Normoxämie
- Normokapnie
- Normothermie
- Normotonie
- Physiologische Herzfrequenz
- Anschluss an das Perfusionssystem ohne vorhergehenden kardioplegischen Herzstillstand

Eine weitere Anforderung an das System bestand darin, eine Applikation der verwendeten rAAV 2 in einer möglichst hohen Dosierung zu ermöglichen. Zur Erreichung dieses Ziels wurde zum einen eine hohe Konzentration des Vektors im zirkulierenden Blutvolumen angestrebt. Ferner sollte eine maximale Kontaktzeit des Vektors mit dem Gewebe ermöglicht werden. Ferner sollte eine selektive Transduktion des Herzmuskels erreicht werden.

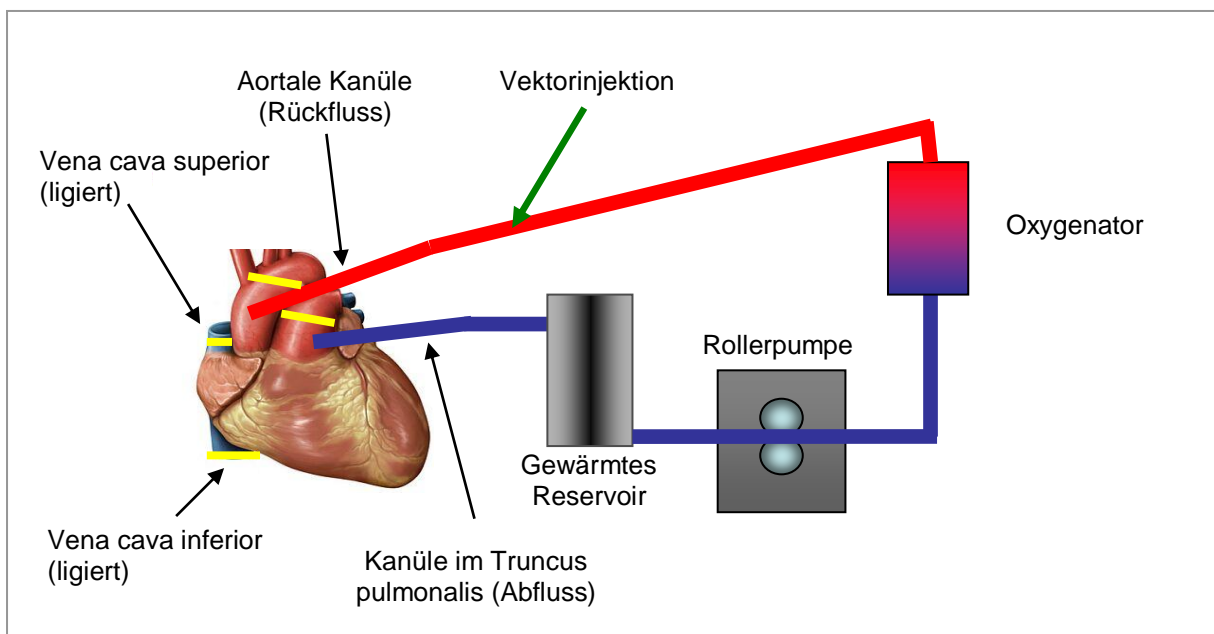
Das System musste zur Erreichung dieser Zielsetzung die folgenden Bedingungen schaffen:

- lange Applikations- und Kontaktzeit der Vektoren durch rezirkulierende Applikation
- geringes Blutvolumen im Kreislauf
- völlige Isolation des Transplantats vom Kreislauf des Spenders

Um diese Bedingungen zu schaffen, muß das Spenderherz *in situ*, schlagend an das Perfusionssystem angeschlossen werden. Erst nach Anschluss an das Perfusionssystem, Isolation vom Spenderkreislauf und Stabilisierung der Hämodynamik unter den neuen Zirkulationsbedingungen, erfolgte die Virusapplikation.

Die von uns hierfür entwickelte Perfusionsmethode lehnt sich in seinen Grundzügen an ein erstmals 1885 von Oskar Langendorff beschriebene System an [NGFN 2008, Drein S 2007]. Langendorff entwickelte ein Verfahren, welches das Herz eines Frosches retrograd über die Aorta perfundiert, mit einer Nährlösung versorgt und es damit - vom Körper des Spenders völlig isoliert – über einen längeren Zeitraum schlagen läßt. Die fortbestehende physiologische Herzfunktion wird dabei durch die andauernde Perfusion des Herzmuskels über die Koronararterien ermöglicht.

Die folgende Darstellung stellt den Aufbau unserer modifizierten *in situ* - Langendorff - Perfusionsmethode schematisch dar.



**Abbildung 1:** Aufbau der *in situ* Langendorff - Perfusionsmethode

Das Perfusionssystem setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen, welche durch Silikonschläuche miteinander verbunden sind: ein Reservoir (Edelstahl, Eigenbau, Durchmesser 7cm, Höhe 14 cm), welches über ein Zwei-Kammer System

verfügt. Durch eine Kammer wird warmes Wasser gespült. Hierdurch wird die, durch eine Metallwand getrennte zweite, nach oben geöffnete Kammer erwärmt.

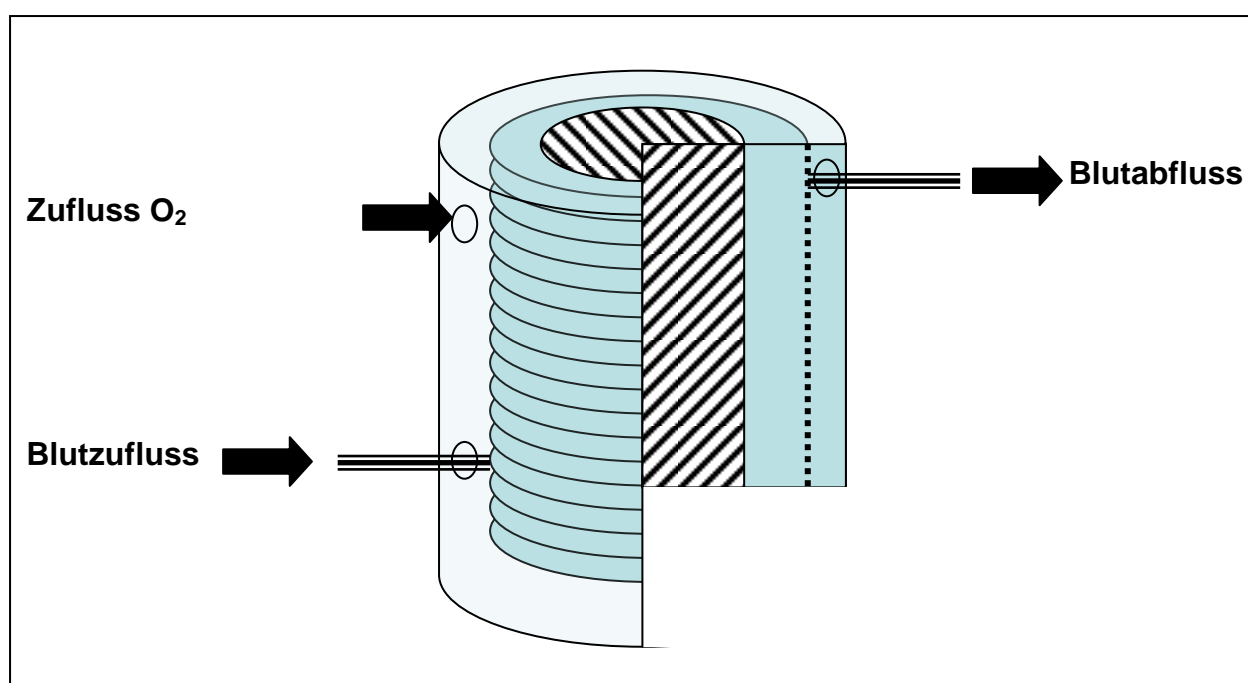
In diese innere Kammer wird, das über die Truncus pulmonalis-Kanüle abfließende Blut geleitet. Durch die Wärmung des Reservoirs kann die Bluttemperatur bei konstant 38,5°C (physiologische Körpertemperatur des Schweins) gehalten werden. Die Applikation des Vektors erfolgt über eine Injektion in den *in-flow*-Schenkel. Der kontinuierliche Blutfluss im System wird über eine Rollerpumpe aufrechterhalten und kann über Modifikation der Pumpeneinstellung reguliert werden. Als Ziel des koronararteriellen Drucks, der im Folgenden als MAP bezeichnet wird, werden Drücke von 60-80 mmHg an der aortalen Kanüle gewählt.

Um eine Koagulation des Blutes auszuschließen, wird bereits vor Anschluss an das Perfusionssystem Argatroban i.v. dem Schwein zugeführt. Auch nach Isolation des Herzens am Perfusionssystem werden wiederholte Gaben in das zirkulierende Blut durchgeführt.

Um dem Blut Sauerstoff und Kohlendioxyd in physiologischer Konzentration zuführen zu können, wird ein Kinder - Oxygenator im System eingesetzt:

Im Rahmen der Vorversuche haben wir zuerst die Eignung eines selbst entwickelten Oxygenatorelements getestet:

Das Blut wird nach Passieren der Rollerpumpe durch das eigens hierfür entwickelte System geleitet. Der Versuchsaufbau besteht aus einem porösen Silikonschlauch, der in zahlreichen Windungen um einen Kern gewickelt wird. Der umwickelte Kern wird nun mit einer luftdichten Glasummantelung versehen. In diese Ummantelung wird Sauerstoff eingeleitet. Nach dem Prinzip der Diffusion wird nun das durch den porösen Schlauch geleitete Blut mit Sauerstoff angereichert.



**Abbildung 2:** Schematischer Aufbau des Oxygenator-Eigenbaus nach Thein (2001)

Das Modell ermöglichte es uns im Rahmen der Vorversuche jedoch nicht, nach der Isolation eine ausreichende Sauerstoffsättigung im System aufrecht zu erhalten. Daher wurde der eigenentwickelte Oxygenator durch einen herkömmlichen Kinderoxygenator (D902, Lilliput2, Cobe Cardio-vascular Inc) ersetzt.

Reservoir, Rollerpumpe und Oxygenator wurden untereinander durch Schlauchverlängerungen verbunden. Die im Aufbau des Perfusionssystems verwendeten Komponenten wurden zuvor per Gassterilisation sterilisiert. Der Aufbau des Systems erfolgte ebenfalls unter streng sterilen Bedingungen. Mit dem Herzen wurde das System über Katheter in der Aorta und im Truncus pulmonalis verbunden (s. Abb.1).

Durch die *in situ* - Langendorff - Perfusionsmethode haben wir ein System entwickelt, dass eine Stabilität von Temperatur, Sauerstoffsättigung, Säure-Basen-Haushalt, Blutdruck, Herzfrequenz und -rhythmus im physiologischen Bereich sicherstellt.



**Abbildung 3:** *In situ* - Langendorff - Perfusionsmethode im Versuch

Das Erreichen einer maximalen Vektorkonzentration wurde neben der Applikation von hohen Vektordosen zwischen  $2 \times 10^{12}$  und  $2,3 \times 10^{13}$  Partikeln durch das geschlossene System des Perfusionssystems, das geringe Blutvolumen von ca. 500 ml, die rezirkulierende Perfusion des Transplantat und den ausgedehnten Vektorperfusionszeitraum unterstützt.

Somit konnte durch die *in situ* - Langendorff - Perfusionsmethode eine hochdosierte Vektorapplikation unter optimalen physiologischen Bedingungen erfolgen.

## **2.5 Durchführung der Transduktionsversuche**

Es wurden heterotope abdominale Herztransplantationen durchgeführt:

Die Spenderherzen wurden im Thorax des Spendertiers schlagend an ein Perfusionssystem angeschlossen. Dieses erhielt über einen Zeitraum von 50 bis 72 Minuten Bluttemperatur, Blutfluss und -druck, Sauerstoffsättigung und Herzrhythmus trotz vollständiger Isolation vom Kreislauf des Spenders aufrecht. Während der Perfusionphase erfolgte die Injektion der AAV-Vektoren über den rückführenden Schenkel des Systems. Im Anschluß an die Perfusionsphase wurde der kardioplegische Herzstillstand eingeleitet, das Organ entnommen und heterotop in ein Spendertier abdominal transplantiert.

### **2.5.1 Narkose**

Die Narkoseeinleitung der Versuchstiere wurde im Tierstall durchgeführt und das prämedizierte Tier in den OP transportiert. Dieses Vorgehen ermöglicht, den Stress für die Tiere zu minimieren.

Die Induktion des Spendertieres im Tierstall bestand aus Ketamin (10mg/kg KG), Azaperon (10 mg/kg KG), Midazolam (5-10 mg i.m.) und 0,5 mg Atropin intramuskulär. Im OP wurde über eine Ohrvene ein Zugang zur intravenösen Applikation von Medikamenten gelegt. Die Relaxion des Spendertieres erfolgte mit Pancuronium-bromid (0,1 mg/kg KG) intravenös. Anschließend wurde des Tier unter Zuhilfenahme eines orotrachealen Tubus (Durchmesser 5,0 mm, Hi-Lo Lanz, Mallinkrod Medical) intubiert. Nach auskultatorischer Kontrolle der korrekten Lage, wurde das Tier kontrolliert maschinell beatmet (Beatmungsgerät Servo 900, Siemens). Die Narkose wurde durch kontinuierliche Applikation von Propofol (80 mg/h) über den venösen Zugang aufrechterhalten. Die Analgesie mit Fentanyl erfolgte über Bolusgaben (0,1 mg nach Intubation, weitere 0,3 mg vor der Thorakotomie, bei Bedarf weitere Gaben).

Das Empfängertier wurde auf gleiche Weise wie der Spender in Narkose versetzt. Zusätzlich zu der oben beschriebenen Propofolnarkose erhielten die Tiere Isofluran p.inh. (zwischen 1,5% und 2% minimalen alveolären Konzentrationen), um nach erfolgtem Eingriff ein rasches Erwachen der Tiere zu ermöglichen.



### **2.5.2 Monitoring**

Die Herzfunktionen von Spender- und Empfängertier wurden durch Anschluss an ein 3 – Kanal EKG überwacht. Ein Pulsoxymeter am Ohr des Tieres bestimmte fortlaufend die Sauerstoffsättigung. Ein in der Arteria carotis externa eingebrachten Katheter ermöglichte eine kontinuierliche invasive arterielle Blutdruckmessung. Darüber hinaus wurden auf diesem Weg arterielle Proben zur Blutgasanalyse abgenommen. Wir bestimmten dabei den pH-Wert des Blutes, Sauerstoff und CO<sub>2</sub> Sättigung, Hämoglobin, Hämatokrit, Bicarbonat, Lactat und Base Excess. Über eine Sonde wurde die rektale Temperatur erfasst.

### **2.5.3 Operationstechnik**

#### **Vorbereitung des Spendertieres**

Nach Anästhesie des Spendertieres und Lagerung in Rückenlage auf einer Wärmematte wurden die Extremitäten des Tieres mit Mullbinden am OP Tisch fixiert. Am Rücken des Schweins wurde eine Erdungselektrode für den Kauter befestigt. Zur Erhaltung der Körpertemperatur wurden die Versuchstiere während der Operation auf eine Wärmematte gelagert und bei Bedarf zusätzlich mit einer Infrarotlampe bestrahlt. Ferner wurden bei Empfängertier intraoperativ gewärmte Bauchtücher zum Halten des Darms verwendet.

Nun wurde der Thorax und Halsbereich des Schweins rasiert und abgewaschen. Im Anschluss wurden die EKG-Elektroden befestigt und mit dem EKG - Gerät verbunden. Der Hals und das thorakale Operationsgebiet wurden mit Codan desinfiziert und steril abgedeckt.

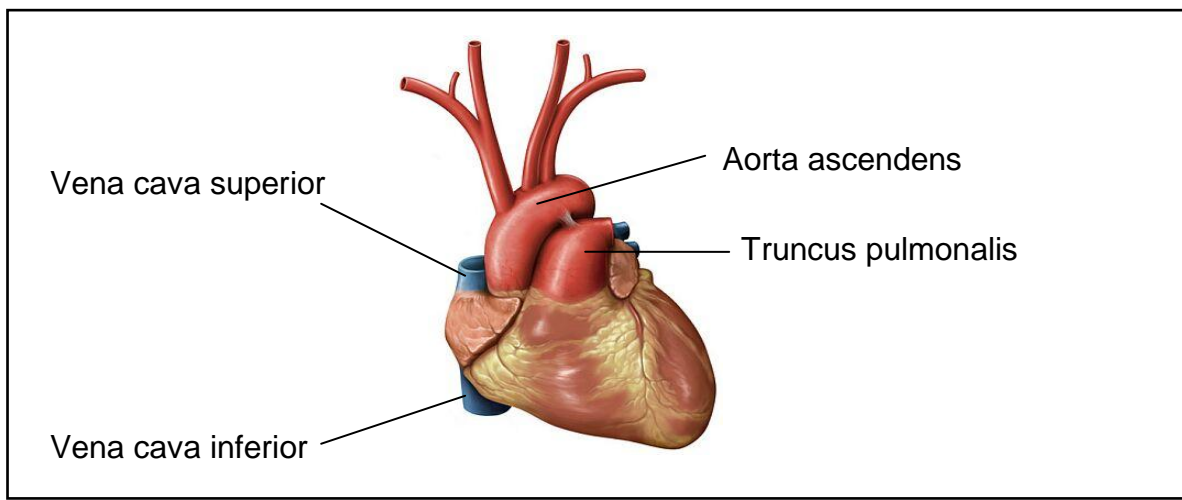
Danach erfolgte die Präparation der Arteria carotis externa über einen Hautschnitt am ventralen Rand des Musculus sternocleidomastoideus. Nach Anschlingen wurde ein arterieller Schleuse (6 French, Arrow) eingeführt, über die invasiv der Blutdruck gemessen und die Abnahme des arteriellen Blutgases durchgeführt wurden.

In die Vena jugularis interna legten wir einen zentralen Venenkatheter. Über diesen führten wir eine Antikoagulation mit Argatroban (0,4 mg/kg KG) durch.

#### **Präparation des Herzens**

Zu Beginn der Operation erfolgte eine mediane Sternotomie. Der Thorax des Spenders wurde mit Hilfe eines Rippenspreizers aufgedehnt und offen gehalten. Um das Perfusionssystem an das schlagende Herz anzuschließen, wurden die Aorta

ascendens und der Truncus pulmonalis präpariert und voneinander getrennt, so dass ein selektives Kanülieren und Abklemmen der Gefäße ermöglicht wurde. Für den späteren Anschluß der Katheter wurden Tabaksbeutelnähte (Prolene 5-0) im proximalen Bereich der Aorta ascendens und des Truncus pulmonalis vorgelegt und mit Tourniquets versehen. Im Anschluß daran wurden die Venae cavae superior und inferior intraperikardial unterminiert und mit Ligaturen (Ethibond 2-0) zum späteren Verschluß umschlungen.



**Abbildung 4:** Präparierte Gefäße am Herz

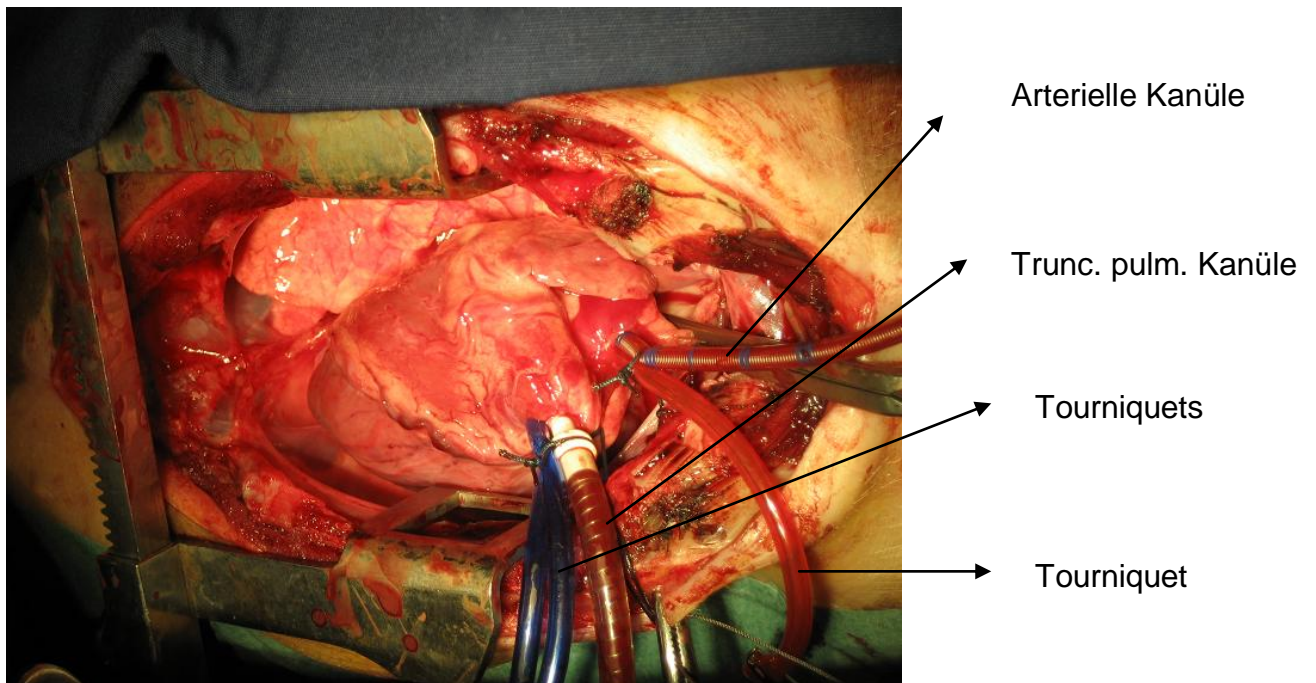
Primär erfolgte nun die Kanülierung des Truncus pulmonalis, die mit einem Katheter (10 French, Stöckert) durchgeführt wurde. Die vorgelegte Tabaksbeutelnaht und ein Tourniquet dienten zur Fixierung. Die Kanüle wurde bereits zuvor am distalen Ende geklemmt, um einen Blutverlust zu verhindern. Nach gleichem Verfahren erfolgte eine Kanülierung der Aorta ascendens.

### **Anschluss des Spenderherzens an das Perfusionssystem**

Im nächsten Schritt wurde das schlagende Spenderherz im Thorax des Spenders an das Perfusionssystem (s. Abb. 1) angeschlossen:

Bereits vor der Katheterkonnektion wurde das Perfusionssystem mit Flüssigkeit (HAES) gefüllt und gespült. Nun wurde die in den Truncus pulmonalis eingebrachte Kanüle mit einem Schlauchsystem verlängert, welches das Blut in das Reservoir leitete. Es wurde die Klemme der Truncus pulmonalis Kanüle entfernt, so dass sich das Reservoir langsam füllen konnte. Zusätzlich wurde der Truncus pulmonalis distal geklemmt. Nach ausreichender Füllung des Systems (circa 500 ml Blut) wurde der

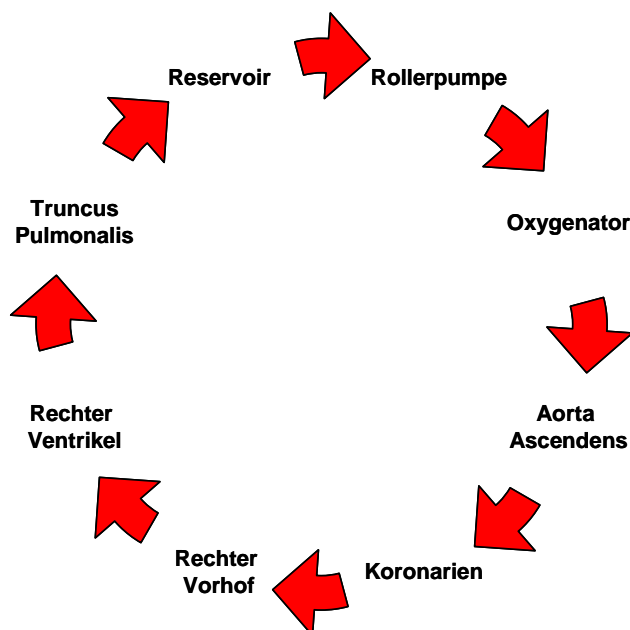
rückführende Schenkel des Systems luft- und blasenfrei mit der aortalen Kanüle verbunden, die Klemme der Kanüle entfernt und die Rollerpumpe eingeschaltet. Rasch wurde die distale Aorta ascendens geklemmt und die Venae cavae ligiert. Somit war das Herz komplett vom Kreislauf des Schweines isoliert, ohne eine Kardioplegie vornehmen zu müssen.



**Abbildung 5:** Spenderherz angeschlossen an das Perfusionssystem

## Blutfluss nach Anschluß an das Perfusionssystem

Der Blutfluss nach Anschluss an das Perfusionssystem gestaltet sich wie folgt:



Der Anschluß des Herzens an das Perfusionssystem erfolgte ohne jegliche mechanische Beeinträchtigung des Organs. Es schlug unter physiologischen Bedingungen im Sinusrhythmus weiter. Hierbei wurde über die Regulierung der Temperatur des Reservoirs eine Normothermie sichergestellt. Die Rollerpumpe verhinderte eine Stase des Blutflusses und der Oxygenator ermöglichte eine ausreichende Sauerstoffsättigung.

## Vektorapplikation

Neben der Etablierung einer geeigneten Perfusionsmethododes war es das zweite Ziel unserer Versuche, die Applikation eines Virusvektors durchzuführen und die dadurch erzielte Transgenexpression zu analysieren.

Nach Stabilisierung der Temperatur, Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und des EKGs wurde hierfür eine hohe Dosis des rAAV 2 Vektors (Markergene: GFP, LacZ, Luciferase) appliziert, die über den aortalen inflow Schenkel in das zirkulierende Blut injiziert wurde. Die Konzentration der applizierten Vektoren lagen zwischen  $2 \times 10^{12}$  und  $2,3 \times 10^{13}$  Partikeln. Aufgrund des geringen zirkulierenden Blutvolumens und der direkten Injektion in die zuführende Katheterlinie wurde insbesondere bei der ersten Passage eine hohe Vektorkonzentration erreicht. Der Vektoraufnahme sollte durch die Rezirkulation des Blutvolumens und den langen Applikationszeitraum von dreißig

Minuten unter Einhaltung physiologischer Bedingungen im System weiter verstärkt werden.

### **Kardioplegie**

Nach insgesamt 50 Minuten Perfusion – davon 30 Minuten Virusperfusion - wurde die Versorgung über das System beendet und eine Kardioplegielösung (Custodiol, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, 30 ml/kg KG) eingeleitet. Um ein Überdehnen des rechten Ventrikels zu verhindern, wurde der im Truncus pulmonalis befindliche Katheter entfernt, welches ein Entweichen der Lösung ermöglichte. Bereits nach kurzer Zeit (weniger als 30 Sekunden) konnte so der kardioplegische Herzstillstand erreicht werden.

### **Explantation**

Die Exzision des Herzens erfolgte als kompletter Herzlungenblock. Dazu wurden die Venae cavae, die Aorta ascendens und der Truncus pulmonalis durchtrennt. *Ex vivo* wurden unter ständiger Kühlung die beiden Venae cavae mit Prolene 5-0 übernäht, die Lungenvenen ligiert und die Länge von Aorta ascendens und Truncus pulmonalis entsprechend den zur Implantation in den Empfänger erforderlichen Größenverhältnissen angepasst. Das Organ wurde steril verpackt und in kardioplegischer Lösung in einer Kühlbox auf Eis gelagert. Die Zeit zwischen initialer Kardioplegiegabe und der Reperfusion im Empfänger wurde als Dauer der Ischämie dokumentiert.

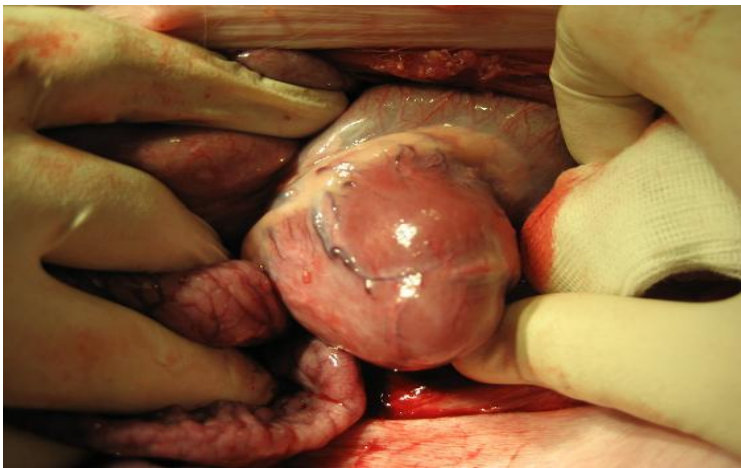
### **Implantation**

Das Spenderherz wurde nun in das Abdomen des Empfängers, welcher parallel zu der Perfusion des Spenderherzens vorbereitet wurde, heterotop transplantiert.

Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Schritt das Abdomen des Empfängers entlang der Linea alba von der oberen Symphyse bis zum Epigastrium eröffnet. Die Gedärme wurden mit Hilfe von gewärmten feuchten Bauchtüchern aus dem Operationsbereich verdrängt, um einen Zugang zum infrarenalen Gefäßstrang zu erhalten. Ferner dienten die warmen Bauchtücher wie auch die eingesetzte Wärmelampe der Stabilisierung der Körpertemperatur des Empfängertieres während der Operation. Nach Aufsuchen und Präparation der Aorta abdominalis und der Vena

cava inferior unterhalb des Abganges der Nierengefäße wurden diese vorsichtig von den parallel laufenden Lymphgefäßen getrennt.

Für die Anastomose zwischen Truncus pulmonalis des Spenders und der Vena cava inferior des Empfängers, die zuerst durchgeführt wurde, wurde mit Hilfe einer Satinsky-Gefäßklemme die Vena cava inferior ausgeklemmt. Mit einem 11-er Skalpell (Feather Safety Razor CO LTD) erfolgte eine circa 2 cm lange Inzision des Gefäßes und die Anastomisierung mit Hilfe eines 6-0 ACC Prolene-Fadens (Ethicon) in fortlaufender Nahttechnik. Nach dem gleichen Prinzip wurden in einem zweiten Schritt die Aorta abdominalis des Empfängers und die Aorta ascendens des Spenders anastomosiert.



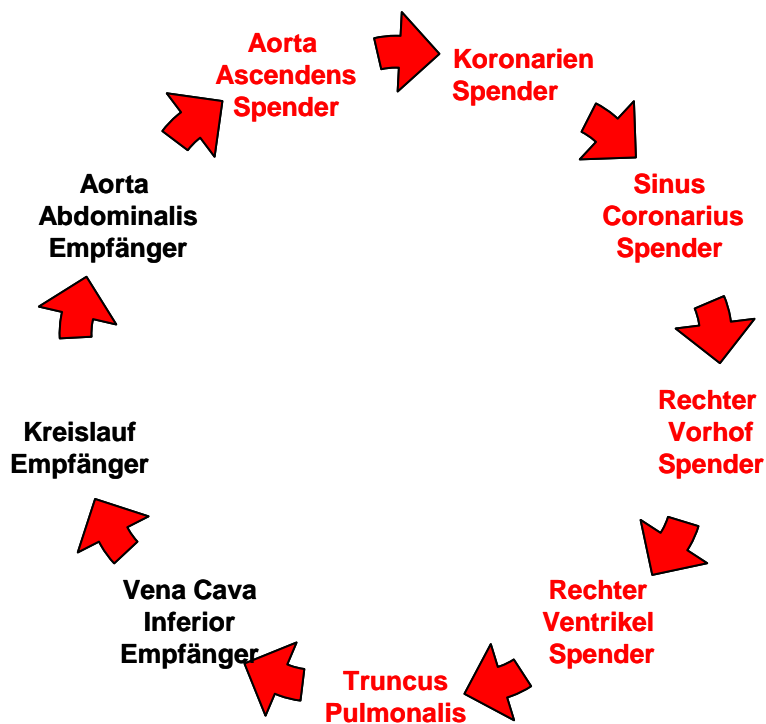
**Abbildung 6:** Implantiertes, schlagendes Herz in der Reperfusionphase

## Reperfusion

Nach erfolgreich abgeschlossener Anastomisierung wurden die Gefäßklemmen gelöst, um das Herz zu reperfundieren.

Bei Kammerflimmern des Herzens wurde eine interne Defibrillation (10 Joule) durchgeführt.

Die Richtung des Blutflusses durch das transplantierte Herz hat sich nach der Implantation in den Empfänger wie folgt geändert:



Nach Implantation und dem Erreichen des Sinusrhythmus erfolgte der Wundverschluss. Die Bauchwand wurde dazu zweischichtig verschlossen. Für den Hautverschluß wurden Donati-Rückstichnähte mit Prolene 1-0 verwendet. Abschließend wurde ein Sprühpflaster auf die Wunde aufgetragen und diese mit einem großflächigen Pflaster verschlossen.

#### **2.5.4 Postoperativer Verlauf**

##### **Monitoring**

Bis das Empfängertier aus der Narkose erwachte, verblieb es unter Kontrolle der Vitalparameter im Operationssaal. Bei suffizienter Spontanatmung wurde es extubiert und in eine abgetrennte Box im Tierstall verbracht. Hier wurde der Zustand des Tieres engmaschig kontrolliert und die Frequenz des Transplantats palpiert. Bei Auftreten von Schmerzzeichen (z.B. Zittern, gekrümmtem Rücken, reduzierter Futter- und Wasseraufnahme, Abgeschlagenheit oder fehlender Neugier) wurde zur Analgesie an den ersten beiden postoperativen Tagen Buprenorphin (0,05 - 0,1 mg/kg KG) intramuskulär verabreicht. Bei Auftreten von Wundinfektionen erfolgte eine lokale Antibiotikatherapie und – wenn notwendig - operatives Wunddebridement bei Persistenz.

Die Empfängertiere verblieben für die Dauer von 21 Tagen im Tierstall des ICF. Im Rahmen der täglichen Immunsuppression wurde der Allgemeinzustand der Tiere beurteilt. Eine Kontrolle der Kontraktion des Transplantats erfolgte über abdominale Palpation.

##### **Immunsuppressiven Therapie**

Die erste Gabe der Immunsuppression wurde bereits intraoperativ durch intravenöse Injektion von Tacrolimus (0,3 mg/kg KG) begonnen. Zum selben Zeitpunkt wurde auch Cortison verabreicht (Urbason 1mg/kg KG i.v.). Damit ein ausreichender Spiegel der Immunsuppression aufgebaut werden konnte, erhielten die Empfängertiere am Tag nach der Operation eine weitere intramuskuläre Injektion Tacrolimus (0,3 mg/kg KG). An Tag 3, 10, 17 und 21 post OP wurden Blutentnahmen durchgeführt, in deren Rahmen ein Blutbild sowie der Tacrolimusspiegel bestimmt wurden. Entsprechend dieses Spiegels wurde die weitere Immunsuppression dosiert.



### **2.5.5 Organexplantation**

#### **Beendigung der Versuche**

Die angestrebte Versuchsdauer betrug 21 Tage. Voraussetzung für das Erreichen der vollständigen Dauer waren Beschwerdefreiheit der Tiere und ein stabiler postoperativer Zustand. Voraussetzung für die Explantation und Analyse der Organe war darüber hinaus die Funktionalität des Transplantats.

Zur Organexplantation erhielt das Empfängertier eine Intubationsnarkose wie zuvor beschrieben. Analgetisch wurde das Tier mit Fentanyl behandelt. Intraoperativ wurde die Kontraktion und die Farbe des transplantierten Herzens bewertet und seine Frequenz abschließend bestimmt. Das transplantierte Herz wurde schlagend durch Durchtrennung der Anastomosen explantiert. Das Empfängertier verstarb während dieses Vorganges in tiefer Analgesie durch Ausbluten.

#### **2.5.6 Histopathologische Untersuchungen und Auswertung**

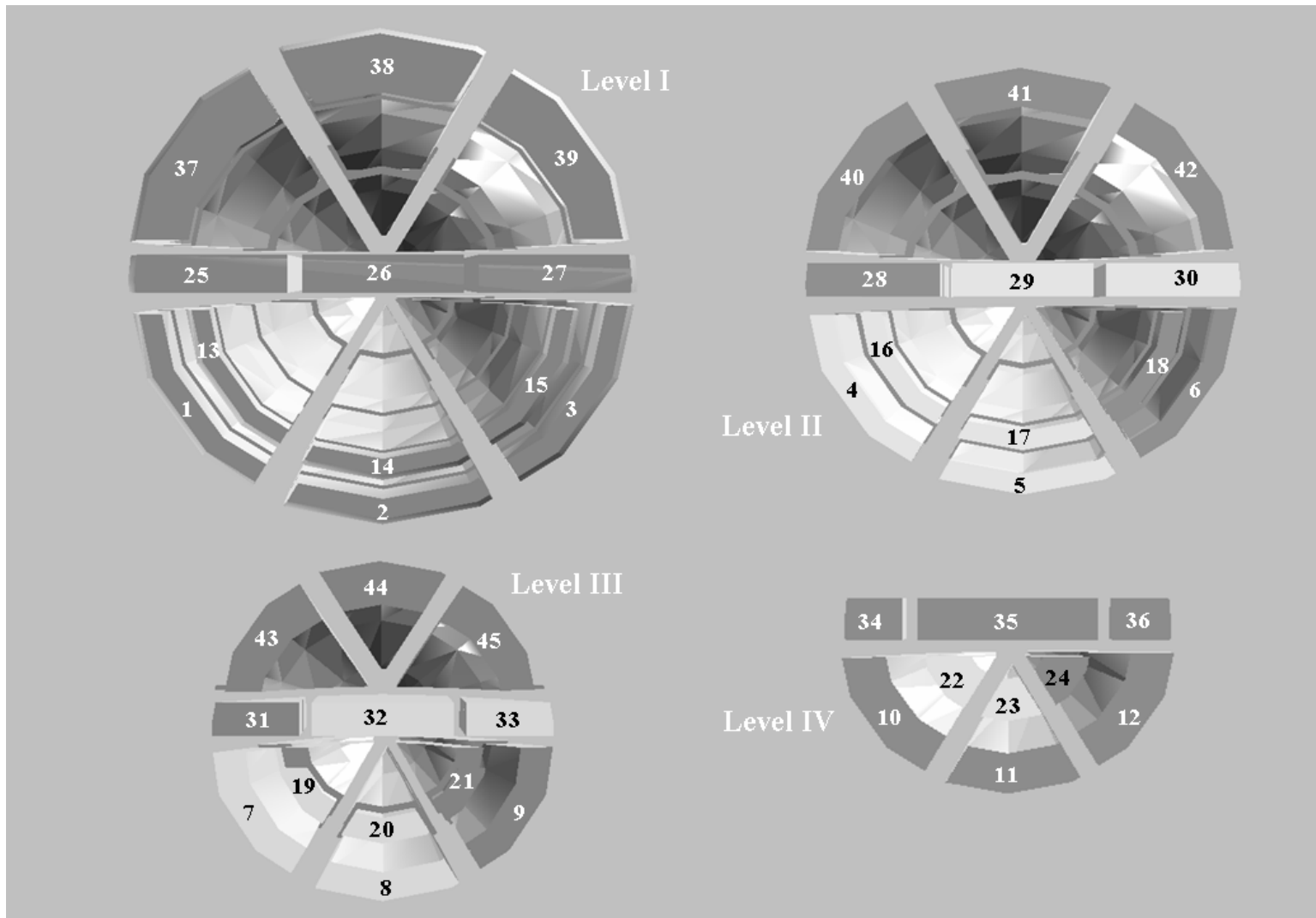
Bei der Explantation wurden außer dem Transplantat auch das Herz und Gewebeproben der Niere, Leber, Lunge und Milz entnommen.

Das transplantierte Herz wurde schematisch in 4 Ebenen mit insgesamt 45 Sektoren aufgeteilt (s. Abb. 7). Aus jedem Sektor wurde eine Gewebeprobe zur Expressionsanalyse entnommen. Der linke Ventrikel wurde dabei in zwei Schichten getrennt.

Mit Hilfe dieser Einteilung konnte die Transduktion in den verschiedenen Bereichen des Herzens berechnet und verglichen werden.

Ferner erfolgte eine Visualisierung der gemessenen Expressionswerte mit Hilfe einer 3D - Darstellung des Herzens. Die Analyse der Gewebeproben nahm die Arbeitsgruppe von Frau Dr. Hildegard Büning (Universitätsklinik Köln) vor. Neben der Real-time PCR zur Bestimmung transgener mRNA und DNA wurde die Proteinexpression mittels X-Gal Färbung für LacZ und Luciferase Assays bei Verwendung von Luciferase analysiert. Die durch die PCR ermittelten Werte glichen sie dabei gegen den Gehalt von GAPDH ab, welcher als Kontrollwert in allen Proben erhoben worden ist.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch das Programm SigmaStat 3.5. Es wurde zur vergleichenden statistischen Analyse der Ergebnisse von Versuchs- und Kontrollgruppe der student t-Test verwendet. Die Ergebnisse innerhalb der Versuchs- und Kontrollgruppe wurden mit der Varianzanalyse (One way repeated measures ANOVA on Ranks) ausgewertet. Das Signifikanzniveau der statistischen Auswertung lag bei  $p=0,05$ .



**Abbildung 7:** Dissektionsschema des Transplantats: 4 Ebenen mit 45 Sektoren

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Etablierung von Operationsmodell und -technik**

Der Versuchsablauf lässt sich in drei wesentliche Schritte unterteilen:

- Anschluss des Perfusionssystems
- Perfusion und Transduktion
- Transplantation

Da die Bereitstellung der von uns im Versuch verwendeten Ressourcen sehr kostenintensiv und zeitaufwendig war, haben wir unser Operationsverfahren ohne Applikation von Vektoren im Rahmen von vier Vorversuchen erprobt und optimiert.

#### **Anschluss an das Perfusionssystem**

Der chirurgische Anschluss des Transplantats an das Perfusionssystem erwies sich als technisch anspruchsvoll, konnte aber in allen Fällen erfolgreich durchgeführt werden.

Bei der sich anschließenden Perfusion zeigten sich folgende Befunde:

1. Bei einem Vorversuch entwickelten sich ST - Hebungen aufgrund einer deutlichen Hypoxie des Gewebes während der Perfusion. Die Hypoxie konnte im Rahmen der durchgeführten Blutgasanalysen bestätigt werden.
2. Bei einem weiteren Versuch musste das Herz am System unter Suprareningabe aufgrund von Kammerflimmern defibrilliert werden. Insbesondere die niedrigen O<sub>2</sub> Werte der Blutgasanalyse zeigten, dass das primär verwendete Oxygenatorsystem nicht geeignet war, um eine ausreichende Oxygenierung über den gewünschten Zeitraum zu ermöglichen. Daher verwendeten wir in der sich anschließenden Versuchsreihe einen herkömmlichen Kinderoxygenator (D902, Lilliput2, Cobe Cardio-vascular Inc). Durch diesen konnten wir zu jedem Zeitpunkt eine ausreichende Sauerstoffsättigung erreichen.

### **Präparation der abdominellen Gefäße**

Im Rahmen der Vorversuche haben wir festgestellt, dass beim Schwein im Abdominalbereich die Lymphgefäße in direkter Nachbarschaft zu den abdominellen Gefäßen verlaufen. Die Präparation in diesem Bereich birgt daher die große Gefahr der Verletzung dieser Strukturen.

Zwei Versuchstiere sind im Vorversuch aufgrund einer Verletzung der abdominellen Lymphgefäße verstorben. Die Perforation der Lymphgefäße führte dabei zu einem ausgeprägten Aszites, in dessen Folge sich eine Hypovolämie entwickelte und der Tod des Versuchstiers eintrat.

Durch vorsichtiges und restriktives Präparieren konnten wir anhand dieser Erkenntnisse in den folgenden Versuchen weitere Verletzungen vermeiden.

### **Transplantation**

Bei zwei Tieren war eine Verhärtung des Transplantats bei der Implantation und Reperfusion zu beobachten. Beide Tiere zeigten eine eingeschränkte Kontraktion des Transplantats und bei der Explantation nach 21 Tagen deutliche Anzeichen für Hypoxie.

Nach Beendigung der Vorversuche hatten wir ein Operationsverfahren entwickelt, mit dem wir die Gefahr der Verletzung von abdominellen Lymphgefäßen minimierten. Ferner nutzen wir für das Perfusionssystem einen herkömmlichen Kinderoxygenator (D902, Lilliput2, Cobe Cardio-vascular Inc) anstelle des primär verwendeten Schlauch-Oxygenatorsystems.

Die folgende Darstellung faßt die Ergebnisse der Vorversuche zusammen.

ERGEBNISSE

	VV 1	VV 2	VV 3	VV 4
<b>Spender</b> <b>Herzbefund prä HTX</b>	Großes Herz Normale Farbe Gute Kontraktion	Kleines Herz Gute Kontraktion	Normale Herzgröße Gute Kontraktion	Normale Herzgröße Gute Kontraktion
<b>Perfusion</b>	Erfolgreich	Erfolgreich	Geringer pO2 EKG: ST Hebungen	Kammerflimmern Defibrillation Suprareningabe
<b>Kardioplegie</b>	Erfolgreich	Herz bläht sich auf	Herz bläht sich auf	Erfolgreich
<b>Empfänger</b> <b>Präparation abdomineller Gefäße</b>	Lymphgefäß eröffnet Geringer Lymphverlust Leichte Blutung	Lymphgefäß eröffnet Hoher Lymphverlust	Erfolgreich	Erfolgreich
<b>Transplantation Implantation</b> <b>Funktionalität</b>	Erfolgreich Gute Funktion	Stone Heart RV gute Funktion LV schlechte Funktion	Stone Heart Keine Funktion	Erfolgreich Gute Funktion
<b>Verlauf postoperativ</b>	Reduziertes Allgemeinbefinden	Reduziertes Allgemeinbefinden Aszites		Reduziertes Allgemeinbefinden Abzeß Abdominalwand
<b>Herzbefund bei Explantation</b>	Makroskopisch keine Zeichen für Abstoßung Gute Kontraktion	Anastomosen blande Disseminierte ischämische Areale Hämatom der Vorderwand aufgelagert	Stone Heart	Gute Kontraktion Verwachsungen LV leicht verhärtet
<b>Überlebenszeit</b>	21 Tage	Verstirbt 2. Tag post OP	Verstirbt intraoperativ	21 Tage

**Abbildung 8:** Ergebnisse der vier Vorversuche im Überblick, rosa unterlegt sind aufgetretene Komplikationen (VV = Vorversuch)

## 3.2 Ergebnisse der Transduktion

### 3.2.1 Erhobene Parameter

#### Versuchstiere

In den Versuch wurden fünf weibliche und fünf männliche Empfängertiere eingeschlossen.

Das durchschnittliche Gewicht der Spender betrug in der

- Kontrollgruppe 13,45 kg  $\pm$  1,01
- Versuchsgruppe 11,11 kg  $\pm$  1,59

Das durchschnittliche Gewicht der Empfängertiere betrug in der

- Kontrollgruppe 15,08 kg  $\pm$  1,33
- Versuchsgruppe 20,00 kg  $\pm$  4,42

Da die etwas älteren, schwereren Tiere über ein größeres Abdomen und entsprechend größere Gefäßlumina verfügen, wählten wir aus Gründen der operativen Übersichtlichkeit bewusst diese als Empfängertiere aus.

**Die nachfolgende Übersicht faßt die Einzelwerte zusammen**, welche bei den vier worden sind. Im Folgenden sollen folgende Parameter detailliert betrachtet werden:

- Überlebenszeit
- Perfusionszeit
- Perfusionsdruck
- Pumpeneinstellung
- Herzfrequenz
- Gesamtschämiezeit
- Temperatur
- Funktionalität des Transplantats

ERGEBNISSE

	Pig5	Pig6	Pig7	Pig8	Pig9	Pig10	Pig11	Pig12	Pig13	Pig14
<b>Gruppe</b>	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	Kontrolle	Versuch	Kontrolle	Versuch
<b>Markergen</b>		LacZ			GFP			Luciferase		Luciferase
<b>Histamingabe</b>		Nein			Nein			Ja		Ja
<b>Perfusionszeit am System ( min)</b>	72	57	52	52	53	70	54	63	50	65
<b>Perfusionszeit Vektor (min)</b>		38			36			41		40
<b>Perfusionsdruck Beginn Perfusion (mmHg)</b>	60	68	75	74	74	76	66	80	47	55
<b>Perfusionsdruck Ende Perfusion (mmHg)</b>	120	105	80	75	65	100	75	73	42	88
<b>Herzfrequenz vor Perfusion (Schläge/min)</b>	144	195	142	178	160	180	160	172	166	130
<b>Herzfrequenz nach Perfusion (Schläge/min)</b>	140	75	142	178	180	147	112	162	175	130
<b>Pumpeneinstellung Beginn Perfusion (ml/min)</b>	100	104	101	116	101	104		76	60	50
<b>Pumpeneinstellung Ende Perfusion (ml/min)</b>	104	104	91	116	108	100		53	63	50
<b>Temperatur am System (°C)</b>	38,5	38,5	38,5	38,5	38,5	38,5	38,5	38,5	38,5	38,5
<b>Gesamtischämiezeit</b>	107	102	66	84	78	83	101	97	144	102
<b>Funktionalität Transplantat nach Reperfusion</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja
<b>Überlebenszeit (d)</b>	23	21	21	2	4	0	21	21	21	21
<b>Organe explantiert / analysiert</b>	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja

**Abbildung 9:** Erhobene Parameter im Versuch, rosa unterlegt sind aufgetretene Komplikationen



**Überlebenszeit und Letalität**

Von den zehn Empfängertieren erreichten sieben Tiere die in unserem Versuch angestrebte Überlebenszeit von 21 Tagen. Die Organe von acht Tieren wurden nach vorzeitiger Beendigung des Versuches explantiert und analysiert.

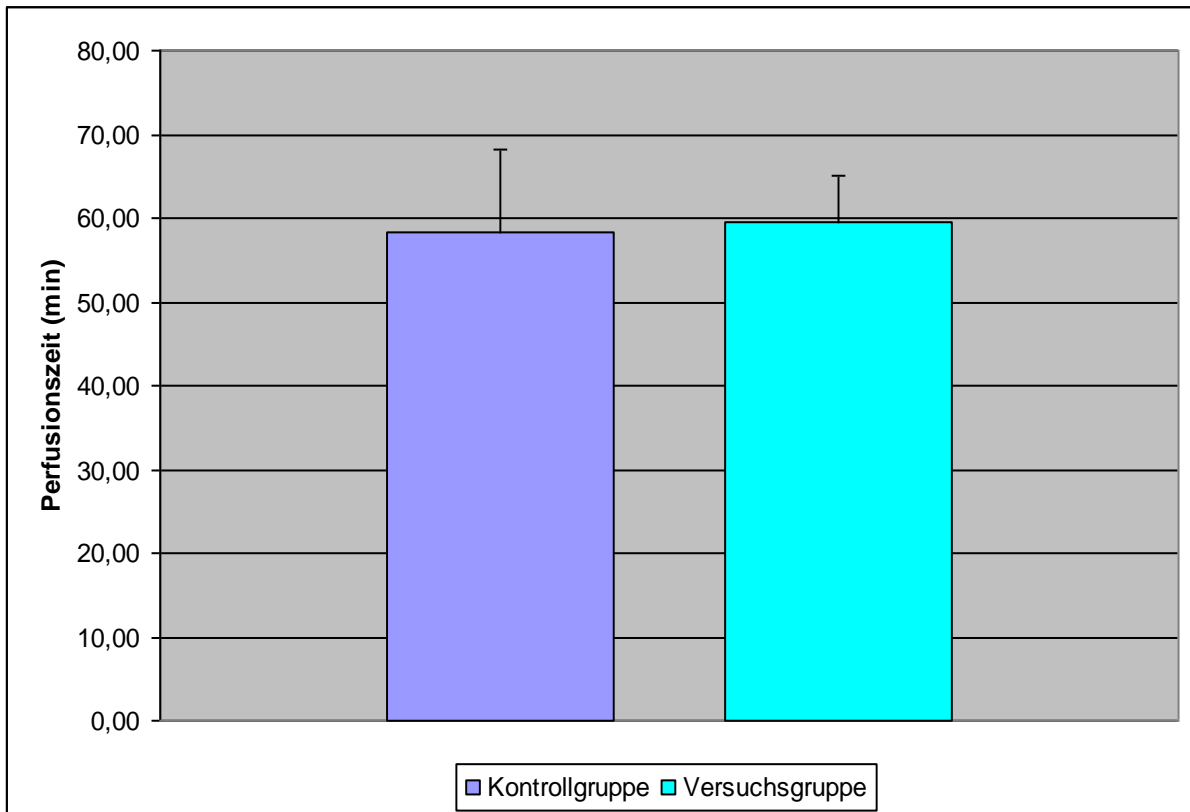
Die folgende Darstellung gibt einen Überblick über die Tiere, die eine Überlebenszeit von weniger als 21 Tagen erreicht haben:

	<b>Pig 8</b>	<b>Pig 9</b>	<b>Pig 10</b>
<b>Überlebenszeit</b>	2 Tage	4 Tage	0 Tage
<b>Todesursache</b>	Euthanasie nach Verschlechterung des Allgemeinzustandes	Tod aufgefunden mit unbekannter Todesursache	Verstirbt intraoperativ, erfolglose Reanimation
<b>Ex- / Transplantation</b>	Ja	Nein	Nein

**Abbildung 10:** Überlebenszeit und Todesursache

## Perfusionszeit

Eine Anforderung an die Perfusionsmethode bestand darin, die Herzen über einen Zeitraum von mindestens 50 Minuten unter Einhaltung der physiologischen Bedingungen zu versorgen. Fraglich ist, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Perfusionszeiten von Versuchs- und Kontrollgruppe bestand.



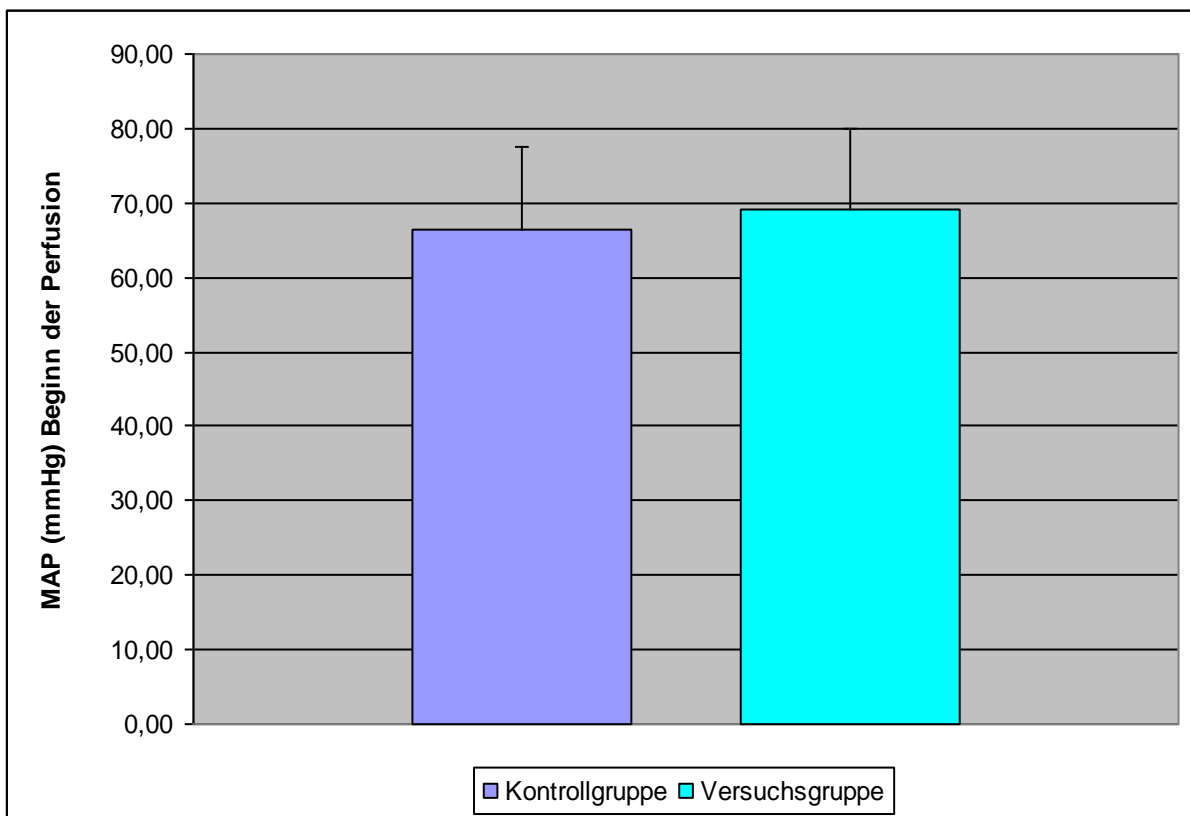
**Abbildung 11:** Mittelwert der Perfusionszeiten in Versuchs- und Kontrollgruppe unter Zuhilfenahme der *in situ* - Langendorff – Perfusionsmethode; Versuchsgruppe n=4, Kontrollgruppe n=6, student t-Test.

Die Perfusionszeiten der vier Tiere der Versuchsgruppe und der sechs Tiere der Kontrollgruppe wurden mit dem student t-Test ausgewertet. Der Mittelwert der Perfusionszeiten in der Kontrollgruppe betrug dabei 58,33 min  $\pm$  9,91. Der Mittelwert der Perfusionszeiten in der Versuchsgruppe betrug 59,50 min  $\pm$  5,51.

Statistisch unterschieden sich beide Gruppen nicht. Die Perfusionszeiten stimmten damit in Versuchs- und Kontrollgruppe überein.

### Perfusionsdruck

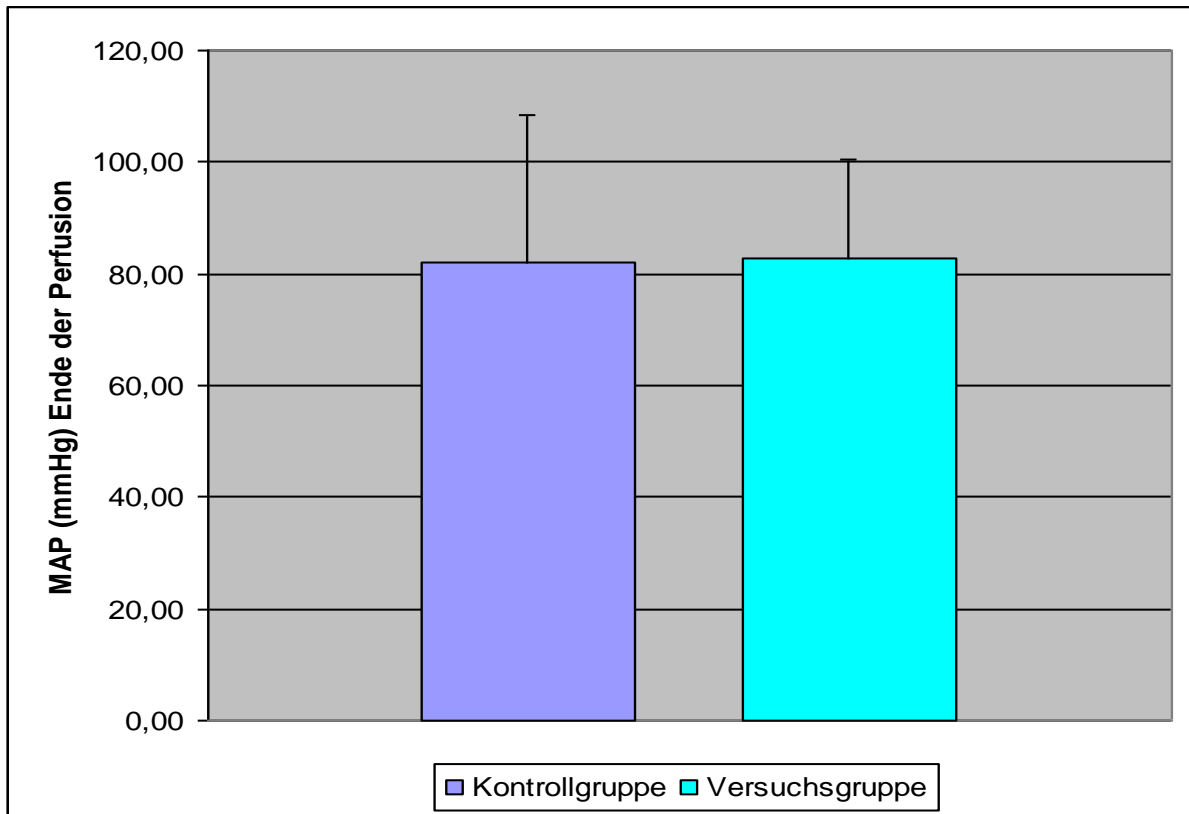
Über eine Rollerpumpe wurde im Perfusionssystem ein stabiler mittlerer Perfusionsdruck in den Koronarien im physiologischen Bereich aufgebaut. Fraglich ist, ob sich der Perfusionsdruck zu Beginn und gegen Ende der Perfusion in der Versuchs- oder in der Kontrollgruppe verändert hat. Ferner ist zu betrachten, ob sich der Perfusionsdruck zu den genannten Zeitpunkten zwischen den beiden Gruppen statistisch signifikant unterschied.



**Abbildung 12:** Mittelwert MAP zu Beginn der Perfusion in Versuchs- und Kontrollgruppe, Versuchsgruppe n=4, Kontrollgruppe n=6, student t-Test.

Der Mittelwert des MAP lag in der Kontrollgruppe zu Beginn der Perfusion bei 66,33 mmHg  $\pm$  11,33. Der Mittelwert in der Versuchsgruppe lag bei 69,25 mmHg  $\pm$  10,69.

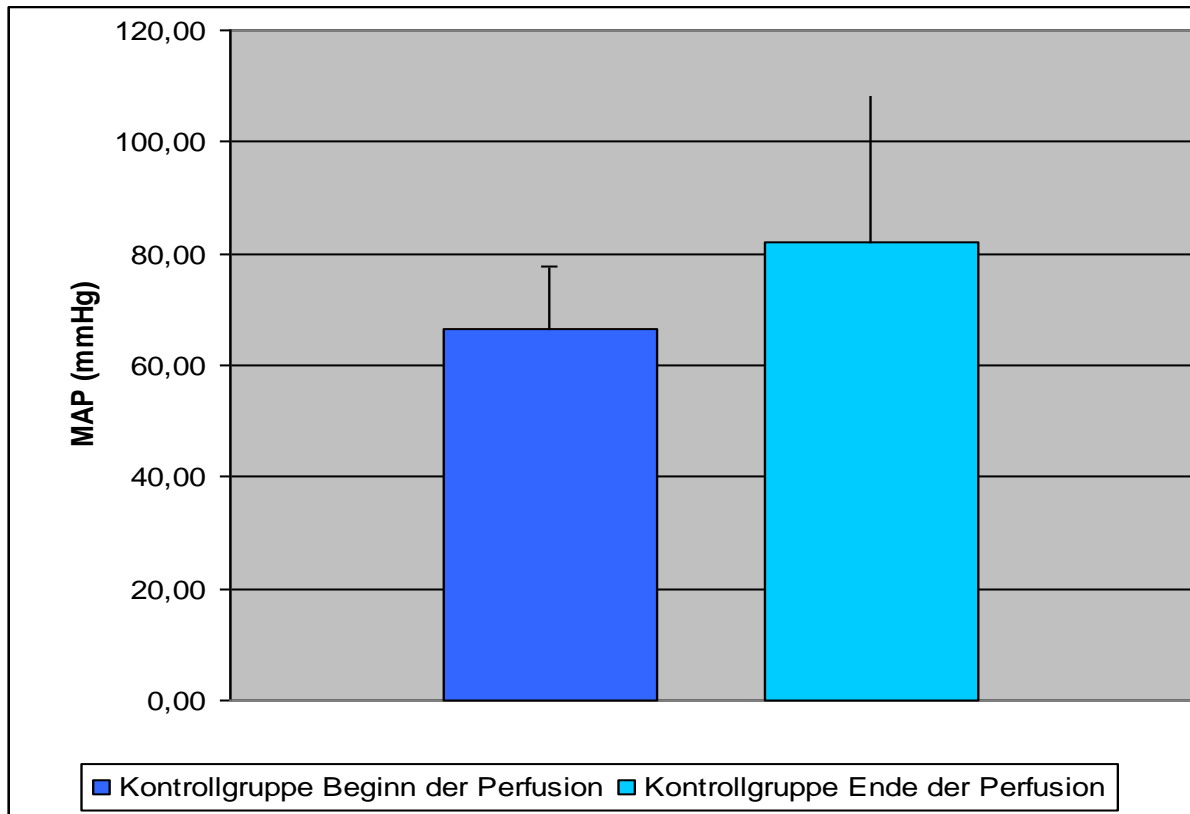
Statistisch unterschieden sich beide Gruppen nicht. Der mittlere Druck in den Koronarien zu Beginn der Perfusion stimmte damit in Versuchs- und Kontrollgruppe überein.



**Abbildung 13:** Mittelwert MAP zum Ende der Perfusion in Versuchs- und Kontrollgruppe, Versuchsgruppe n=4, Kontrollgruppe n=6, student t-Test.

Der Mittelwert des MAP lag in der Kontrollgruppe zum Ende der Perfusion bei 82,00 mmHg  $\pm$  26,34. Der Mittelwert in der Versuchsgruppe lag bei 82,75 mmHg  $\pm$  17,63.

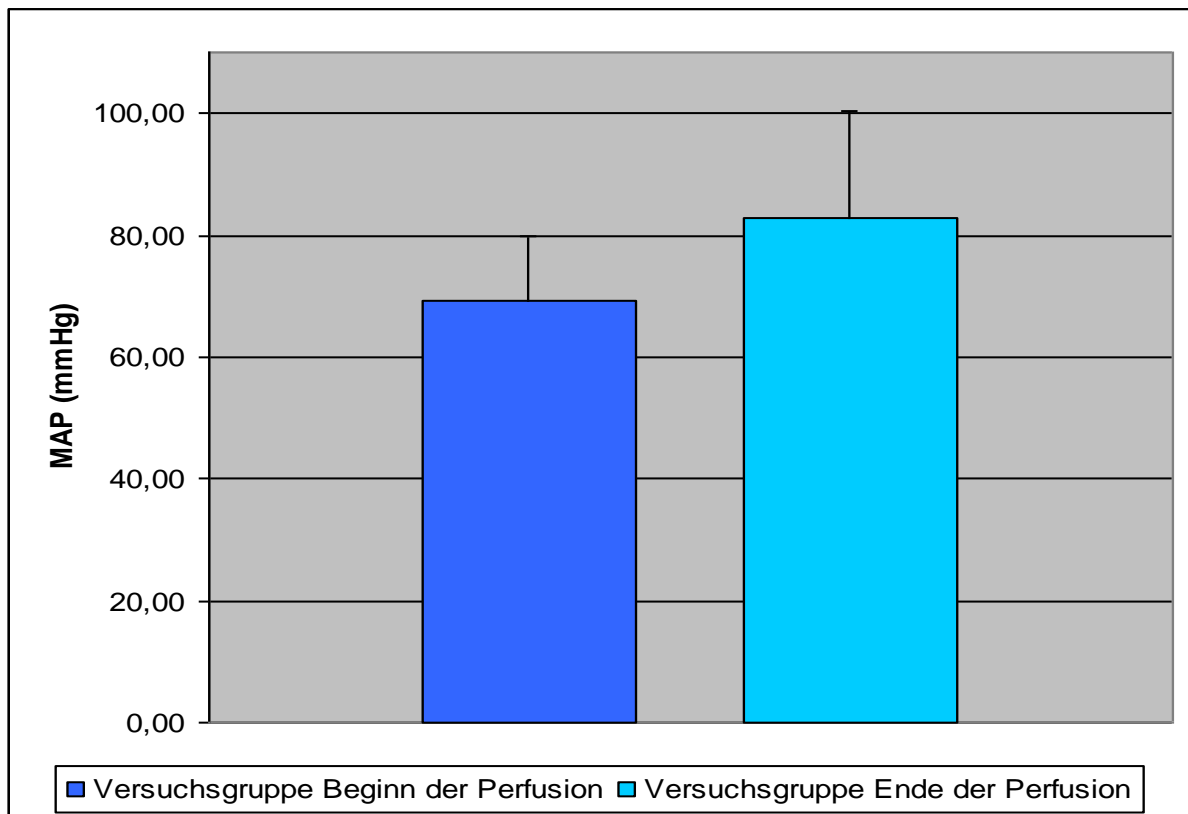
Statistisch unterschieden sich beide Gruppen nicht. Der mittlere Druck in den Koronarien zum Ende der Perfusion stimmte damit in Versuchs- und Kontrollgruppe überein.



**Abbildung 14:** Mittelwert MAP zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Kontrollgruppe, Kontrollgruppe n=6, repeated measures ANOVA.

Der Mittelwert des mittleren Koronariendrucks innerhalb der Kontrollgruppe lag zu Beginn der Perfusion bei 66,33 mmHg  $\pm$  11,33. Gegen Ende der Perfusion lag der Mittelwert des MAPs in der Kontrollgruppe bei 82,00 mmHg  $\pm$  26,34.

Statistisch unterschieden sich die Werte zu beiden Zeitpunkten nicht. Der mittlere Druck in den Koronarien innerhalb der Kontrollgruppe stimmt somit zu Beginn der Perfusion mit dem Ende der Perfusion überein.



**Abbildung 15:** Mittelwert MAP zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Versuchsgruppe, Versuchsgruppe n=4, repeated measures ANOVA.

Der Mittelwert des mittleren Koronariendrucks innerhalb der Versuchsgruppe lag zu Beginn der Perfusion bei  $69,25 \text{ mmHg} \pm 10,69$ . Gegen Ende der Perfusion lag der Mittelwert des MAPs in der Versuchsgruppe bei  $82,75 \text{ mmHg} \pm 17,63$ .

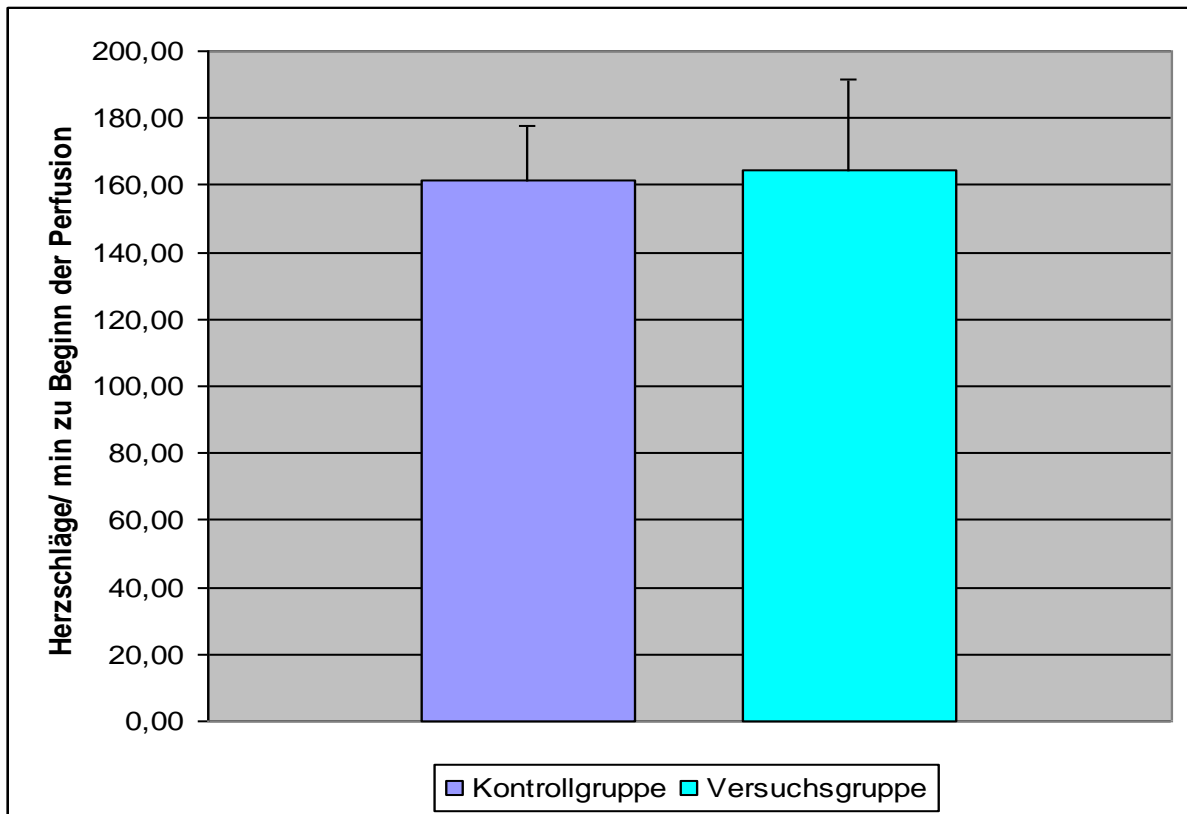
Statistisch unterschieden sich die Werte zu beiden Zeitpunkten nicht. Der mittlere Druck in den Koronarien innerhalb der Versuchsgruppe stimmt somit zu Beginn der Perfusion mit dem Ende der Perfusion überein.

### Fazit Perfusionsdruck

Wir kamen zu dem Ergebnis, dass statistisch zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe kein Unterschied im mittleren Perfusionsdrucks in den Koronarien bestand. Ferner bestand war der Perfusionsdruck in beiden Gruppen bei Beginn und gegen Ende der Perfusion gleich groß.

## Herzfrequenz

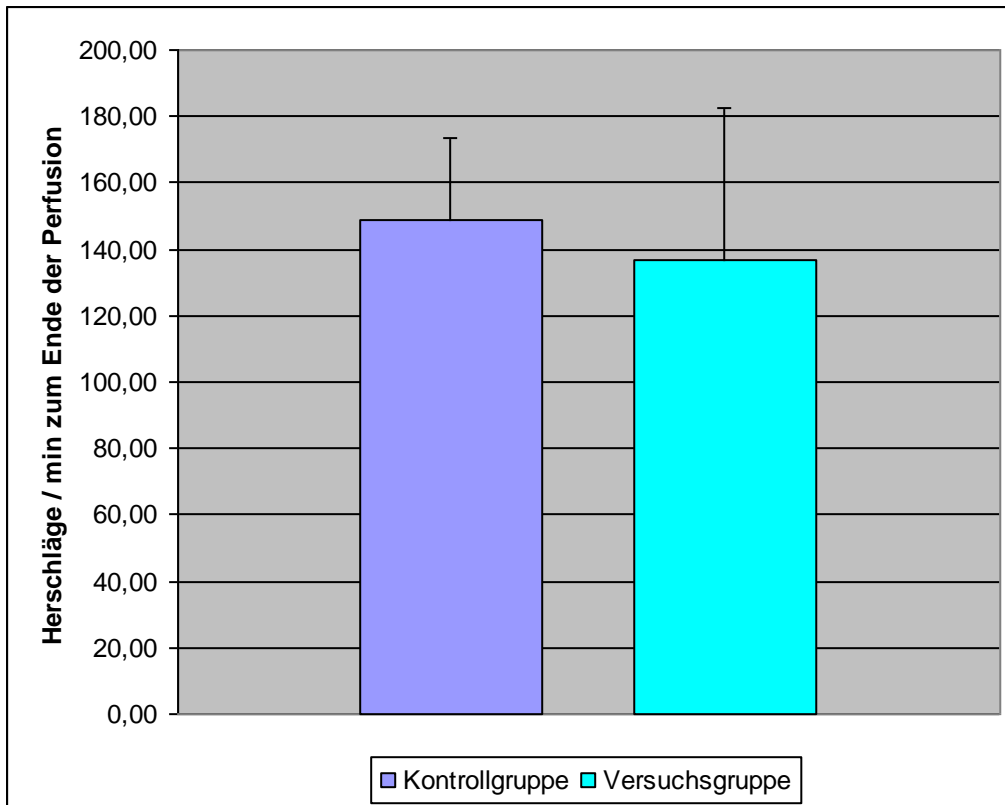
Die Herzfrequenz wurde manuell durch Auszählen der Kontraktionen des Herzmuskels ermittelt.



**Abbildung 16:** Mittelwerte der Herzfrequenz zu Beginn der Perfusion in Versuchs- und Kontrollgruppe, Versuchsgruppe n=4, Kontrollgruppe n=6, student t-Test.

Der Mittelwert der Herzfrequenz zu Beginn der Perfusion lag in der Kontrollgruppe bei 161,67 Schlägen/ Minute  $\pm$  16,27. In der Versuchsgruppe lag der Mittelwert bei 164,25 Schlägen/ Minute  $\pm$  27,06.

Statistisch unterschieden sich die Werte zwischen beiden Gruppen nicht. Der Mittelwert der Herzfrequenz in der Versuchs- und Kontrollgruppe zu Beginn der Perfusion stimmt somit überein.

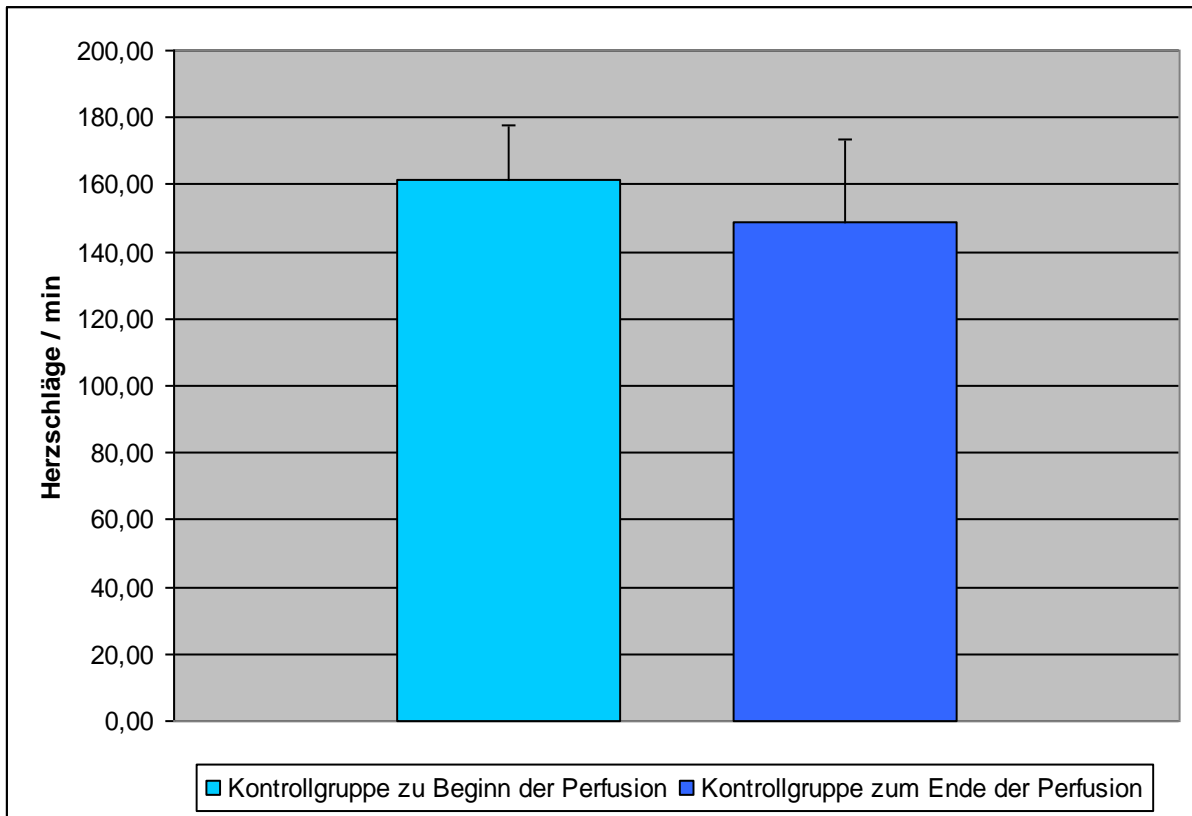


**Abbildung 17:** Mittelwerte der Herzfrequenz zum Ende der Perfusion in Versuchs- und Kontrollgruppe, Versuchsgruppe n=4, Kontrollgruppe n=6, student t-Test.

Der Mittelwert der Herzfrequenz zum Ende der Perfusion lag in der Kontrollgruppe bei 149,00 Schlägen/ Minute  $\pm$  24,58. In der Versuchsgruppe lag der Mittelwert bei 136,75 Schlägen/ Minute  $\pm$  46,07.

Statistisch unterschieden sich die Werte zwischen beiden Gruppen nicht. Der Mittelwert der Herzfrequenz in der Versuchs- und Kontrollgruppe zum Ende der Perfusion stimmt somit überein.

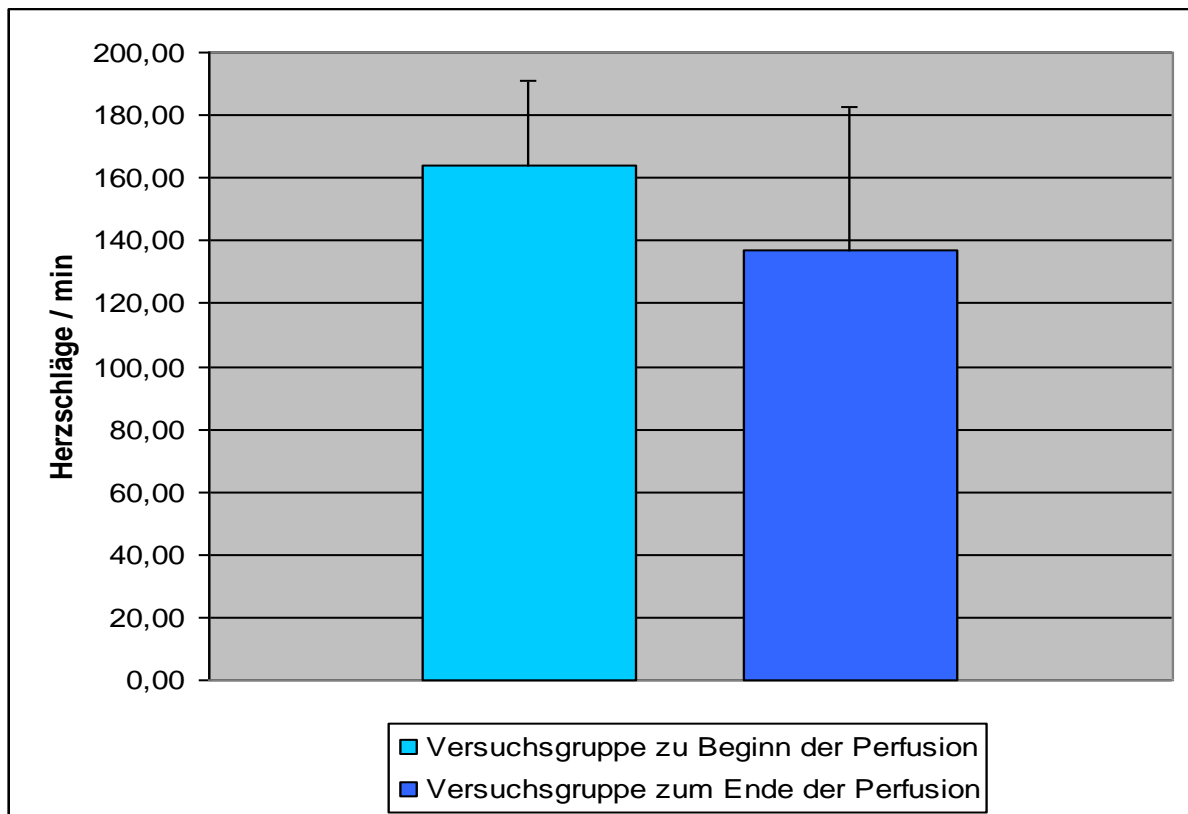




**Abbildung 18:** Mittelwert Herzfrequenz zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Kontrollgruppe, Kontrollgruppe n=6, repeated measures ANOVA.

Der Mittelwert der Herzfrequenz zu Beginn der Perfusion lag in der Kontrollgruppe bei 161,67 Schlägen/ Minute  $\pm$  16,27. Gegen Ende der Perfusion lag der Mittelwert der Herzfrequenz in der Kontrollgruppe bei 149,00 Schlägen/ Minute  $\pm$  24,58.

Statistisch unterschieden sich die Werte zu beiden Zeitpunkten nicht. Der Mittelwert der Herzfrequenz in der Kontrollgruppe stimmt also zu Beginn und zum Ende der Perfusion überein.



**Abbildung 19:** Mittelwert Herzfrequenz zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Versuchsgruppe, Versuchsgruppe n=4, repeated measures ANOVA.

Der Mittelwert der Herzfrequenz zu Beginn der Perfusion lag in der Versuchsgruppe bei 164,25 Schlägen/ Minute  $\pm$  27,06. Gegen Ende der Perfusion lag der Mittelwert der Herzfrequenz in der Versuchsgruppe bei 136,75 Schlägen/ Minute  $\pm$  46,07.

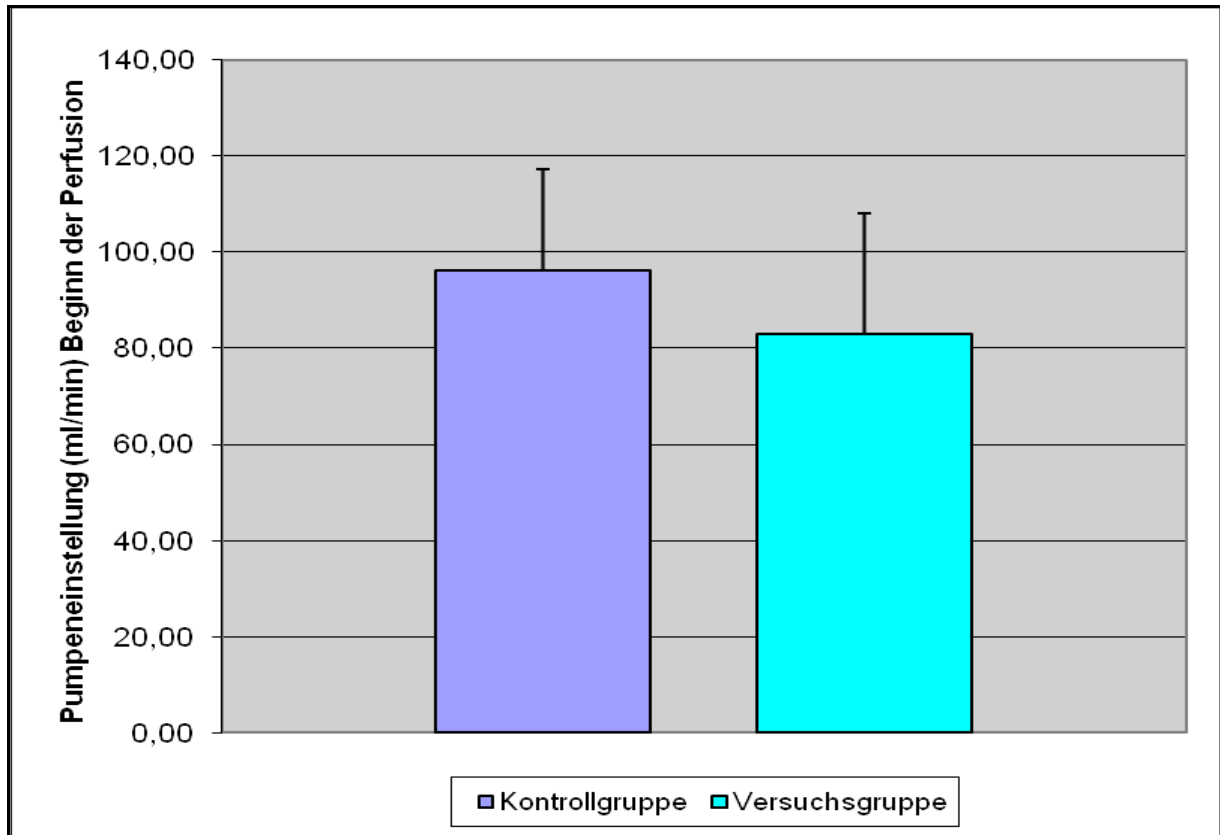
Statistisch unterschieden sich die Werte zu beiden Zeitpunkten nicht. Der Mittelwert der Herzfrequenz in der Versuchsgruppe stimmt also zu Beginn und zum Ende der Perfusion überein.

### Fazit Herzfrequenz

Wir konnten feststellen, dass die Herzfrequenz in Versuchs- und Kontrollgruppe zu beiden Meßzeitpunkten gleich groß war. Ferner wich sie innerhalb beider Gruppen zu Beginn und zum Ende der Perfusion nicht voneinander ab.

### Pumpeneinstellung

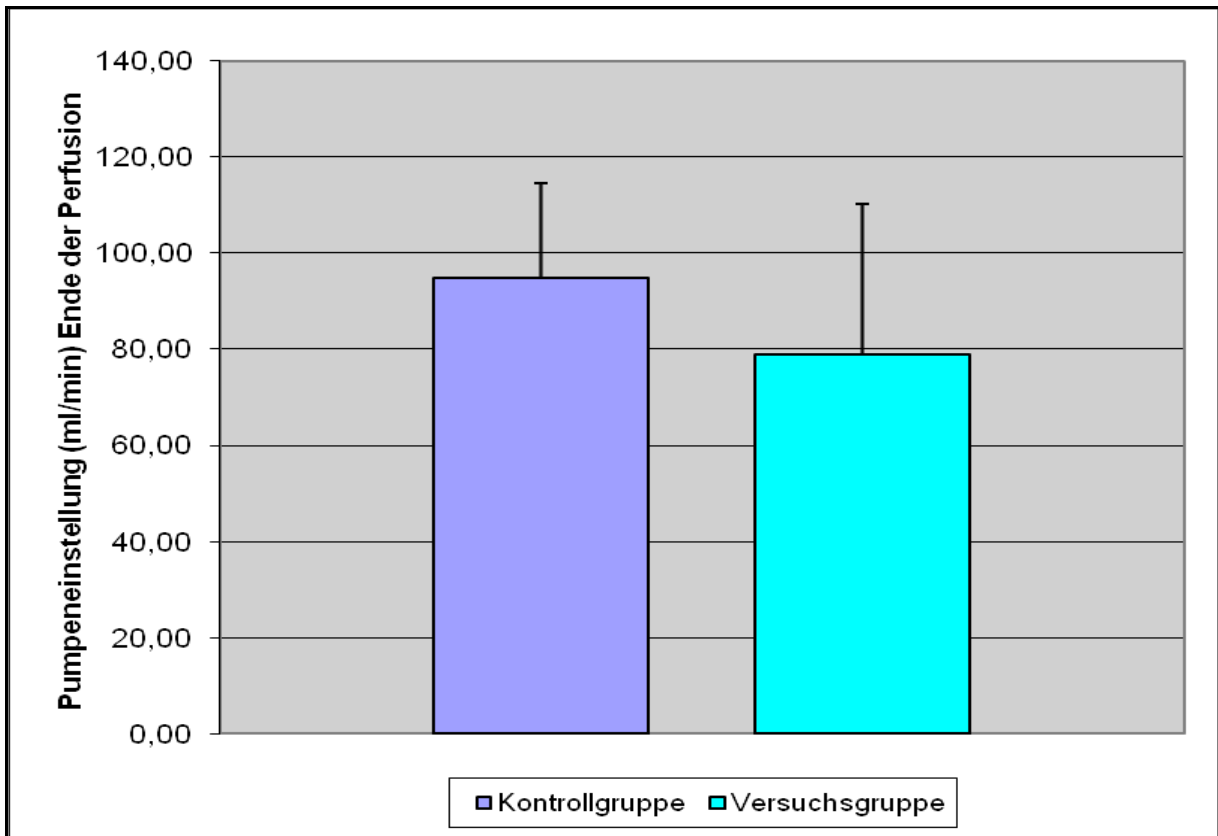
Die Pumpeneinstellung wurde im Versuch in der Art geregelt, dass nach Möglichkeit ein physiologischer MAP erreicht werden konnte. Wir wählten im Rahmen der zehn Versuche zu Beginn der Perfusion verschiedene Einstellungen zwischen 115,56 ml/min bei pig8 und 50,33 ml/min bei pig14.



**Abbildung 20:** Mittelwerte der Pumpeneinstellung zu Beginn der Perfusion in Versuchs- und Kontrollgruppe, Versuchsgruppe n=4, Kontrollgruppe n=6, student t-Test.

Der Mittelwert der Pumpeneinstellung zu Beginn der Perfusion lag in der Kontrollgruppe bei 96,30 ml/min  $\pm$  21,01. In der Versuchsgruppe lag der Mittelwert der Pumpeneinstellung bei 82,95 ml/min  $\pm$  25,15.

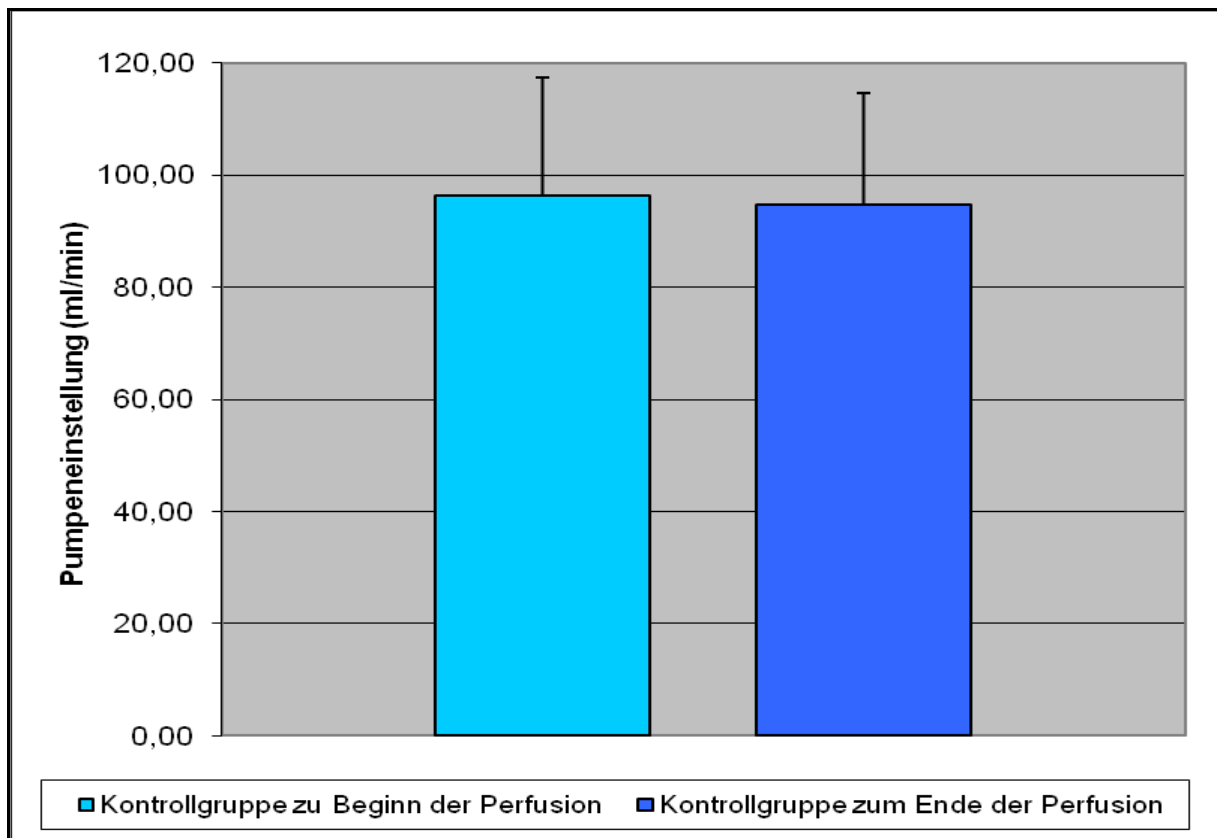
Statistisch unterschieden sich die Werte in beiden Gruppen nicht. Der Mittelwert der Pumpeneinstellung zu Beginn der Perfusion stimmt daher in Versuchs- und Kontrollgruppe überein.



**Abbildung 21:** Mittelwerte der Pumpeneinstellung zum Ende der Perfusion in Versuchs- und Kontrollgruppe, Versuchsgruppe n=4, Kontrollgruppe n=6, student t-Test.

Der Mittelwert der Pumpeneinstellung zum Ende der Perfusion lag in der Kontrollgruppe bei 94,76 ml/min  $\pm$  19,84. In der Versuchsgruppe lag der Mittelwert der Pumpeneinstellung bei 78,91 ml/min  $\pm$  31,28.

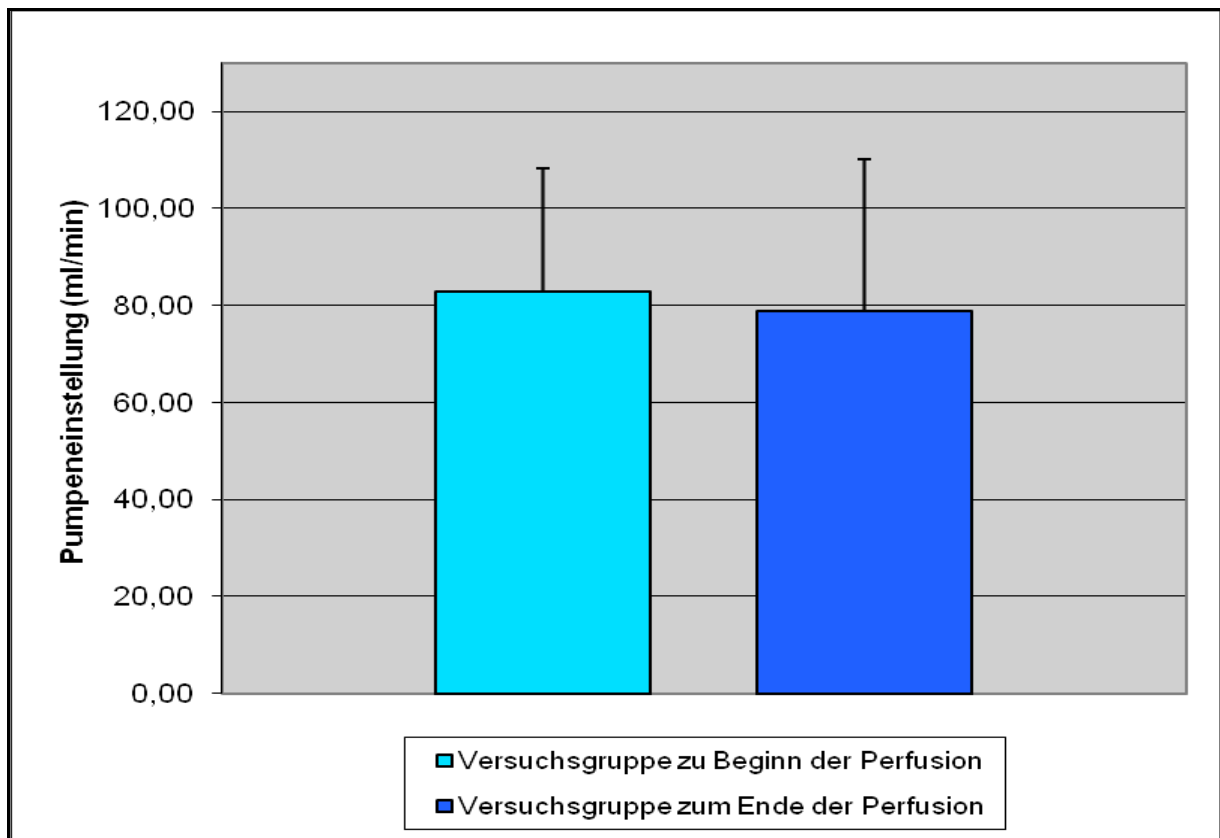
Statistisch unterschieden sich die Werte in beiden Gruppen nicht. Der Mittelwert der Pumpeneinstellung zum Ende der Perfusion stimmt daher in Versuchs- und Kontrollgruppe überein.



**Abbildung 22:** Mittelwerte der Pumpeneinstellung zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Kontrollgruppe, Kontrollgruppe n=6, repeated measures ANOVA.

Der Mittelwert der Pumpeneinstellung lag in der Kontrollgruppe zu Beginn der Perfusion bei 96,30 ml/min  $\pm$  21,01. Gegen Ende der Perfusion lag der Mittelwert der Pumpeneinstellung in der Kontrollgruppe bei 94,76 ml/min  $\pm$  19,84.

Statistisch unterschieden sich die Werte zu beiden Zeitpunkten nicht. Der Mittelwert der Pumpeneinstellung in der Kontrollgruppe zu Beginn und zum Ende der Perfusion stimmt daher überein.



**Abbildung 23:** Mittelwerte der Pumpeneinstellung zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Versuchsgruppe, Versuchsgruppe n=4, repeated measures ANOVA.

Der Mittelwert der Pumpeneinstellung lag in der Versuchsgruppe zu Beginn der Perfusion bei 82,95 ml/min  $\pm$  25,15. Gegen Ende der Perfusion lag der Mittelwert der Pumpeneinstellung in der Versuchsgruppe bei 78,91 ml/min  $\pm$  31,28.

Statistisch unterschieden sich die Werte zu beiden Zeitpunkten nicht. Der Mittelwert der Pumpeneinstellung in der Versuchsgruppe zu Beginn und zum Ende der Perfusion stimmt daher überein.

### Fazit Pumpeneinstellung

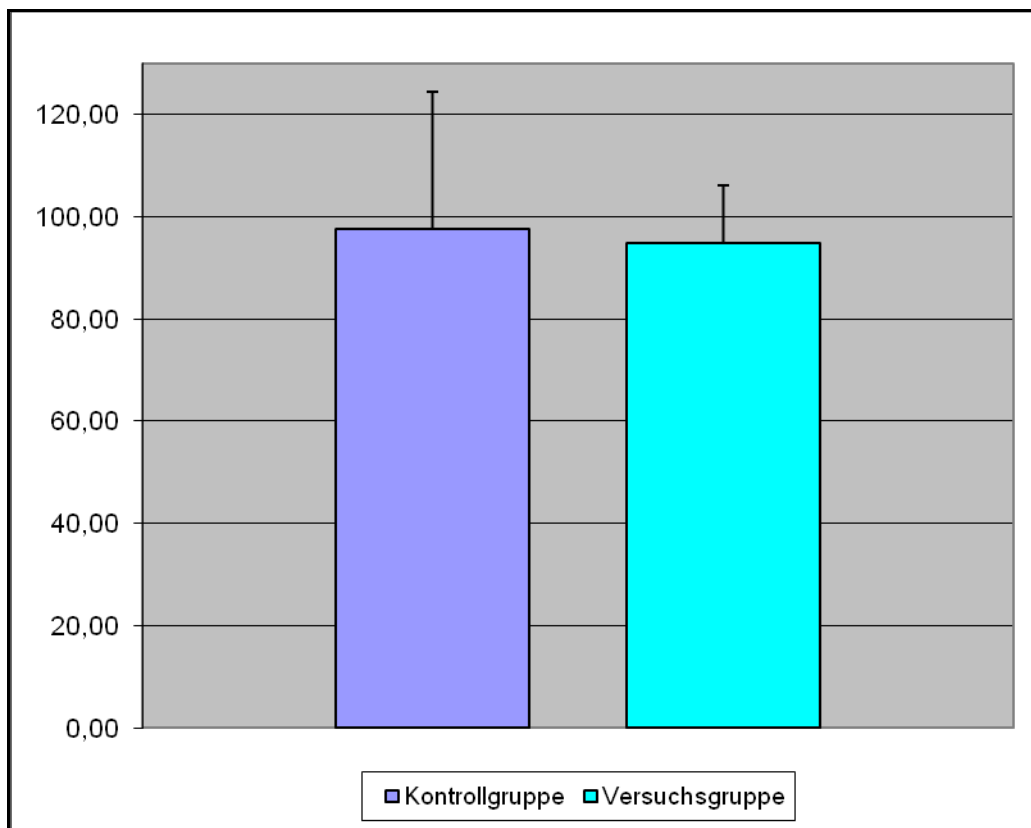
Die Pumpeneinstellung unterschied sich weder zu Beginn noch gegen Ende der Perfusion zwischen beiden Gruppen voneinander. Ferner unterschied sich innerhalb beider Gruppen die Pumpeneinstellung nicht zu beiden Meßzeitpunkten.

## Temperatur

Das in unseren Versuchen eingesetzte Perfusionssystem beinhaltet ein Reservoir, welches über ein Zweikammersystem mit Warmwasserzulauf eine gezielte und stabile Erwärmung des passierenden Blutvolumens auf 38,5°C gewährleistet. Damit lag die Temperatur des Blutes, welches das Transplantat durchströmt, während des ganzen Versuches dauerhaft im normothermen Bereich.

## Gesamtischämiezeit

Als Gesamtischämiezeit bezeichneten wir in unseren Versuchen den Zeitraum zwischen Stillstand des Spenderherzens und dem Zeitpunkt der Reperfusion des Herzens nach Öffnen der Satinsky-Gefäßklemmen. Die längste Gesamtischämiezeit betrug 144 Minuten bei pig13 und die kürzeste 66 Minuten bei pig7.



**Abbildung 24:** Mittelwerte der Gesamtischämiezeit in Versuchs- und Kontrollgruppe, Versuchsgruppe n=4, Kontrollgruppe n=6, student t-Test.

Der Mittelwert der Gesamtischämiezeit lag in der Kontrollgruppe bei 97,50 min  $\pm$  27,02. In der Versuchsgruppe lag der Mittelwert der Gesamtischämiezeit bei 94,75 min  $\pm$  11,41.

Der Mittelwert der Gesamtschämiezeit unterschied sich statistisch nicht zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe.

### **Funktionalität des Transplantats**

Die Funktionalität und Kontraktion des transplantierten Herzen wurde makroskopisch und über Palpation zum Zeitpunkt der Reperfusion und Explantation bewertet. Neun der transplantierten Herzen begannen bei Reperfusion eigenständig mit guter Kontraktion zu schlagen oder konnten bei Vorhofflimmern gegebenenfalls durch Defibrillation in einen Sinusrhythmus überführt werden. Bei den palpatorischen Nachuntersuchungen zeigten alle diese Herzen zu jedem Zeitpunkt stets eine gute Kontraktion.

Lediglich das Herz von pig10 wies nach Reperfusion und Defibrillation keine gute Kontraktion auf und konnte nicht in einen Sinusrhythmus überführt werden.



### 3.2.2 Effizienz der Transduktion

Das transplantierte Herz sowie die Organe Leber, Lunge, Niere, Herz und Milz der Versuchstiere pig6, pig12 und pig14 und der Kontrolltiere pig5, pig6, pig7, pig8, pig11 und pig13 wurden nach gezielter Beendigung des Versuchs entnommen und analysiert.

#### Markergen und Histamingabe

In der Versuchsgruppe befanden sich die pig6, pig9, pig12 und pig14. Die weiteren Tiere wurden der Kontrollgruppe zugeordnet. Da pig9 vier Tage nach Beginn des Versuchs tot aufgefunden worden ist, konnten seine Organe nicht zur Analyse verwendet werden. Daher konnte die Gewebeprobe, welche als einzige GFP als Markergen enthielt, nicht ausgewertet werden.

	<b>Pig6</b>	<b>Pig12</b>	<b>Pig14</b>
<b>Markergen</b>	LacZ	Luciferase	Luciferase
<b>Histamingabe</b>	Nein	Ja	Ja
<b>Vektordosis (Partikel ges.)</b>	$2 \times 10^{12}$	$2,3 \times 10^{13}$	$2 \times 10^{13}$
<b>Vektorperfusionszeit (min)</b>	38	41	40
<b>Transgene DNA nachweisbar</b>	<b>Ja</b>	<b>Ja</b>	<b>Ja</b>
<b>Transgenes Protein nachweisbar</b>	<b>Nein</b>	<b>Ja</b>	<b>Nein</b>
<b>Effizienz Transduktion</b>	LV:Endokard>Epikard RV>Septum>LV	LV: Endokard>Epikard Septum>LV>RV	LV: Epikard>Endokard RV>Septum>LV

**Abbildung 25:** Nachweis transgener DNA und Proteinexpression, rosa unterlegt negativer Nachweis, blau unterlegt positiver Nachweis

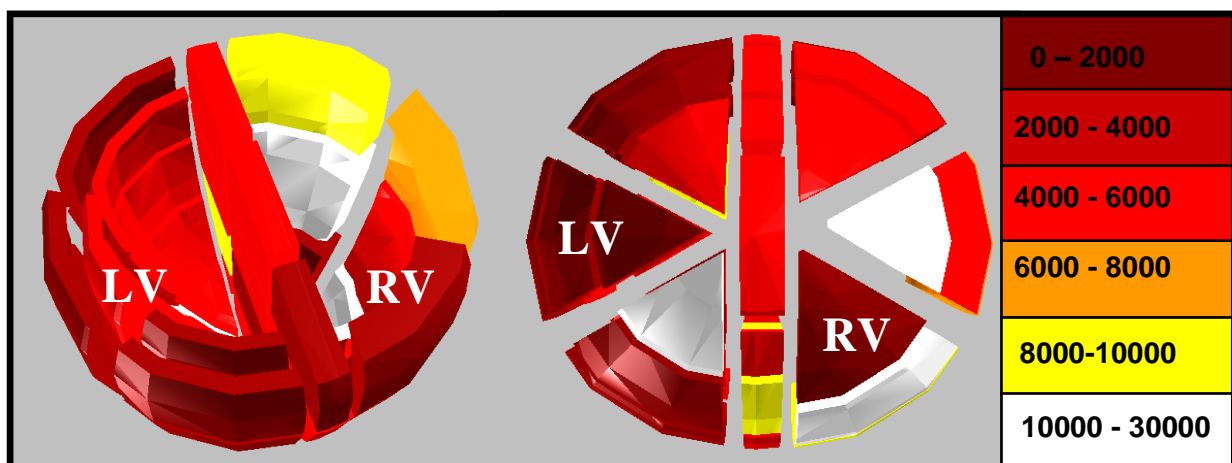
### Transduktion pig6

Pig6 erhielt kein Histamin. Die Konzentration des Vektors betrug  $2 \times 10^{12}$  Partikel und die Vektorperfusionszeit lag bei 38 Minuten. Eine Analyse der quantitativen Werte erfolgte durch Frau Dr. Natascha Schuhmann und wurde von dieser im Rahmen ihrer Promotionsschrift diskutiert [Schuhmann N, bisher nicht veröffentlicht].

Bei der Analyse des Transplantats war der Nachweis transgener DNA mittels quantitativer PCR positiv. Die quantitative Analyse zeigte, dass die Transduktion des linksventrikulären Endokards stärker war als die des entsprechenden Epikards. Absolut wurden in den zwölf Sektoren, in welche das Endokard schematisch unterteilt worden war, Werte zwischen 739 Kopien/microl und 8753 Kopien/microl ermittelt. Das Epikard zeigte durchschnittlich eine geringere Transduktion als das Endokard. Die in diesem Bereich erzielten Werte lagen zwischen 145 Kopien/microl und 14484 Kopien/microl. Die Analyse des rechten Ventrikels zeigte eine sehr hohe Transduktion von Werten zwischen 26147 Kopien/microl und 989 Kopien/microl. Die Transduktion des Septums lag zwischen 960 Kopien/microl und 8584 Kopien/microl. Ein Vergleich der Werte zeigt, dass die Transduktion des rechten Ventrikels im Durchschnitt deutlich über der des Septums und diese über der des linken Ventrikels lag.

Ein Proteinnachweis mittels X Gal Färbung war im Gegensatz zum positiven DNA Nachweis in jedem Sektor des Transplantats negativ.

Die nachfolgende Grafik visualisiert den Nachweis transgener DNA in den einzelnen Sektoren des Transplantats bei pig6. Mit zunehmender Helligkeit nimmt die Zahl der Kopien im transduzierten Gewebe zu.



**Abbildung 26:** 3D Darstellung der Transduktionseffizienz pig6 ermittelt in RLU = relative light units, LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel (Software Organ 3-D, Thein B.)

Die Analyse der Organe, die pig 6 entnommen worden sind, zeigt, dass in keinem Organ transgene DNA oder das entsprechende Protein nachgewiesen werden konnte.

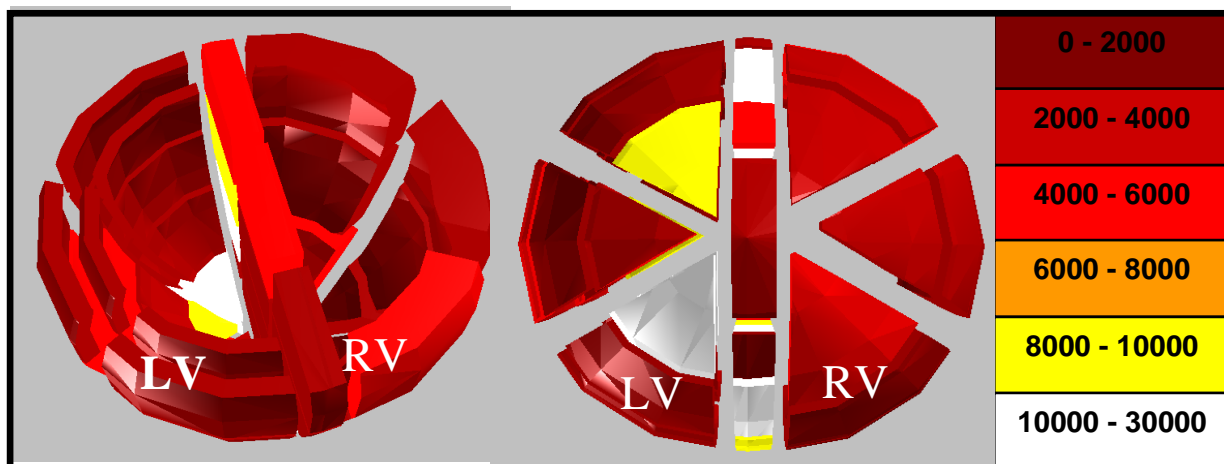
### **Transduktion pig12**

Die Transduktion bei pig 12 wurde durch die Zugabe von Histamin unterstützt. Die bei diesem Tier verwendete Vektorkonzentration lag bei  $2,3 \times 10^{13}$  Partikel AAV 2. Als Reporter gen wurde Luciferase verwendet. Die Perfusionszeit des Vektors betrug 41 Minuten. Die Analyse des Transplantats auf transgene DNA zeigte eine Transduktion des Endokards des linken Ventrikels im Bereich zwischen 202 Kopien/microl und 28984 Kopien/microl. Die Transduktion im Epikard lag zwischen 136 Kopien/microl und 20601 Kopien/microl.

Damit lag auch beim zweiten Versuchstier die Transduktion des Endokards im linken Ventrikel deutlich über der Transduktion im Epikard. Die Transduktion im rechten Ventrikel lag zwischen 237 Kopien/microl und 2934 Kopien/microl. Die Transduktion im Septum zwischen 250 Kopien/microl und 15281 Kopien/microl. Ein Vergleich der drei Bereiche ergab, dass die Transduktion im Septum durchschnittlich über der Transduktion im linken Ventrikel und diese über der im rechten Ventrikel lag.

Mit Hilfe des Luciferase Assays konnte bei pig12 eine Markergenexpression nachgewiesen werden. Extrakardial waren weder eine Expression des transgenen Proteins noch der entsprechenden DNA nachzuweisen.

Die nachfolgende Grafik visualisiert den Nachweis transgener DNA in den einzelnen Sektoren des Transplantats bei pig12. Mit zunehmender Helligkeit nimmt die Zahl der Kopien im transduzierten Gewebe zu.



**Abbildung 27:** 3D Darstellung der Transduktionseffizienz pig12 ermittelt in RLU = relative light units, LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel (Software Organ 3-D, Thein B.)

### Transduktion Pig14

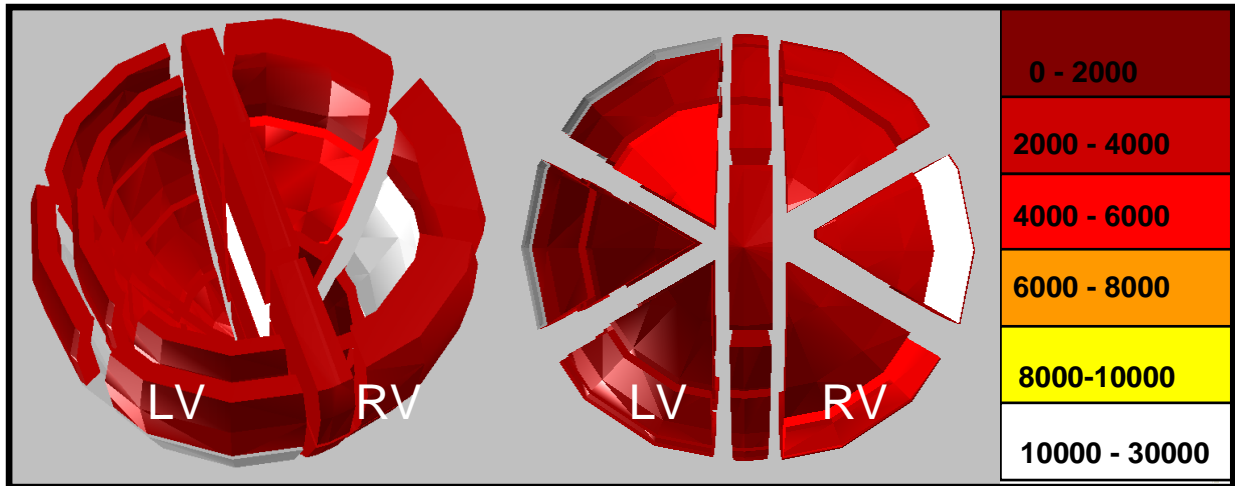
Ein Proteinnachweis war bei dem dritten Versuchstier negativ. Pig14 erhielt  $2 \times 10^{13}$  Partikel AAV-2 Luciferase unter Histaminzugabe. Die Vektorperfusionszeit betrug 40 Minuten. Mittels quantitativer PCR konnte transgene DNA nachgewiesen werden.

Diese lag quantitativ deutlich unter den in der zweiten Versuchsgruppe ermittelten Werten. Im linken Ventrikel konnten im Epikard Werte zwischen 26 und 5862 Kopien/microl gemessen werden. Im Endokard lagen diese Werte zwischen 11 und 826 Kopien/microl.

Die Transduktion bei pig14 war im Gegensatz zu pig6 und pig12 im Epikard deutlich stärker ausgeprägt als im Endokard. Im rechten Ventrikel lag die Transduktion zwischen 95 und 11051 Kopien/microl. Im Septum erreichte sie Werte zwischen 64 und 12.239 Kopien/microl. Damit zeigte sich beim Vergleich der drei Bereiche, dass die Transduktion im rechten Ventrikel über der Transduktion im Septum und diese über der im linken Ventrikel lag.

Extrakardial waren weder eine Expression des transgenen Proteins noch der entsprechenden DNA nachzuweisen.

Die nachfolgende Grafik visualisiert den Nachweis transgener DNA in den einzelnen Sektoren des Transplantats bei pig14. Mit zunehmender Helligkeit nimmt die Zahl der Kopien im transduzierten Gewebe zu.



**Abbildung 28:** 3D Darstellung der Transduktionseffizienz pig14 ermittelt in RLU = relative light units, LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel (Software Organ 3-D, Thein B.)

## 4. Diskussion

### 4.1 Zielsetzung

Die Expression immunregulatorischer Proteine wie IL-10 oder CTLA4Ig kann eine Möglichkeit sein, Transplantatabstoßungen und den Einsatz von Immunsuppressiva deutlich zu reduzieren [Salgar SK 2004, Hayashi S 2005]. Eine Expression dieser Proteine kann durch Gentherapie im Rahmen eines viralen Gentransfers erreicht werden. Neben der immunologischen Sicherheit muß oberstes Ziel eines solchen Verfahrens aber die effiziente Transduktion und die Aufrechterhaltung der Funktionalität des transplantierten Organs sein.

Mit der Intention, ein solches Gentherapieverfahren zu optimieren, verfolgten wir mit der vorliegenden Studie folgende Ziele:

#### 1. Ziel:

**Etablierung eines Perfusionsmodells, das die selektive extrakorporale Versorgung des schlagenden Herzens unter physiologischen Bedingungen ohne vorangehende Kardioplegie ermöglicht**

Die zu etablierende Perfusionsmethode sollte eine hochdosierte Vektorapplikation ermöglichen und damit die Grundlage für einen hocheffizienten Gentransfer bieten. Diese Anforderungen konnten wir erstmals in Form der *in situ* - Langendorff – Perfusionsmethode gepaart mit einer assoziierten chirurgischen Vorgehensweise umsetzen. Unsere Versuche haben gezeigt, dass mit Hilfe dieses Systems eine extrakorporale Perfusion über einen längeren Zeitraum unter Stabilisierung und Beibehaltung der physiologischen Rahmenbedingungen zufriedenstellend erfüllt werden kann. Initiale Defizite der Oxygenierung, hervorgerufen durch das primär verwendete Schlauchoxygenierungssystem, konnten durch den Einsatz eines Kinderoxygenators behoben werden.

### **Vektorapplikation**

Die neuartige Perfusionsmethode sollte die Rahmenbedingungen für eine optimale Transduktion des Herzens mit rAAV 2 bieten. Im Gegensatz zu einer systemischen Gabe bietet die geschlossene Perfusion des Herzens den Vorteil, dass eine Selektivität der Transduktion erzielt wird.

Die in situ Langendorff Perfusionsmethode schuf durch das Erbringen der folgenden Eigenschaften die Voraussetzungen für eine **Maximierung der Konzentration des applizierten Vektors**:

1. lange Vektorapplikationszeit bei Rezirkulation des perfundierenden Blutes
2. geringes, rezirkulierendes Blutvolumen und damit Erreichen einer hohen Vektorkonzentration im Blut.

### **Vektordosis**

Die drei Versuchstiere erhielten Virusdosen von  $2 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{13}$  und  $2,3 \times 10^{13}$  Partikeln. Bei allen drei Tieren fiel der transgene DNA - Nachweis positiv aus. Nur pig12, das die höchste Virusdosis erhalten hat, zeigte einen positiven Proteinnachweis. Es kann daher vermutet werden, dass eine Korrelation zwischen Transduktion, Expression und Vektordosis besteht. Diese Meinung wird unter anderem von Raake et al. geteilt, welche die Transduktionseffizienz von AAV 2/6 im porcinen Modell untersucht haben [Raake P 2006].

Der grundlegend neue Ansatz der von uns entwickelten Perfusionsmethode war das Aufrechterhalten der physiologischen Bedingungen. Dies ermöglichte es uns, das zu transplantierende Herz während der Transduktion ununterbrochen schlagen zu lassen und ein Maximum an Transduktion zu erzielen.

**Folgende Parameter wurden dazu im physiologischen Bereich gehalten:**

- Normothermie
- Normokapnie und Normoxämie
- Herzfrequenz und Sinusrhythmus
- Perfusionsdruck in den Koronarien

**Folgende Größen mußten ferner extern reguliert werden:**

- Perfusionszeit
- Pumpeneinstellung

**Schließlich erfolgte eine Erfolgsmessung** unmittelbar nach der Transplantation anhand der Funktionalität des Transplantats und gegen Ende des Versuches anhand der Transduktions- und Expressionsrate, die in den Gewebeproben des Herzens ermittelt worden ist.

Im Folgenden sollen die genannten Parameter und Erfolgsgrößen einzeln betrachtet und hinsichtlich ihrer Bedeutung im Versuch und für die Weiterentwicklung der *in situ* – Langendorff Perfusionsmethode diskutiert werden.

**Normothermie**

Grundsätzlich ist die selektive Perfusion eines einzelnen Organs bisher zwingend an eine Ischämie des Organs gebunden. Um die negativen Auswirkungen der Ischämie auf das Organ zu minimieren, werden in entsprechenden Ansätzen die Organe mittels kalter Spül- oder Konservierungslösung gekühlt.

Hierbei wird der Metabolismus der Zelle jedoch so stark reduziert, dass aktive Vorgänge fast nicht mehr stattfinden. Da jedoch die Aufnahme von Vektoren auch an aktive Prozesse gebunden ist, war es unsere Überlegung, dass die Transduktion als aktiver Prozeß bei Normothermie am effizientesten erfolgen kann. Daher haben wir das Blut in unserem System auf konstant bei 38,5°C gewärmt. Diese Temperatur entspricht der physiologischen Körpertemperatur bei Schweinen.

In der Literatur werden Studien beschrieben, welche von dem gegensätzlichen Ansatz ausgehen, dass Perfusion unter Hypothermie zu effizienterer Transduktion führt. Kaspar et al. äußern in ihrer Studie zur Transduktion kardialen Gewebes mit rAAV 2 an Ratten und Schweinen bei dem Vergleich mit einer Studie Hoshijima et al. an Hamstern, dass die bei diesen verwendete hypotherme Perfusion ursächlich für die erreichte hocheffiziente Transduktion von 79% der Myozyten sein könnte. Ferner begünstigte Hypothermie die homologe Transduktion von Endo- und Epikard [Hoshijima M 2002, Kaspar B 2004].



Diese Meinung wird in zahlreichen anderen Studien aufgrund der dort erzielten Versuchsergebnisse kritisiert. Miyagi et al. verglichen verschiedene Applikationsmethoden von Vektoren zur Transduktion von Rattenherzen *in vivo* miteinander. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass unter hypothermen Bedingungen die Transduktion bei systemischer Gabe und bei konzentrierter selektiver extrakorporaler Applikation über ein Perfusionssystem bei gleicher Vektordosis zu gleicher Transduktion führt. Als Ursache für das unerwartet schlechte Outcome der extrakorporalen Perfusion sehen sie die Hypothermie an [Miyagi N 2008]. Oi et al. erzielten bei einer dreißigminütigen hypothermen Perfusion am Schweineherz *ex vivo* mit AdV eine Transduktion von maximal 22,62% [Oi K 2006].

Neben den relativ schlechten Transduktionsergebnissen sah die Gruppe um Miyagi et al. jedoch positive Einflüsse der Hypothermie auf den Organerhalt, auf einen reduzierten Stoffwechsel und auf die unerwünschte Transduktion anderer Empfängerorgane [Miyagi N 2008]. Diese Hypothese wurde von anderen Arbeitsgruppen verfolgt und Pelligrini et al. beschreiben, dass Hypothermie bei extrakorporaler Transduktion keinen Einfluß auf die Transduktion anderer Organe wie zum Beispiel die Transduktion der Leber habe. Ferner beschreiben sie, dass bei der Verwendung von AdV Hypothermie den adenoviraler Gentransfer am Herzen und an Endothelzellen einer Ratte erheblich behindere. [Pelligrini C 1998].

Betrachtet man die aktuellen Meinungen in der Literatur, lässt sich feststellen, dass der normothermen extrakorporale Perfusion gegenüber der hypothermen Variante hinsichtlich der Effizienz der Transduktion der Vorzug zu geben ist. Vorzüge der hypothermen Perfusion wie Organerhalt und selektive Perfusion werden darüber hinaus durch den Aufbau unseres Perfusionssystems auch unter normothermer Perfusion erzielt.

### **Normokapnie und Normoxämie**

In den von uns durchgeführten Vorversuchen verwendeten wir einen in der Arbeitsgruppe selbst konstruierten Oxygenator. Die mit Einsatz dieses Oxygenators durchgeführten Versuche zeigten in den durchgeführten Blutgasanalysen durchgängig weit unter den angestrebten Grenzwerten liegende Sauerstoffsättigungen sowie Hyperkapnie. Daher verwendeten wir in den folgenden versuchen einen herkömmlichen Kinderoxygenator und konnten damit

physiologische Werte in den Blutgasanalysen erzielen. Somit erreichten wir eine suffiziente Versorgung des Gewebes während der Perfusion.

### **Herzfrequenz und Sinusrhythmus**

Zu Beginn und gegen Ende der Perfusion führten wir Messungen der Herzfrequenz durch. Ferner erfaßten wir die Form der Herzaktion durchgängig mit Hilfe einer EKGs. Durch den Einsatz unserer Perfusionsmethode konnten wir zu jedem Zeitpunkt physiologische Herzfrequenzen erzielen. Diese unterschieden sich nicht zu den beiden Meßzeitpunkten. Eine durch den eintretenden Tod des Versuchstieres hervorgerufene Streßreaktion des Herzens, welche sich in einer Frequenzzunahme äußert [Kindermann W 2008], konnten wir nicht beobachten. Die Ursache hierfür könnte in der Denervierung des Herzens und seiner Isolation vom Kreislauf des Spendertieres zu sehen sein, welche am schlagenden Herzen vor dem Tod des Tieres erfolgte. Daher konnte durch Sympatikusaktivität noch durch Transmitterausschüttung eine Frequenzzunahme des Herzens hervorgerufen werden.

Das Herz schlug ferner während des Perfusionsvorganges durchgängig im Sinusrhythmus. Auch in diesem Bereich konnten physiologische Bedingungen erreicht werden.

### **Perfusionsdruck in den Koronarien**

Der Perfusionsdruck in den Koronarien konnte durchgehend im physiologischen Bereich gehalten werden. Somit konnten die Koronarien ausreichend durchblutet werden. Diese Bedingung stellt eine entscheidende Voraussetzung für eine optimale Transduktion des Myokards dar, welche zum überwiegenden Teil aus dem Blut der Koronarien realisiert wurde. Wir optimierten die Transduktion erfolgreich durch die Zugabe von Histamin zur Lockerung der Endothelzellverbände.

Gegenüber der maßgeblichen Transduktion des Myokard durch das Blut der Koronarien ist der Anteil der Transduktion über das in den Herzkammern befindliche Blut zu vernachlässigen.

### **Perfusionszeit**

Fraglich ist, ob eine Beziehung zwischen Perfusionszeit und Transplantatüberlebenszeit besteht. Berechnet man die Korrelation zwischen der Überlebenszeit der Versuchstiere, welche aufgrund des Studiendesigns ein Maß für die Transplantatüberlebenszeit darstellt, und der Perfusionszeit des Transplantats über das System, so ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,03. Es kann also unter Berücksichtigung der zehn im Versuch befindlichen Tiere statistisch keine Beziehung zwischen beiden Größen nachgewiesen werden. Eine längere Perfusionszeit wirkt sich damit gemäß der Ergebnisse aus unseren Versuchen nicht negativ auf die Transplantatüberlebenszeit aus. Perfusionszeiten zwischen 50 und 72 Minuten sind daher in unserem Versuchsaufbau als praktikabel zu betrachten. Kritisch zu betrachten ist im Rahmen dieser statistischen Betrachtungsweise jedoch die nicht repräsentative geringe Grundgesamtheit von  $n = 10$  der in den Versuch eingeschlossenen Tiere.

### **Pumpeneinstellung**

Der durch die Pumpeneinstellung generierte Blutfluß war zu Beginn und gegen Ende der Perfusion gleich groß und homogen zwischen den Gruppen. Das Erreichen eines ausreichenden Blutflusses und damit das Erreichen einer suffizienten Perfusion der Koronarien stellt eine nötige Voraussetzung dar, um eine gute Transduktion des Myokards zu erzielen. Diese Betrachtungen sind Gegenstand der bisher nicht veröffentlichten Arbeit des Doktoranden Markus Köhn. Durch die von uns entwickelte *in situ* – Langendorff Perfusionsmethode konnte eine ausreichende Durchblutung des myokardialen Gewebes erzielt werden.

### **Transduktions und Expression**

Bei Auswertung der Transduktion unter Zuhilfenahme der quantitativen PCR stellten wir fest, dass ein positiver Nachweis von transgener DNA in allen drei Transplantaten der Versuchsgruppe geführt werden konnte. Das vorliegende Modell ist damit grundlegend geeignet, eine kardiale Transduktion zu erzielen.

Die Effizienz der stabilen Transduktion des gesamten Herzmuskels nach 21 Tagen kann jedoch als nur gering betrachtet werden. Es zeigen sich ferner deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Sektoren des Herzens. Bei Betrachtung der

Ergebnisse aller drei Versuche lässt sich feststellen, dass die Transduktion des rechten Ventrikels deutlich effizienter ist als die des linken Ventrikels. Im Bereich des Apex wurde die höchste Transduktion erreicht. Effizienter als die Ventrikel wurde ebenfalls das Septum transduziert.

### **Transduktionsverteilung**

Unsere Versuche haben gezeigt, dass zwar alle Abschnitte des Herzens transduziert worden sind, jedoch war die Verteilung der Transduktion heterogen.

Wir konnten feststellen, dass bei zwei von drei Versuchen die Transduktion des Endokards im Bereich des linken Ventrikels der des Epikards überlegen war. Unsere Ergebnisse stimmen damit mit dem Grundsatz der Endo-Epi-Ratio überein. Diese besagt, dass das Verhältnis des endo- zum epikardialen Blutfluß im Verhältnis 1,2 : 1 beträgt und somit ein transmuralen Perfusionsgradienten zugunsten der endokardialen Durchblutung besteht.

In der Literatur finden sich hingegen auch gegensätzliche Ergebnisse: Kaspar et al. führten Studien am Schweineherz mit rAAV 2 durch und erzielten im Epikard eine weitaus höhere Transduktion als im Endokard. Li et al. berichten bei *in vivo* Transduktion bei Hamstern, dass eine Präferenz in der Transduktion peripherer Regionen des Herzmuskels zu beobachten war [Li J 2003].

Die Tatsache, dass unsere Ergebnisse im Gegensatz zu den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen mit der Endo-Epi-Ratio übereinstimmen, lässt positive Rückschlüsse auf die Effizienz unserer Perfusionsmethode zu. Durch diese Methode konnte im Bereich des Endokards eine hohe Transduktion erzielt werden. Dies kann zum einen durch das Erreichen einer hohen Durchblutung des Endokards begründet werden. Ferner kann sich die hohe Vektorkonzentration, welche durch die Kombination aus hoher Vektordosis, geringem Blutvolumen und rezirkulierender Perfusion erreicht wird, positiven auf die Transduktion auswirken.

Kritisch ist bei der Betrachtung unserer Versuche die geringe und nicht repräsentative Fallzahl von n=3 Versuchen zu betrachten. Bei zukünftigen Versuchen ist eine größere Fallzahl zu wählen und eine Zugabe von Histamin zur Lockerung der

Endothelbarriere und zum Erreichen einer homologen Transduktion des Myokards zu wählen.

### **Fazit**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die im Versuch gewählten Einstellungen am Perfusionssystem hinsichtlich Perfusionsdruck und Perfusionszeit, die Pumpeneinstellung, die Verwendung des Oxygenators sowie die gewählte Gesamtschämiezeit geeignet waren, eine gute Funktionalität der Transplantate zu gewährleisten.

90% der Transplantate zeigten am Perfusionssystem und nach Reperfusion eine gute Funktionalität. Wir können somit davon ausgehen, dass mit dem *in situ* - Langendorff - Perfusionssystem die extrakorporale Perfusion eines schlagenden Herzens unter physiologischen Bedingungen über einen Zeitraum von mindestens fünfzig Minuten sicher zu realisieren ist.

Die genannten Einstellungen am System sind daher sehr geeignet, um in weiterführenden Versuchen, welche mit Hilfe des Einsatzes der *in situ* – Langendorff Perfusionsmethode durchgeführt werden, beizubehalten zu werden.

## **2. Ziel:**

### **Die Bestimmung der Effizienz und Selektivität der Transduktion**

Wir haben in unseren Versuchen rAAV 2 basierte Vektorsysteme verwendet. Diese Entscheidung basierte auf den vielversprechenden Ergebnissen zahlreicher Arbeitsgruppen, die sie *in vivo* und *in vitro* bei der Transduktion kardialen Gewebes mit AAV-2 erzielt haben. Auf diese Studien soll im anschließenden Abschnitt eingegangen werden.

Im Rahmen einer unveröffentlichten Studie haben Frau Dr. Natascha Schuhmann und Frau Dr. Hildegard Büning, Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln, vergleichend die Transduktionseffizienz der AAV Serotypen 1-5 an porcinen Endothelzellkulturen untersucht. Sie konnten zeigen, dass in diesem Rahmen AAV-2 mit mehr als 88% transduzierten Zellen den effizientesten Vektor zur Transduktion porciner kardialer Endothelzellen darstellte.

### **Bisher durchgeführte Studien**

#### **Mausmodell / Hamstermodell**

Im Rahmen einer Studie von Flierl et al. zur Therapie mitochondrialer Myopathie sind *in vitro* Untersuchungen an murinen Myoblasten und Myotuben vorgenommen worden. Diese ergaben eine stabile Expression des Markergens bis zu zwei Wochen nach Transduktion der Zellen durch rAAV. Die Studie ließ ferner erkennen, dass eine Transduktion sich teilender Muskelzellen effizienter ist als die Transduktion ausdifferenzierter Zellen [Flierl A 2005]. Ähnlich positive Ergebnisse konnten auch bei den *in vivo* Untersuchungen im Mausmodell erzielt werden. Bei der *in vivo* Applikation der Virusvektoren ist zwischen der systemischen Gabe und der indirekten koronaren Applikation, bei der die Injektion der Vektoren in die Koronarien über die nach distal geklemmte Aorta ascendens erfolgt, zu unterscheiden. Ferner ist eine intramuskuläre Injektion in den Herzmuskel als Verfahren möglich.

Bei systemischer Applikation von AAV 2 über die Schwanzvene erwachsener Mäuse konnten Müller et al. eine Expression des verwendeten Reportergens Luciferase im Herz nach drei Wochen messen. Ferner stellte die Arbeitsgruppe fest, dass die Wahl des Promoters eine gewebespezifische Expression ermöglicht. Um die Markergenexpression im Herz zu erhöhen, war CMV enh/MLC1.5 dem CMV Promoter überlegen [Müller O 2006]. Bei einem Vergleich der Transduktionseffizienz der AAV-Serotypen im Mausmodell *in vivo* bestätigten Wang et al., dass AAV 2 den

Herzmuskel bei systemischer Applikation unter Verwendung des Markergens GFP transduziert. Das Ergebnis des Vergleichs der AAV-Serotypen ergab jedoch eine deutliche Überlegenheit von AAV 8 gegenüber den anderen AAV-Vektoren bei der spezifischen kardialen Transduktion [Wang Z 2005]. Bei direkter koronarer Applikation *in vivo* von AAV/LacZ (CMV-Promoter) konnten Svensson et al. über einen Zeitraum von acht Wochen nach Transduktion eine stabile Expression der Markergene in mehr als 50% der Kardiomyozyten ohne Inflammation des transduzierten Gewebes zeigen [Svensson EC 1999]. Chen et al. erzielte ebenfalls hohe Transduktionsraten des murinen Myokards von bis zu 40% bei Verwendung von AAV/CTLA4Ig/LacZ als Vektorsystem [Chen Z 2003]. Herausragend effektive Transduktion des murinen Myokards von 81% erreichen Iwatate et al. bei katheterbasierter intrakoronarer Applikation von rAAV/LacZ *in vivo* nach vier Wochen [Iwatate M 2003]. Die Gruppe verzeichnete dabei nach echokardiographischer Untersuchung der Herzen keine Funktionseinschränkung. Weitere Markergenexpression konnte allein in der Leber nachgewiesen werden. Svensson et al. haben ferner eine direkte Injektion eines AAV/LacZ (CMV-Promoter) Vektors in das murine Myokard *in vivo* vorgenommen und dabei ebenfalls eine stabile Transduktion ohne Entzündungszeichen nach acht Wochen bestätigen können. Die Transduktion beschränkt sich dabei jedoch primär auf Myozyten in der unmittelbaren Umgebung der Injektionsstelle [Svensson EC 1999]. Zusammenfassend kann somit die Möglichkeit einer Transduktion myokardialer Zellen im Mausmodell *in vivo* und *in vitro* anhand einer effektiven Expression der Markergene überzeugend dargestellt werden. *In vivo* Studien zur intrakoronaren Applikation von rAAV/LacZ ergaben auch bei Hamstern eine hocheffiziente, stabile und spezifisch kardiale Transduktionsrate des Myokards von 79% [Hoshijima M 2002]. Diskutiert wird unter anderem die Perfusion des Herzmuskels bei Hypothermie als möglich begünstigender Faktor. Eine weitere Studie von Li et al. bestätigt die hocheffiziente Transduktion des myokardialen Gewebes bei Hamstern. Dazu wurden Hamsterherzen explantiert, *ex vivo* mit AAV/LacZ (CMV-Promoter) perfundiert und danach heterotop in einen Empfänger implantiert. Bei Versuchsende nach einem Jahr zeigten mehr als 90% des Herzgewebes eine Expression des Markergens. Intrakoronare Applikation von AAV ermöglicht somit eine Transduktion des Myokards auch bei Hamstern.

Eine homogene Verteilung der Expression über das ganze Myokard wird gemäß den Aussagen einer Studie von Ikeda et al. bei Hamstern unter hypothermen Bedingungen und bei Histamingabe begünstigt [Ikeda Y 2002].

### **Rattenmodell**

Die Transduktionsraten bei Ratten werden dagegen in der Literatur kontroverser diskutiert. *In vitro* durchgeführte Untersuchungen zeigten eine Transduktion der Kardiomyozyten von neonatalen Ratten mit AAV 2-CMV-Luc [Müller O 2006]. Die Ergebnisse konnten durch die Verwendung verschiedener Promoter weiter verbessert werden. Kaspar et al. konnte ebenfalls eine Transduktion einer Mehrzahl der Kardiomyozyten und die Expression der Markergene *in vitro* bei der Verwendung von AAV 2 EGFP nach zehn Tagen zeigen [Kaspar B 2004]. Burdorf und Schuhmann et al. hingegen konnten *in vitro* keine Transduktion durch die Verwendung von der AAV Serotypen 1-5 und der Markergene LacZ und GFP nachweisen. Sie verwendeten im Rahmen ihrer *in vitro* Studien Kulturen kardialer Endothelzellen von Ratten. In den anschließenden *in vivo* Studien an schlagenden und nicht – schlagenden Rattenherzen unter normo- und hypothermen Bedingungen konnte ebenfalls keine Transduktion ermittelt werden. Ferner führte die Transduktion bei systemischer Applikation und direkter Injektion in den Skelettmuskel der Ratten zu keiner messbaren kardialen Expression der Markergene [Burdorf L 2006]. Weitere Untersuchungen der Gruppe führten zu dem Ergebnis, dass eine *in vivo* Transduktion der kardialen Zellen möglich ist - im Herzgewebe kann unabhängig von der Applikationsmethode von AAV 2 transgene DNA nicht jedoch eine Markergenexpression nachgewiesen werden. Die Untersuchenden folgern daher, dass eine kardiale Transduktion möglich ist, aber eine Expression des Markergens durch Barrieren in der Zelle behindert wird [Burdorf L 2007]. Ferner verweisen sie hinsichtlich der Unterschiede in der Effizienz der Transduktion kardialer Zellen bei verschiedenen Spezies auf die Möglichkeit einer Spezies-spezifischen Transduktion [Burdorf L 2006]. Hingegen konnte durch intramuskuläre Injektion von rAAV – LacZ in einer Studie von Melo et al. eine Transduktionsrate des Myokards der behandelten Ratten von 40-50% erreicht werden. Der Nachweis erfolgte durch positive Expression des Markergens [Melo LG 2002]. Auch Kaplitt et al. konnten durch intramuskuläre Gabe von AAV-LacZ in den Herzmuskel von Ratten positive Expression der Markergene nach zwei Monaten nachweisen. In dieser Studie wurde



keine Entzündung nachgewiesen, die Expression des Markergens befand sich zum größten Teil um die Einstichstelle [Kaplitt MG 1996]. Kaspar et al. stellten bei einer indirekten koronaren Applikation von AAV-EGFP unter Histamingabe fest, dass das Myokard der Ratten eine GFP Expression von 20 - 32 % nach einem Jahr zeigte. Ihre Untersuchungen ergaben ferner, eine deutliche Expressionsdifferenz innerhalb des Myokards. 50 % des Epikards wiesen eine Expression auf, jedoch nur 10% der Zellen des Endokards. Allein in der Leber konnte des Weiteren eine leichte Expression nachgewiesen werden [Kaspar B 2004].

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Ergebnisse zur Möglichkeit einer Expression transduzierter Markergene im Rattenmodell *in vitro* und *in vivo* zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen sehr stark voneinander abweichen. Die Bandbreite der möglichen Expression liegt dabei in den *in vivo* Studien zwischen keiner Expression bei Burdorf et al. und 50% bei Kaspar et al.. Die Möglichkeit einer Transduktion hingegen scheint weitreichend bestätigt. Allerdings besteht die Möglichkeit einer speziesabhängigen Qualität der Expression der transduzierten Markergene [Kaspar B 2003, Burdorf L 2007].

### **Schweinemodell**

Vielversprechend sind dagegen die Ergebnisse zur Transduktion im Schweine-Modell. Begleitend zu den negativen Ergebnissen fehlender Expression der Markergene im Rattenmyokard *in vitro* und *in vivo*, publizieren Burdorf et al. die vielversprechenderen Ergebnisse einer *in vitro* Studie zur Transduktion am kardialen Endothel von Schweinen im Vergleich. An porcinen kardialen Endothelzellen *in vitro* konnte demnach eine Transduktionsrate von 88,4% bei Verwendung des AAV 2 Vektors erreicht werden [Burdorf L 2006]. Positive Ergebnisse bei einer direkten intrakoronaren Gabe *in vivo* von AAV-LacZ in die linke Hauptkoronararterie bei Schweinen erzielten auch Kaplitt et al. [Kaplitt MG 1996]. Drei Tage nach Transduktion konnten sie eine Expression des Markergens im porcinen Myokard messen. Die Expression war dabei nicht allein auf die Umgebung der linken Hauptkoronararterie begrenzt, sondern im gesamten Myokard messbar. Jedoch lag die größte Expression im Versorgungsgebiet der Koronararterie. Die Effizienz der Expression war entsprechend gering und lag bei nur 0,2%. Zwei Monate nach Transduktion hatte die Expression auf 25% des am dritten Tag ermittelten Werts

abgenommen und stieg im Zeitraum von 6 Monaten wieder auf diesen Wert an [Kaplitt MG 1996]. Eine Erklärung für geringe Markergenexpression sehen Kaspar et al. in einer positiven Korrelation zwischen Dosis und Expressionsstärke. In einer Studie am porcinen Modell applizierten sie AAV 2 – LacZ Vektoren in verschiedener Dosis in die linke Koronararterie und bestimmten nachfolgend die Expression des Markergens im Myokard. Die Messungen zeigten, dass erst ab einer bestimmten Dosishöhe des Vektors der Nachweis einer Expression überhaupt möglich war. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass zu einer Transduktion des gesamten Myokards eine sehr hohe Vektordosis erforderlich ist. Ferner wurden im Versuch Histamin und HPLC eingesetzt, die gemäß der Erkenntnisse aus früheren Studien zu einer deutlichen Steigerung der Transduktion führen. Die höchste Vektordosis erzielte damit in den Versuchen von Kaspar bei direkter intrakoronarer Applikation in die linke Koronararterie eine Expressionseffizienz von 12% in der direkten Umgebung des Versorgungsgebietes [Kaspar B 2004].

Die von uns durchgeführte Studie knüpfte an die positiven Ergebnisse von Kaspar et al. an und versuchte, die Rahmenbedingungen des Versuchs zu optimieren, um bessere Transduktionsraten im gesamten kardialen Gewebe unter Verwendung von rAAV 2 zu erzielen.

### **Eigene Ergebnisse bei Verwendung rAAV 2**

Unsere Versuche haben gezeigt, dass eine Transduktion der Kardiomyozyten beim Schwein durch Verwendung von rAAV 2 grundsätzlich möglich ist. Unsere Ergebnisse stimmen damit mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. Wir konnten in allen drei Versuchen die Transduktion der rAAV 2 Vektoren durch einen positiven Nachweis transgener DNA mittels quantitativer PCR bestätigen.

Unsere Versuche zeigten jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Transduktionseffizienz in den einzelnen Sektoren des Herzens.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine geringe Spezifität der rAAV 2 Vektoren für kardiales Gewebe. Verschiedene Arbeitsgruppen sind bereits übereinstimmend zu dem Ergebnis gekommen, dass rAAV 2 kein geeigneter Vektor für eine Transduktion von speziell kardialem Gewebe darstellt [Miyagi N 2008]. Bei der *in vivo* Transduktion von Rattenmyokard kamen Miyagi et al. zu dem Ergebnis, dass rAAV 2 hier keine effiziente Transduktion ermöglicht und dass andere in der Studie getestete Vektoren

speziell zur Transduktion von kardialem Gewebe geeigneter erscheinen [Pätilä T 2006]. Li et al. ermittelten im Rahmen von kardialem *in vivo* Gentransfer bei Hamstern, dass rAAV 2 nicht geeignet sind, kardiale Blutgefäße zu transduzieren [Li J 2006]. Da die kardialen Endothelzellen der Blutgefäße aber die primäre Kontaktfläche zwischen Spenderorgan und Empfängerblut bei Herztransplantationen darstellen, liegt ein gesteigertes Interesse in der effizienten Transduktion dieser Zellen [Burdorf L 2006]. Bei intravenöser Applikation über die Schwanzvene bei Mäusen fanden Müller et al. eine geringgradig ausgeprägte Expression des transportierten Markergens und ferner die ungerichtete und unerwünschte Transduktion aller untersuchten Organe der Versuchstiere bei Verwendung von rAAV 2 [Flierl A 2005].

Im Rahmen unserer Arbeit ist es jedoch das Ziel, eine spezifische Transduktion des Herzens, ohne Transduktion der anderen Organe zu erreichen. Dies wird durch die selektive Perfusion des Herzens erreicht, welche völlig getrennt vom Kreislauf des Spenders über die *in-situ* Langendorff Perfusionsmethode erfolgt.

Versuche unserer Arbeitsgruppe zur Transduktion von kardialem Gewebe bei Ratten bei intravenöser und intrakoronarer Applikation von rAAV 2 ergaben, dass eine Transduktion möglich ist, ein Nachweis von Markergenexpression jedoch bei keinem Versuchstier erbracht werden konnte [Burdorf L 2007]. Die Arbeitsgruppen um Miyagi et al. und Palomeque et al. vergleichen verschiedene Virusvektorsysteme hinsichtlich ihrer Effizienz bei der Transduktion kardialem Gewebes bei Ratten und Schweinen und kommen zu dem Ergebnis, dass rAAV 2 kardiales Gewebe transduzieren kann, anderen getesteten Vektorsystemen in der Effizienz der Transduktion aber deutlich unterlegen ist [Levine LD 1982, Pätilä T 2006].

### **Fazit**

Wir haben im Rahmen unserer Versuche nach einem geeigneten Applikationsmodell gesucht, das eine spezifische Transduktion von kardialem Gewebe ohne Transduktion anderer Organe ermöglicht. Betrachtet man die Ergebnisse in der Literatur und die Ergebnisse unserer eigenen Versuche, so lässt sich erkennen, dass rAAV 2 in überschaubarem Ausmaß geeignet ist, unter anderem kardiales Gewebe zu transduzieren, ohne dabei jedoch organspezifisch zu sein. Fraglich ist, welcher

Vektor eine effizientere und selektivere Transduktion des Herzens ermöglicht als rAAV 2.

Die sich nun anschließenden Betrachtungen gehen über die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit hinaus. Sie sollen jedoch dennoch an dieser Stelle erwähnt werden, da sie Einblicke in neue relevante Studienergebnisse geben, die zum Zeitpunkt unserer Versuche noch nicht vorlagen. Im Rahmen einer weiteren Optimierung des *in situ* – Langendorff- Perfusionssystems, welches den zentralen Aspekt dieser Arbeit darstellt, sollte jedoch bei der Wahl eines geeigneten Vektors auf diese Ergebnisse abgestellt werden, um eine Optimierung der Transfektion auch durch die geeignete Vektorwahl zu erreichen.

### **Vergleich alternativer Vektorsysteme**

#### **Plasmid-DNA**

Grundlegend sind virale und nicht-virale Vektoren zur Transduktion geeignet. In einer Studie an Ratten konnten Inoue et al. die erfolgreiche Transfektion hepatischen Gewebes durch Plasmid DNA verzeichnen. Eine Integration der Plasmid DNA in das Genom der Zellen und damit eine Langzeitexpression konnte jedoch nicht gezeigt werden [Inoue S 2004]. Doenecke et al. nutzten daher in ihren Versuchen AAV-Plasmide. Sie zeigten damit im Rattenmodell eine Überlebenszeitverlängerung bei Herztransplantationen zwischen ein und zwei Tagen durch Langzeitexpression von MHC Klasse I Antigenen und vIL-10 in der Leber. Im Gegensatz zu rekombinanten Viren zeichnet sich Plasmid-DNA durch geringe Nebenwirkungen aus und ist einfach in großen Mengen herzustellen [Doenecke A 2006].

#### **Adenoviren**

Erfolgreich haben zahlreiche Arbeitsgruppen Adenoviren für den Gentransfer von IL-10, TGF- $\beta$ , CTLA4-Ig, VEGF und IL-17R-IgG speziell bei Herztransplantationen und zur Therapie kardialer Ischämie eingesetzt [Brauner R 1997, Kita Y 1999, Li J 2006, Pättilä T 2006]. Bei *in vivo* Studien an Hamstern unter Histamingabe erreichten Ikeda et al. eine hocheffiziente initiale Transduktion der Kardiomyozyten von 77,3% nach drei Tagen [Ikeda Y 2002]. Ähnlich hohe Transduktionraten konnten u.a. Brauner et al. und Li et al. in ihren Versuchen erzielen [Brauner R 1997, Li J 2003].

Bedeutende Nachteile bei der Verwendung von Adenoviren als Vektoren sind die fehlende Stabilität der Transduktion und das Hervorrufen heftiger Immunreaktionen beim immunkompetenten Empfänger [Gruchala M 2004, Wang A 2004]. Vergleichende Untersuchungen von Woo et al. haben gezeigt, dass die Transduktion durch Adenoviren nach sieben Tagen einen Peak erreichte und bereits nach wenigen Wochen vollständig zurückgegangen war [Nakai H 2005]. Ferner erschwert ihre Partikelgröße den Adenoviren, die Blutgefäße ungehindert zu verlassen und das umliegende Gewebe zu transduzieren. Daher betrachten Li et al. die intrakoronare Gabe von Adenoviren als keine geeignete Applikationsform [Li J 2003].

### **AAV 1-7**

Eine Alternative stellen aufgrund ihrer fehlenden Pathogenität und stabilen Expression die adenoassoziierten Viren dar. Aktuelle Studien legen nahe, dass es andere AAV Serotypen gibt, die den rAAV 2 hinsichtlich ihrer kardialen Transduktionseffizienz und – spezifität überlegen sind. Eine spezifische kardiale Transduktionsfähigkeit weisen gemäß publizierten Studien die Serotypen AAV 1 und AAV 3-9 auf.

Müller et al. haben in ihren Versuchen die kardiale Transduktion der AAV Serotypen 1 - 6 am Herz nach i.m. Applikation in Mäuseherzen untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass AAV 2 und AAV 3 eine ähnlich niedrige kardiale Transduktion aufwiesen. Bei Verwendung von AAV 1, 4, 5 und 6 konnten jedoch signifikant höhere Werte erreicht werden [Müller O 2006]. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Grimm et al. in einer weiteren Studie [Grimm D 2003]. Hinsichtlich der Transduktionseffizienz am Herzmuskel erscheint AAV 1 bei Vergleich zahlreicher Studien den Vektoren AAV 2-6 überlegen [Wang Z 2005, Du L 2004, Palomque J 2007]. In den Studien von Müller et al. und Grimm et al. zeigte sich jedoch für alle Vektoren AAV 1-6 nachteilig, dass die verwendeten Vektoren nur eine geringe Gewebespezifität aufwiesen und neben dem Herzmuskel unselektiv zahlreiche weitere Organe transduzieren.

Die Entscheidung zugunsten der Verwendung von AAV2 als Vektorsystem in unserer Versuchsreihe wurde zu einem Zeitpunkt von uns getroffen, zu dem AAV2 vor dem Hintergrund der zum gegenwärtigen Zeitpunkt vorliegenden Forschungsergebnisse als überlegenes Vektorsystem zur Transfektion am porcinen Myokard erschien. Neuere Studienergebnisse haben wie in diesem Abschnitt dargestellt zu einer neuen abweichenden Betrachtung geführt. AAV2 erscheint nach neusten

Forschungsergebnissen anderen Vektorsystemen, die in der jüngsten Vergangenheit entwickelt worden sind, hinsichtlich seiner Transduktionseffizienz unterlegen.

### **AAV 8**

Aufgrund seiner Kardioselektivität erscheint der Serotypen AAV 8 besonders geeignet zur Transduktion des Herzmuskels [Wang Z 2005, Nakai H 2005]. Palomque et al. führten im Rattenmodell *in vivo* bei intramuskulärer Applikation in das Myokard einen Vergleich der Transduktionseffizienz der Serotypen AAV 1-8 durch. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass AAV 8 von allen Vektoren die höchste myokardiale Effizienz aufwies. Ferner stellte die Arbeitsgruppe fest, dass AAV 8 keine Aktivität präformierter Antikörper bei der Ratte hervorruft und dass bis Studienende nach 24 Wochen im Gegensatz zu den anderen Vektoren die Transduktion bei AAV8 weiter anstieg [Palomque J 2007]. Wang et al. zeigten in ihren Studien an neonatalen Mäusen und Hamstern, dass AAV 8 bei intraperitonealer und intravenöser Gabe am besten geeignet ist, die Gefäßbarriere zu überwinden und den Herzmuskel effizient und stabil zu transduzieren. Andere Organe wie Leber, Lunge, Niere und Milz zeigten wenige Tage nach Applikation von AAV 8 ebenfalls eine Transduktion. Die Transduktion weiterer Gewebe wie Neuronen, Gliazellen, glatten Muskelzellen und Skelettmuskulatur wird von anderen Autoren beschrieben [Inagaki K 2006]. Wang et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Transduktion anderer Organe im Gegensatz zu der Transduktion des Herzmuskels nicht stabil war und nach 2 Monaten nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Hingegen nahm die Transduktion des Herzmuskels über einen Zeitraum von 5 Monaten weiter zu. Die Autoren heben besonders hervor, dass sie mit AAV 8 eine hocheffiziente Transduktion ohne Einsatz weitere Hilfsmittel wie Hochdruckunterstützung oder permeabilitätssteigernder Substanzen wie Histamin oder VEGF erreichen konnten [Wang Z 2005]. AAV 8 zeigt eine Transduktionsaffinität zum Epikard [Du L 2004]. AAV 8 erscheint damit grundlegend geeignet, gemäß unseren Vorgaben effizient den Herzmuskel zu transduzieren.

**AAV 9**

Aktuelle Untersuchungen von Miyagi et al. an Ratten und Schweinen haben ergeben, dass AAV 9 hinsichtlich der kardialen Transduktion geeignet und dem bereits sehr effizienten AAV 8 überlegen ist [Müller C 2008]. Damit stimmen sie mit den Ergebnissen der Studien von Inagaki et al., Sarkar et al. und Pacak et al. überein [Mc Carty D 2001, Inagaki K 2006, Sarkar R 2006]. In der Arbeitsgruppe von Miyagi et al. wurde AAV 9 in verschiedenen Dosierungen über ein kaltes *ex vivo* Perfusionssystem appliziert. Die Gruppe erreichte mit der höchsten Dosis von  $2 \times 10^{12}$  Virusgenome/ml eine myokardiale Transduktion von 71 %. Die Transduktion zeigte sich stabil über einen Zeitraum von drei Monaten. Ferner war im Gegensatz zu den Versuchen mit AAV 8 keine Transduktion anderer Organe nachweisbar [Miyagi N 2008]. Inagaki et al. verglichen die Transduktionseffizienz von AAV 8 und AAV 9 hinsichtlich Variation der Vektordosis und Spezifität mit besonderer Betrachtung der kardialen Transduktion miteinander. Sie stellten fest, dass AAV 9 und AAV 8 in vielen grundlegenden Eigenschaften wie Gewebeaffinität, Robustheit und Transduktionsfähigkeit auch bei systemischer Applikation übereinstimmen. Als grundlegender Unterschied stellte sich jedoch heraus, dass die kardiale Transduktion von AAV 9 der von AAV 8 besonders im niedrigen Dosisbereich weit überlegen ist. Bei Applikation von  $1 \times 10^{11}$  Partikeln transduziert AAV 9 80% des Myokards. Damit können im gleichen Dosisbereich mit AAV 8 fünfmal bis zehnmal mehr Zellen transduziert werden. Zur gentherapeutischen Anwendung ist gemäß den Autoren eine Transduktion von 32% der Kardiomyozyten ausreichend. Diese kann mit einer Vektormenge AAV 9 erreicht werden, bei welcher mit Ausnahme der Leber keine andere Organtransduktion im Versuch nachgewiesen werden konnte. Ferner ist AAV 9 in seiner Fähigkeit überlegen, Endothelzellbarrieren zu überwinden [Inagaki K 2006]. Übereinstimmend haben Studien von Pacak et al. an Primaten *in vivo* gezeigt, dass AAV 9 eine deutliche Präferenz für die Transduktion kardialen Gewebes zeigt. Der Vektor kann bei systemischer Applikation adultes Myokard effizient transduzieren. Ferner traten im Versuch zu keinem Zeitpunkt Anzeichen für eine Erkrankung der Versuchstiere oder Entzündung der transduzierten Gewebe auf [Pacak CA 2006].

### **Fazit**

Wir haben in unseren Versuchen rAAV 2 verwendet. Als Ergebnis konnten wir feststellen, dass eine kardiale Transduktion durch diesen Vektor möglich ist. Das Ausmaß der Transduktion war jedoch im gesamten Herzmuskel sehr heterogen.

Betrachtet man unsere Ergebnisse im Detail und zieht die Ergebnisse der anderen in diesem Abschnitt diskutierten Studien heran, so zeigt sich, dass es andere Vektorsysteme gibt, die AAV2 in der Effizienz der Transduktion des porcinen Myokards überlegen scheinen. Besonders sind in diesem Zusammenhang AAV8 und AAV9 hervorzuheben. Zu dem Zeitpunkt der Wahl eines geeigneten Vektorsystems für die Verwendung im Rahmen der von uns entwickelten *in situ* Langendorff-Perfusionsmethode lagen diese Erkenntnisse noch nicht vor. Daher entschieden wir uns zum damaligen Zeitpunkt für den zu dieser Zeit als effizient hinsichtlich seiner Transduktionseffizienz bewerteten AAV2.

Gegenwärtig erscheint es jedoch möglich, dass wir mit einem Austausch des AAV 2 Vektors gegen eine geringe Dosis des Vektors AAV 9 im Rahmen unserer *in situ* Langendorff-Perfusionsmethode eine weitaus effizientere und spezifischere kardiale Transduktion erreichen könnten. Bei einer weiteren Optimierung unserer *in situ* – Langendorff – Perfusionsmethode ist daher auf die Verwendung dieser Vektoren abzustellen.



## DISKUSSION

Serotyp	Spezies	Ergebnis	Autor/ Jahr
AAV 1	Ratte <i>in vivo</i>	Keine präformierten Antikörper Hohe Transduktion (DNA, LacZ Kopien), Plateau nach 4 Wochen	Palomque J 2007
	Maus <i>in vivo</i>	Resultat nach intramyokardialer Injektion nach 1 Jahr: effizienter als AAV2-5	Du L 2004
		2. Monat: hohe Transduktion nach intra-peritonealer Applikation	Wang Z 2005
		Nicht effizient beim Überwinden Barriere Blutgefäße	Wang Z 2005
AAV 3 AAV 4	Maus/Human <i>in vitro</i> Maus <i>in vivo</i>	Geringe Transfektion Herzmuskel Geringe Genexpression Andere Organe teils gut transduziert	Müller O 2006 Du L 2004 Palomque J 2007
AAV 5	Ratte <i>in vivo</i>	Langsame initiale Transduktion Nach 3.Mo ausreichende Transduktion Myokard erreicht Transduktionseffizienz vergleichbar gering mit AAV2	Palomque J 2007
AAV 6	Ratte <i>in vivo</i>	Keine präformierten Antikörper Hohe Transduktion Myokard (DNA, LacZ Kopien), Plateau nach 4 Wochen	Palomque J 2007
	Maus <i>in vivo</i>	2. Monat: hohe Transduktion nach intraperitonealer Applikation	Wang Z 2005
		Bei kardialer Transduktion AAV2 überlegen	Du L 2004 Wang Z 2005
		Nicht effizient beim Überwinden Barriere Blutgefäße	Wang Z 2005
AAV 7	Ratte <i>in vivo</i>	Langsame initiale Transduktion Nach 3.Mo ausreichende Transduktion Myokard erreicht Transduktionseffizienz vergleichbar gering mit AAV2	Palomque J 2007
	Maus <i>in vivo</i>	Transduziert effizient den Herzmuskel	Wang Z 2005
AAV 8	Ratte <i>in vivo</i>	Keine präformierten Antikörper Höhere Transduktionseffizienz als AAV 1-7, Stabile Transduktion über sechs Monate	Palomque J 2007
	Maus <i>in vivo</i>	Proteinexpression: gegenüber AAV 1,2,5,6 überlegen	Wang Z 2005 Miyagi N 2008
		Hocheffizient beim Überwinden der Endothelzellen der Blutgefäße, Affinität zu Epikard Keine permeabilitätssteigernden Substanzen nötig (Histamin) Stabile Transduktion über fünf Monate	Wang Z 2008 Inagaki K 2006
	Maus <i>in vivo</i>	Unselektive Transduktion anderer Organe über einen Zeitraum von zwei Monaten	Wang Z 2005
AAV 9	Maus <i>in vivo</i>	Hocheffizient beim Überwinden der Endothelzellen der Blutgefäße Transduziert Organe bei extravaskularer Applikation Hohe Transduktion ausschließlich Kardiomyozyten im Niedrigdosisbereich	Inagaki K 2006
	Ratte <i>in vivo</i>	Keine Transduktion anderer Organe Stabile Transduktion über drei Monate Hocheffiziente Transduktion von 71,74% der Kardiomyozyten ohne Histaminzugabe	Miyagi N 2008

**Abbildung 29:** Überlegenheit AAV 9 gegenüber AAV 1-8 beim Vergleich aktueller Studien zu kardialer Transduktion, rosa unterlegt sind Versuche mit ineffizienter Transduktion, türkis unterlegt Versuche mit effizienter Transduktion

## 4.2 Fazit und Ausblick

Unsere Studie hatte die Entwicklung einer völlig neuartigen Perfusionsmethode zum Ziel, die die extrakorporale Perfusion und Stabilisation eines schlagenden Herzens unter physiologischen Bedingungen ermöglicht. Die Funktionalität des Herzens sollte dabei erhalten bleiben. Dieses Modell sollte die optimierten Voraussetzungen für eine effiziente, stabile und homogene Transduktion von porcinen kardialem Gewebe durch den Einsatz von rAAV 2 als Vektorsystem bieten. Die Transduktionseffizienz haben wir abschließend durch den Nachweis von Markergenen und Proteinexpression in Organproben quantifiziert.

Die klinische Relevanz für die Entwicklung einer solchen Methode ergibt sich aus der Notwendigkeit, Transplantatabstoßungen und Transplantatversagen nach Herz-Transplantationen zu reduzieren. Wir suchten im Rahmen unserer Perfusionsmethode nach einem gentherapeutischen Lösungsansatz. Zu klären bleibt, ob das von uns entwickelte Modell erfolgreich im klinischen Bereich der Gentherapie eingesetzt werden kann.

Die entwickelte *in situ* - Langendorff - Perfusionsmethode erwies sich in unseren Versuchen als ausgesprochen geeignet, die an dieses Verfahren gestellten Zielsetzungen zu erreichen. Sie ermöglichte eine Versorgung des Transplantats unter Beibehaltung der physiologischen Bedingungen über einen Zeitraum von mindestens fünfzig Minuten. Ferner war sie geeignet, die optimalen Bedingungen für eine hochdosierte Vektorapplikation am porcinen Myokard *in vivo* zu schaffen.

RAAV 2 hingegen erwies sich hingegen nicht als optimales Vektorsystem für eine effiziente Transduktion am kardialen Gewebe. Unsere Versuche haben gezeigt, dass neben einer inhomogenen Markergenverteilung nur in einem der Versuche eine Transgenexpression erreicht werden konnte.

Aktuellen Studien lassen erkennen, dass speziell rAAV 9 weitaus besser geeignet erscheint, kardiales Gewebe zu transduzieren. Bei Verwendung dieses Vektors könnte bereits in geringer Dosierung eine hocheffiziente kardiale Transduktion möglich sein. Ferner zeigt sich, dass bei Verwendung von rAAV9 eine Transduktion anderer Organe nicht beobachtet werden konnte.

Die neuartige *in situ* - Langendorff - Perfusionsmethode ist damit als sehr positiv zu bewerten. In weiteren Studien sollte sie weiter optimiert werden. In diesem Zusammenhang ist vor allem die Verwendung von rAAV9 als geeignetes Vektorsystem zu verifizieren. Ferner sind Studien mit einer größeren Grundgesamtheit anzustreben, um statistisch aussagekräftigere Ergebnisse zu generieren.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Aufbau und Ziel der Studie

#### 1. Ziel:

**Etablierung eines Perfusionsmodells, dass die extrakorporale Stabilisation eines schlagenden Herzens unter physiologischen Bedingungen ermöglicht**

Dieses Modell musste

- eine lange Applikationszeit des Vektors
- geringe Vektorverdünnung und hohe Vektorkonzentration
- Physiologische Bedingungen
- eine Funktionalität des fortwährend schlagenden Herzens ermöglichen.

#### 2. Ziel:

**Die Bestimmung der Effizienz und Selektivität der Transduktion eines porcinen Herzens im Rahmen dieses Modells bei Verwendung von rAAV 2**

Im vorliegenden porcinen Modell wurden heterotope abdominelle Herztransplantationen an zehn Landschweinen vorgenommen. Die Herzen wurden vor Ischämie und Transplantation über einen Zeitraum von mindestens fünfzig Minuten schlagend unter physiologischen Bedingungen über ein Perfusionssystem versorgt. Die Herzen von drei Schweinen wurden an diesem System ferner mit einem rAAV 2 basierten Vektorsystem transduziert.

Nach dem kardioplegischen Herzstillstand wurden die Herzen transplantiert und schließlich reperfundiert. Nach 21-tägiger Überlebenszeit erfolgte die Explantation und Analyse der Transplantate und andere Organe des Empfängertieres mit der Fragestellung nach DNA Transfer und Proteinexpression.

### 5.2 Methodik

#### Perfusionsmodell

Im Rahmen der Vorversuche modifizierten wir eine bereits in der Gruppe entwickelte Perfusionsmethode. Zu Beginn der Versuchsreihe konnten wir mit diesem System

ein schlagendes Herz *in situ* über einen Zeitraum von fünfzig Minuten vom Kreislauf des Spendertieres getrennt unter physiologischen Bedingungen stabilisieren.

### **Transduktion: Versuchsablauf**

Nach der Narkose erfolgte die Katheterisierung der Vena jugularis und Arteria carotis externa. Das intraoperatives Monitoring bestand aus EKG, invasiver Blutdruckmessung und Temperaturmessung. Zusätzlich führten wir Blutgasanalysen durch. Nach Throakotomie und Eröffnung des Perikards wurden die zu- und abführenden Gefäße des Herzens präpariert und Fäden zur späteren Ligatur der Vena cava inferior et superior vorgelegt. Der Truncus pulmonalis und die Aorta ascendens wurden mit Tabaksbeutelnähten versehen und kanüliert. Durch diese Vorbereitung konnte das Herz schlagend an das *in situ* - Langendorff - Perfusionssystem angeschlossen werden. Das Herz schlug somit völlig isoliert vom Kreislauf des Spenders weiter. Die Perfusion wurde über 50 Minuten aufrechterhalten. Den Herzen der Versuchsgruppe wurden dabei die Vektoren ( $2 \times 10^{12}$  und  $2,3 \times 10^{13}$  Vektorpartikel) über den zuführenden aortalen Schenkel appliziert. Die Vektorperfusion betrug mindestens dreißig Minuten.

Die Perfusion wurde durch Applikation kardioplegischer Bretschneiderlösung über die Aortenwurzel beendet. Das Herz wurde explantiert, Venae cavae sowie Aorta ascendens und Truncus pulmonalis präpariert und das Herz in Kochsalzlösung bei 4°C gelagert. Nach Vorbereitung des Empfängers erfolgte die Eröffnung des Abdomens und Präparation und Ausklemmung der Aorta abdominalis und Vena cava inferior. Die Implantation erfolgte über die Anastomose der Vena cava inferior (Empfänger) mit dem Truncus pulmonalis (Spender) und der Aorta abdominalis (Empfänger) mit der Aorta ascendens (Spender). Nach dem Öffnen der Satinsky-Klemmen wurde das Transplantat reperfundiert. Bereits kurze Zeit später nahm das Herz seine Kontraktion auf, bei Bedarf unterstützt durch interne Defibrillation. Abschließend erfolgte ein mehrschichtiger Wundverschluss.

Nach 21 tägiger Überlebenszeit der Versuchstiere wurden die Transplantate und die Organe Herz, Niere, Leber, Lunge und Milz des Empfängers entnommen und auf den Gehalt von transgener DNA sowie der Expression der verwendeten Markergene mittels quantitativer PCR und Färbung untersucht.

### 5.3 Ergebnisse

#### Ad 1. Ziel:

**Etablierung eines Perfusionsmodells, das die extrakorporale Stabilisation eines schlagenden Herzens unter physiologischen Bedingungen ermöglicht**

#### Perfusionsmodell

Die Analyse der explantierten Transplantate und die Beobachtungen im Versuch ergaben, dass wir mit dem *in situ* - Langendorff Perfusionsmodell eine extrakorporale Perfusion des Herzens erreichen konnten. Das Herz schlug dabei ohne Unterbrechung weiter. Die Perfusionszeit betrug mindestens 50 Minuten und maximal 72 Minuten. Das System war geeignet, während der Perfusion physiologische Bedingungen aufrecht zu erhalten. Großflächige Gewebeschädigung oder Funktionseinschränkung des Transplantats konnten nicht beobachtet werden.

#### Funktionalität des Transplantats

Die Gesamtschämiezeit lag zwischen 66 Minuten und 144 Minuten. Unabhängig von Ischämie- und Perfusionszeit nahmen neun von zehn Herzen - gegebenenfalls durch Defibrillation unterstützt – eine normale eigenständige Kontraktion auf.

#### Ad 2. Ziel:

**Die Bestimmung der Effizienz und Selektivität der Transduktion eines porcinen Herzens im Rahmen dieses Modells bei Verwendung von rAAV 2**

#### Transduktion

- In allen drei transduzierten Herzen konnte erfolgreich der Nachweis transgener DNA erbracht werden.
- Die Expression des Markergens Luciferase wurde nur bei einem Tier gezeigt, bei welchem im Rahmen der Perfusion Histamin zugeführt worden war.
- In zwei Versuchen zeigte sich eine höhere Transduktion des Endokards als des Epikards
- In zwei Versuchen zeigte sich eine höhere Transduktion des rechten als des linken Ventrikels; alle Versuche zeigten eine höhere Transduktion des Septums als des linken Ventrikels.

## 6. Literaturverzeichnis

Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS (2001) Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness, *Nature Genetics*, Volume 28, Number 1, 92-95.

Baba HA, Grabellus F (2002) Pathologie der Herztransplantation, *Zeitschrift für Herz, Thorax- und Gefäßchirurgie*, Volume 16, Number 1, Steinkopff Verlag, 27-31.

Bagley I, Jacomini J (2003) Gene Therapy progress and prospects: Gene therapy in organ transplantation, *Gene Therapy*, 10: 605-611.

Bartlett JS, Xiao X, Samulski RJ (1996) Adeno-associated Virus Vectors for Gene Transfer, *Protocols for Gene Transfer in Neuroscience: Towards Gene Therapy of Neurological Disorders*. John Wiley & Sons Ltd., 115-127.

Bartlett JS, Rose Wilcher, Samulski RJ (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors, *Journal of Virology*, Volume 74, 2777-2785.

Beck SE, Jones LA, Chesnut K, Walsh SM, (1999) Repeated delivery of adeno-associated virus vectors to the rabbit airway, *Journal of Virology*, Volume 73, Number 11, 9446-9455.

Bein T, Kuhr LP, Krämer BK, von Kramolin M, Anthuber M (2003) Hirntod und Organspende: Einstellung und psychische Belastung des Personals von Intensivstationen, *Anästhesiologie und Intensivmedizin*, Volume 44, 429-434.

Berns KI, Adler S (1972) Separation of two types of adeno-associated virus particles containing complementary polynucleotide chains, *Journal of Virology*, Volume 9, 394-907.

Berns KI (1990) Parvovirus replication, *Microbiology Review*, Volume 54, 316-29.

Berns KI, Giraud C (1996) Biology of adeno-associated virus, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Volume 218, 1 – 23.

Braun WE (2003) Renal transplantation, basic concepts and evolution of therapy, *Journal of Clinical Apheresis*, Volume 18, 141-152.

Brauner R, Nonoyama M, Laks H (1997) Intracoronary adenovirus-mediated transfer of immunosuppressive cytokine genes prolongs allograft survival, *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery*, 114:923-933.

Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (2008) Organspenden und Wartelisten in den Ländern von Eurotransplant (Stand am 31.12.2007), <http://www.organspende-info.de> (letzte Zugriff 20.12.2008)

Burdorf L, Schuhmann N, Postrach J, Thein E, Hallek M, Reichart (2006) In vivo AAV mediated gene transfer to cardiac endothelial cells is possible but species-specific, *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, Volume 54, 1.

Burdorf L, Schuhmann N, Postrach J, Thein E (2007) AAV-mediated gene transfer to cardiac cells in a heterotopic rat heart transplantation model, *Transplantation Proceedings*, Volume 39, Nummer 2, 567-568.

Carter BJ (2005) Adeno-associated virus vectors in clinical trials, *Human Gene Therapy*, Volume 16, Number 5, 541-550.

Chalfie M, Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene-Expression, *Science*, Volume 263, 802-805.

Chalfie M, Kain S (1998) *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols*, Wiley-Liss, New York, 45-75.



Chen Z, Lu L, Li J, Xiao X, Fung JJ, Qian S (2003) Prolonged survival of heart allografts transduced with AAV-CTLA4lg, *Microsurgery*, Volume 23, Number 5, 489-493.

Chirmule N, Xiao W, Truneh A, Schnell MA (2000) Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle, *Journal of Virology*, Volume 74, Number 5, 2420-2425.

Chu Y, Weintraub NL, Heistad DD (2007) Gene therapy and cardiovascular diseases, *Contemporary cardiology; Principles of molecular cardiology*, Runge and Petterson, New York, 57-69

Cormier MJ, Hori K, Anderson JM (1974) Bioluminescence in Coelenterates, *Biochimica Et Biophysica Acta*, Volume 346, 137-164.

Costanzo-Nordin MR, Grady KL, Johnson MR (1990) Long-term effects of cyclosporine-based immunosuppression in cardiac transplantation: the Loyola experience, *Transplantation proceedings*, Elsevier Science Inc., Volume 22, 6-11.

Dai Z, Lakkis FG (1999) The role of cytokines, CTLA-4 and costimulation in transplant tolerance and rejection, *Current Opinion in Immunology*, 11: 504-508.

Danos O (2008) AAV Vektors for RNA-based Modulation of gene expression, *Gene Therapy*, Volume 15, 864-869.

De B, Heguy A, Leopold PL, Wasif N, Korst RJ, Hackett NR, Crystal RG (2004) Intrapleural administration of a serotype 5 adeno-associated virus coding for alpha1-antitrypsin mediates persistent, high lung and serum levels of alpha1-antitrypsin, *Molecular Therapie*, Volume 10, Number 6, 1003-1010.

Dhein S (2007) The Langendorff Heart, in: *Practical methods in cardiovascular research*, Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, 155-172.

Doenecke A , Frank E, Scherer MN, Geissler EK, Schlitt HJ (2008) HTx-Überlebenszeitverlängerung durch Langzeitexpression löslicher Spender-MHC Klasse I-Antigene und viralem IL-10 in der Leber durch AAV-Plasmid-vermittelten Gentransfer im Rattenmodell, Meeting Abstract, 125. Kongress der deutschen Gesellschaft für Chirurgie <http://www.egms.de/en/meetings/dgch2008/08dgch433.shtml> (Zugriff 08/2008) Berlin.

DSO (2008) Herztransplantation, Deutsche Stiftung Organtransplantation, <http://www.dso.de/> (letzte Zugriff 20.12.2008)

Du L, Kido M, Rabinowitz JE, Samulski RJ, Jamieson SW (2004) Differential myocardial gene delivery by recombinant serotype-specific adeno-associated viral vectors, *Molecular Therapy*, 10: 604-608..

Duan D, Yue Y, Engelhardt J F (2001) Expanding AAV packing capacity with trans-splicing or overlapping vectors: A quantitative comparison, *Molekular Therapy*, Volume 4, 383-391.

Eurotransplant International Foundation (2008) Allgemeine Informationen Herztransplantation, <http://www.eurotransplant.nl/?id=herz> (letzte Zugriff 20.12.2008)

Fechner H, Sipo I, Wetsremann D, Pinkert S, Wang X, Suckau L, Kurreck J, Zeichhardt H, Müller O, Vetter R, Erdmann V, Tschöpe C, Poller W (2008) Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV 9 vector improves cardiac function in cocksackievirus B3 cardiomyopathie, *Journal of Molecular Medicine*, Volume 86, Nummer 6, Springer Verlag, Berlin/ Heidelberg.

Fiandaca M, Forsayeth J, Bankiewicz K (2008) Current status of gene therapy trials for Parkinson´s disease, *Experimental Neurology*, Volume 209, Number 1, 51-57.

Flierl A, Chen Y, Coskun PE, Samulski RJ, Wallace D C (2005) Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart / muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse, *Gene Therapy*, Volume 12, Number 7, 570-578.

Flint SJ, LW Enquist, VR Rancaniello (2003) principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses, ASM Press, Washington D.C., 3-23.

Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J (2002) Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy, PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Volume 99, Number 18, 11854-11859.

Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J (2006) High level transgene expression in non human primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes, Journal of virology, Volume 80, 6192-6194.

Gould DS, Auchincloss H (1999) Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection, Immunology Today, Volume 20, 77-82.

Granja CB, Salazar M, Yunis EJ (1996) Population genetics and human leucocyte antigen polymorphism, Transplant Biology, Lippincott-Raven, Philadelphia, 311-326..

Grimm D, Zhou S, Nakai H, Thomas CE, Storm TA, Fuess S (2003) Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy, Blood, 102: 2412-2419.

Gruchala M, Bhardwaj S, Pajusola K (2004) Gene transfer into rabbit arteries with adeno-associated virus and adenovirus vectors, The Journal of Gene Medicine, 6: 545.

Hastings JW, Morin JG (1969) Comparative Biochemistry of Calcium-Activated Photoproteins from Ctenophore, Mnemiopsis and Coelenterates Aequorea, Obelia, Pelagia and Renilla, Biological Bulletin, Volume 137, 402ff..

Hayashi S, Leu D, Yamii Y, Mei G, Takagi H, Nakao A (2005) Effect of adenovirus-mediated transfer of the CTLA4 gene in hamster-to-rat xenotransplantation, Transplantation, 80: 494-499.

Hernandez YJ (1999) Latent adeno-associated virus infection elicits humoral but not cell-mediated immune responses in a nonhuman primate model, *Journal of Virology*, Volume 73, Number 10, 8549-8558.

Hoshijima M, Ikeda Y, Iwanaga Y (2002) Chronic suppression of heart failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery, *Nature Medicine*, Volume 8, Number 8, 864-871.

Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM (2000) The registry of the international society for heart and lung transplantation, seventeenth official report 2000, *Heart Lung Transplant.*, Volume 19, 909-931.

Hummel M (2004) Anwendung von Everolimus nach Herztransplantation, *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, Volume 18, Steinkopff, 65-70.

Ikeda Y, Gu Y, Iwanaga Y, Hoshijima M, Oh SS, Giordana FJ, Chen J, Nigro V, Peterson KL, Chien KR, Ross J (2002) Restoration of deficient membrane proteins in the cardiomyopathic hamster by in vivo cardiac gene transfer, *Circulation, Journal of the American Heart Association*, Volume 105, Number 4, 502-508.

Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA, Nakai H (2006) Robust Systemic Transduction with AAV 9 Vectors in Mice: Efficient Global Cardiac Gene Transfer Superior to That of AAV 8, *Molecular Therapy*, Volume 14, 45-53

Inoue S, Hakamata Y, Kaneko M, Kobayashi E (2004) Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA: application to the rat liver, *Transplantation* 77: 997-1003.

Iwatate M, Gu Y, Dieterle T, Iwanaga Y, Peterson KL (2003) In vivo high-efficiency transcortical gene delivery and Cre-LoxP gene switching in the adult mouse heart, *Gene Therapy*, Volume 10, 1814-1820.

Jayandharan GR, Zhong L, Li B, Kachniarz B (2008) Strategies for improving the transduction efficiency of single-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and vivo, *Gene Therapy*, advance online publication, 1-7.

Jooss K, Yang Y, Fisher K J, Wilson J M (1998) Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers, *Journal of Virology*, Volume 72, 4212-4223.

Kaplitt MG, Xiao X, Samulski R J, Li J, Ojamaa K, Klein I L (1996) Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector, *The annals of thoracic surgery*, volume 62, Number 6, 1669 -1676.

Karow T, Lang-Roth R (2008) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Thomas Karow Verlag, 16. Auflage, 812-845.

Kaspar B, Roth DM, Lai NC, Drumm JD, Erickson DA, McKirnan MD, Hammond HK (2004) Myocardial gene transfer and long-term expression following intracoronary delivery of adeno – associated virus, *The Journal of Gene Medicine*, Volume 7, 316-324.

Kay MA, Manno CS, Ragni MV (2000) Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector, *Nature Genetics*, Volume 24, Number 3, 257-261.

Kindermann W (2008) *Herztransplantation, Sportkardiologie*, 2. überarbeitete Auflage, Steinkopff, 303-315.

Kita Y, Li XK, Ohba M (1999) Prolonged cardiac allograft survival in rats systemically injected adenoviral vectors containing the CTLA4lg gene, *Transplantation*, 68: 758-766.

Kieselbach B (2004) *Molekulare Effekte der Immunmodulation mit einem anti-CD4-Antikörper*, Dissertation, Humboldt – Universität Berlin, 8-24.

Kotin RM, Linden RM, Berns KI (1991) Site-specific integration by adeno-associated virus, PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences, Volume 87, 2211-2215.

Klotz S, Loehner A, Drees G, Scheld HH (2006) Chirurgische Therapie der Herzinsuffizienz, State of the art 2006, Herz, Volume 31, Number 5, Urban & Vogel, 445.

Knippers R (2006) Molekulare Genetik, 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, 89-140.

Kröger MJ (2004) Therapiestrategien der medikamentösen Immunsuppression nach thorakaler Transplantation, Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Volume 18, Steinkopff, 16-18.

Kück U (2006) Reportergene, in: Praktikum der Molekulargenetik, 1. Auflage, Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, 323-348.

Kügler S (2007) RNAi-Targeting In vivo RNA-Interferenz mittels viraler Vektoren, Biospektrum, Volume 3, 268-271.

Kwon I, Schaffer DV (2008) Designer gene delivery vectors: molecular engineering and evolution of adeno-associated viral vectors for enhanced gene transfer, Pharmaceutical Research, Volume 25, No 3, 489-499.

Lauchart W, Gubernatis G, Blümke M (2006) Transplantationsmedizin, Steinkopff, 53-50.

Levine LD, Ward WW (1982) Isolation and Characterization of a Photoprotein, Phialidin, and a Spectrally Unique Green-Fluorescent Protein from the Bioluminescent Jellyfish *Phialidium-gregarium*, Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology, Volume 72, 77-85.

Li J, Simeoni E, Fleury A (2006) Gene transfer of soluble interleukin-17 receptor prolongs cardiac allograft survival in a rat model, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 29: 779-783.

Li J, Qian S, Chen Z, Zhu T, Xiao X (2003) Efficient and long term intracardiac gene transfer in d sarcoglycan-deficiency hamster by adeno-associated virus – 2 vectors, *Gene Therapy*, Volume 10, Number 21, 1807-1813.

Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, Larson PJ, Herzog RW, Arruda VR, Tai SJ, Ragni MV, Thompson A, Ozelo M, Couto LB, Leonard DGB, Johnson FA, McClelland A, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, Kay MA, High KA, Glader B (2003) AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B, *Blood* 101 Volume 8, 2963-2972.

Mason J (1990) Renal side – effects of cyclosporine, *Transplantation proceedings*, Volume 22, Elsevier Science Inc., 1280-1283.

Mc Carty, Monahan PE, Samulski RJ (2001) Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis, *Gene Therapy*, Volume 8, 1248-1254.

Mauer D, Gabel. S. Eisenreich. H. Smit (2003), *Organspende in Deutschland, Intensivmedizin und Notfallmedizin*, Volume 40, Number 7, Steinkopff, 2-12.

Melo LG, Veress AT, Ackermann U (2002) Gene Therapy Strategy for Long-Term myocardial protection using adeno- associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene, *Circulation*, Volume 105, Number 5, 602-607.

Miyagi N, Rao VP, Ricci D, Du Z, Byrne GW, Bailey KR, Nakai H, Russel SJ, Mc Gregor CGA (2008) Efficient and durable gene transfer to transplanted heart using adeno-associated virus 9 vector, *Experimental Transplantation*, Volume 27, Number 5, 554-560.

Montenarh M (2007) Replikation und Gentechnik, 8. Ausgabe, Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, 220-251.

Morin JG, Hastings JW (1971) Energy Transfer in a Bioluminescent System., Journal of Cellular Physiology, Volume 77, 3 ff.

Müller C, Flotte TR (2008) Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors, Gene Therapy, 15, 858-863.

Müller O, Leuchs B, Pleger ST, Grimm D, Franz WM, Katus H, Kleinschmidt JA (2006) Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors, Cardiovascular Research, Volume 70, 70-78.

Muzycka N (1992) Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells, Current Topics in Microbiology and Immunology Volume 158, 97-129.

Nakai H, Storm TA, Kay MA (2000) Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors. Nature Biotechnology, Volume 18, Number 5, 527-532.

Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA (2005) Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice, 79: 214-224.

NGFN, Herz-Kreislaufnetz (2008) Langendorff-Herz, Koordinationsbüro Herz-Kreislaufnetz, Nationale Genomforschungsnetz Universitätsklinik Heidelberg, <http://www.herzKreislaufnetz.de/index.php?id=7&L=0%2Fi...r%2Fsafeontxt%3F%3F&BF=0> (letzter Zugriff 20.12.2008)

Nishikawa M, Huang L (2001) Nonviral vectors in the new millennium: deliver barriers in gene transfer, Human Gene Therapy, 12: 861-870.

Oi K, Davis WR, Tazelaar HD (2006) Ex vivo hypothermic recirculatory adenoviral gene transfer to the transplanted pig heart, Journal of gene medicine, 8: 795-803.



Pacak CA, Cresawn KO (2006) Rekombinant adeno associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo, *Circ Res*: e3 – e9.

Palomque J, Chemaly ER, Colosi P, Wellmann JA, Zhou S, del Monte F, Hajjar RJ (2007) Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo, *Gene Therapy*, 14, 989-997.

Parks WP, Boucher DW, Melnick JL (1970) Seroepidemiological and ecological studies of the adeno-associated satellite viruses, *Infection and Immunity*, Volume 2, 716-722.

Pättilä T, Ikonen T, Rutanen J (2006) Vascular endothelial growth factor C-induced collateral formation in a model of myocardial ischemia, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 25: 206-213.

Pelligrini C, O'Brien T, Jeppson A, Fitzpatrick LA, Yap J, Tazelaar HD, McGregor C (1998) Influence of temperature on adenovirus-mediated gene transfer, *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 13: 599-603.

Pinkenburg O (2004) Gene transfer and regulation using adeno-associated virus vectors, *Journal of Virological Methods*. 2004;120(1):119-22.

Plattner H, Hentschel J (2006) Taschenlehrbuch der Zytologie, Thieme, 3. Aufl., Stuttgart, 213-241.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG (1992) Primary Structure of the Aequorea-Victoria Green- Fluorescent Protein, *Gene*, Volume 111, 229-233.

Raake PW, Hinkel R, Müller S, Delker S, Kreuzpointner R, Kupatt C, Katus HA, Kleinschmidt JA, Boekstegers P, Müller OJ (2008) Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors, *Gene Therapy*, 15(1):12-7.

Rabinowitz JE, Samulski RJ (2000) Building a better vector: The manipulation of AAV virions, *Journal of Virology*, Volume 278: 301-308.

Rao BDN, Kemple MD, Prendergast FG (1980) Proton Nuclear Magnetic-Resonance and Fluorescence Spectroscopic Studies of Segmental Mobility in Aequorin and a Green Fluorescent Protein from *Aequorea-Forskalea*, *Biophysical Journal*, Volume 32, 630 - 632.

Salaman JR (1986) Effects of steroids in combination with other pharmacologic immunosuppressive agents, *The Journal of heart transplantation*, Mosby-Year Book, Volume 5, 304-306.

Salgar SK, Yang D, Ruiz P, Miller J, Tzakis AG (2004) Viral interleukin-10 gene therapy to induce tolerance to solid organ transplants in mice, *Transplantation Proceedings*, 36: 397-398.

Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook J D, Housman D E, Epstein N, (1991) Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19, *The Embo Journal*, Volume 10, 3941-3950.

Sarkar R, Mucci M, Addya S, Tetreault R, Bellinger DA, Nichols TC, Kazazian HH (2006) Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia a dog and mice, *Human Gene Therapy*, 17: 427-439.

Schipper ML, Gambhir SS (2006) Imaging gene expression: concepts and future outlook, *Medical Radiology, Diagnostic Nuclear Medicine*, Springer Verlag, Berlin / Heidelberg, 313-342.

Schwinger RHG, Diedrichs H (2006) *Herztransplantation*, Volume 6, Springer, 857-867.

Siegel G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E, Tattersall P (1985) Characteristics and taxonomy of Parvoviridae, *Intervirology*, Volume 23, 61-73.

Spiegel Online (2007) Schweigen soll als Zustimmung gelten,  
<http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,479304,00.html> (Zugriff  
30.06.2008)

Su LT, Gopal K, Wang Z (2005) Uniform scale independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector, *Circulation*, 112: 1780-1788.

Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ (1999) AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection, *Nature Medicine*, Volume 5, 78-82.

Summerford C, Samulski CJ (1998) Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions, *Journal of Virology*, Volume 72, 1438-1445.

Sun L, Li J, Xiao X (2000) Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization, *Nature Medicine*, Volume 6, 599-602.

Suthanthiran M (1997) Molecular analyses of human renal allografts, differential intragraft gene expression during rejection, *Kidney international*, Volume 58, 15-21.

Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K, Lin H, Jiang F, Chu L, Leiden JM (1999) Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno – associated virus vectors, *Circulation*, American Heart Association, 201-205.

Thein E, Sevilmis G, Muenzing S, Hammer C, Messmer K (2001) Evaluation of a system for the perfusion of isolated, rodent organs, *Xenotransplantation*, 8: 94-99.

Waldenberger F (2008) Chirurgie der Herzinsuffizienz, *Herzinsuffizienz*, Springer Vienna, 144-156.

Wang L, Muramatsu S, Lu Y, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Nagatsu T, Nakano I, Ozawa K (2002) Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease, *Gene Therapy*, Volume 9, Number 6, 381-389.

Wang A, Peng P, Ehrhardt A (2004) Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo, *Human Gene Therapy*, 15: 405.

Wang Zhong, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J (2005) Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart, *nature biotechnology*, Volume 23, Number 3, 321-328.

Warrington KH, Herzog RW (2006) Treatment of human disease by adeno-associated viral gene transfer, *Human Genetics*, Volume 119, Number 6, 571-603.

Weitzmann MD, Kyöstiö SR, Kotin RM, Owens RA (1994) Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Volume 91, 5808-5812.

Wilhelm MJ, Schmid C, Rothenburger M, Stypmann J, Baba HJ, Berendes E (2002) Immunsuppression und Herztransplantation: Bewährte Konzepte und neue Perspektiven, *Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*, Volume 16, Steinkopff, 58-65.

Wright JF (2008) Manufacturing and characterizing AAV-based vectors for use in clinical studies, *Gene Therapy*, Volume 15, 840-848.

Yan Z, Yue Y, Ding W, Engelhardt JF (2000) Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Volume 97, Number 12, 6716-6721.

Yang L (2004) Recombinant adeno-associated virus as delivery vector for gene therapy – a review, *Stem Cells and Development*, Volume 13, 133-145.

Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, Chapman MS (2002) The anatomic structure of adeno-associated virus (AAV 2), a vector for human gene therapy, *Proc Natl Acad Sci USA*, Volume 99, 10405-10410.

## 7. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Aufbau der <i>in situ</i> Langendorff - Perfusionsmethode .....	28
<b>Abbildung 2:</b> Schematischer Aufbau des Oxygenator-Eigenbaus .....	30
<b>Abbildung 3:</b> <i>In situ</i> - Langendorff - Perfusionsmethode im Versuch.....	31
<b>Abbildung 4:</b> Präparierte Gefäße am Herz.....	34
<b>Abbildung 5:</b> Spenderherz angeschlossen an das Perfusionssystem .....	35
<b>Abbildung 6:</b> Implantiertes, schlagendes Herz in der Reperfusionsphase .....	38
<b>Abbildung 7:</b> Dissektionsschema des Transplantats.....	43
<b>Abbildung 8:</b> Ergebnisse der vier Vorversuche im Überblick.....	46
<b>Abbildung 8:</b> Ergebnisse der vier Vorversuche im Überblick.....	46
<b>Abbildung 10:</b> Überlebenszeit und Todesursache .....	49
<b>Abbildung 11:</b> Mittelwert der Perfusionszeiten .....	50
<b>Abbildung 12:</b> Mittelwert MAP zu Beginn der Perfusion .....	51
<b>Abbildung 13:</b> Mittelwert MAP zum Ende der Perfusion .....	52
<b>Abbildung 14:</b> Mittelwert MAP zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Kontrollgruppe.....	53
<b>Abbildung 15:</b> Mittelwert MAP zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Versuchsgruppe .....	54
<b>Abbildung 16:</b> Mittelwerte der Herzfrequenz zu Beginn der Perfusion .....	55
<b>Abbildung 17:</b> Mittelwerte der Herzfrequenz zum Ende der Perfusion .....	56
<b>Abbildung 18:</b> Mittelwert Herzfrequenz zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Kontrollgruppe.....	57
<b>Abbildung 19:</b> Mittelwert Herzfrequenz zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Versuchsgruppe .....	58
<b>Abbildung 20:</b> Mittelwerte der Pumpeneinstellung zu Beginn der Perfusion .....	59
<b>Abbildung 21:</b> Mittelwerte der Pumpeneinstellung zum Ende der Perfusion .....	60
<b>Abbildung 22:</b> Mittelwerte der Pumpeneinstellung zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Kontrollgruppe. ....	61
<b>Abbildung 23:</b> Mittelwerte der Pumpeneinstellung zu Beginn und zum Ende der Perfusion in der Versuchsgruppe .....	62
<b>Abbildung 24:</b> Mittelwerte der Gesamtschämiezeit .....	63
<b>Abbildung 25:</b> Nachweis transgener DNA und Proteinexpression.....	65

**Abbildung 26:** 3D Darstellung der Transduktionseffizienz pig6 ermittelt in RLU .....66

**Abbildung 27:** 3D Darstellung der Transduktionseffizienz pig12 ermittelt in RLU ....68

**Abbildung 28:** 3D Darstellung der Transduktionseffizienz pig14 ermittelt in RLU ...69

**Abbildung 29:** Überlegenheit AAV 9 gegenüber AAV 1-8 beim Vergleich aktueller Studien zu kardialer Transduktion .....89

## 8. Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziiertes-Virus
Abb.	Abbildung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GFP	Green Fluorescent Protein
HSPG	Heparan-Sulfate-Proteoglycan
HTX	Herztransplantation
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
MAP	Mean arterial pressure / mittlerer arterieller Druck
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µl	Mikroliter
n	number (Anzahl)
PCR	Polymerase Chain Reaction
rAAV	rekombinantes Adeno-assoziiertes-Virus
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure

## 9. Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mich in den letzten Jahren bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützten.

Ganz besonders bedanke ich mich in diesem Zusammenhang bei Prof. Dr. med. Bruno Reichart für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit und bei Prof. Dr. med. Ulrich Pohl für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes. Ferner danke ich im Besonderen meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Michael Schmoeckel, dem Betreuer meiner Arbeit Dr. med. Lars Burdorf und dem Doktoranden Markus Köhn. Mein persönlich herzlicher Dank für seine Geduld und Unterstützung gebührt auch Dr. med. vet. Eckhart Thein und dem Institut für Chirurgische Forschung am Walter-Brendel-Zentrum der Ludwig Maximilian Universität.

Für die Bereitstellung der Vektoren und die Transduktionsanalyse der Organe möchte ich mich bei Frau Natascha Schuhmann und Dr. Hildegard Bühning aus der Klinik I. für Innere Medizin der Universität zu Köln bedanken.

Privat möchte ich Chris Danke sagen für seine Notfalleinsätze und meinen weltbesten Freunden Maren und Dennis für ihre Freundschaft und Unterstützung. Ich danke meinen Eltern für die Unterstützung im Rahmen meiner gesamten Ausbildung und speziell auch meinem besten Hund Toni für das Wärmen meiner Füße in langen Doktorarbeitsnächten.

Danke.



## 10. Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Alexandra Schulz  
Geburtsort: Lemgo / NRW  
Adresse: Schäftlarnstraße 66, 81371 München  
Geburtsdatum: 15.09.1976  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulische Ausbildung

1984-1988 Grundschole Südschole Lemgo  
1988-1996 Marianne Weber Gymnasium Lemgo

### Studium Humanmedizin

13.Mai 2009 Erfolgreiche Absolvierung der ärztlichen Prüfung  
2002 - 2009 Studium der Humanmedizin Universität zu Köln / Ludwig-Maximilian Universität München  
Seit 2005 Doktorarbeit an der herzchirurgischen Klinik und dem Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum, Ludwig-Maximilian-Universität, München  
Doktorvater: Prof. Dr. med. Schmoeckel  
Seit 08/2008 Tätigkeit als OP Assistent, Hernienzentrum München, Dr. med. Ulrike Muschaweck, München  
04.2008 – 07.2008 PJ Klinik für Anästhesie, Klinikum Großhadern, München  
02.2008 – 03.2008 PJ Allgemein Chirurgie, King Edward Hospital, University of Kwazulu Natal, Durban, South Africa  
12.2007 – 02.2008 PJ Chirurgie, Tygerberg Hospital, University of Stellenbosch, Cape Town, South Africa  
08.2007 – 12.2007 PJ Innere Medizin, Schweizer Paraplegiker Zentrum, Nottwil, Schweiz

03.2007 – 04.2007	Famulatur chirurgische Praxis, ZEM, Prof. Dr. med. Baumgart, München
08.2006 – 09.2006	Famulatur Internistische Praxis, Dr. med. Schwering, Lemgo,
03.2006 – 04.2006	Famulatur plastische Chirurgie, Notfallambulanz, Phuket International Hospital, Phuket Town, Thailand
03/2005 – 04/2005	Famulatur Unfallchirurgie, Kreiskrankenhaus Lemgo
01/2005 – 11/2006	Werkstudent Schlaflabor, Medizinische Klinik, München
07/2004 – 08/2004	Erfolgreiche Absolvierung des Physikums
08/2003 – 09/2003	Pflegepraktikum Viszeralchirurgie, Innenstadt-Klinikum, Chirurgie, Nussbaumstrasse, München

### Studium Betriebswirtschaftslehre

2002	Diplom Kauffrau Universität
1997- 2002	Studium der Betriebswirtschaftslehre, Ludwig-Maximilians-Universität, München

### Publikationen

Burdorf L, Schuhmann N, **Schulz A**, Köhn M, Thein E, Brandl U, Hallek M, Reichart B, Büning H (2008) The in situ Langendorff perfusion system: A new method for viral mediated gene transfer to porcine hearts prior transplantation, 5<sup>th</sup> Joint Meeting, Innsbruck 17.- 20.2.2008, The Thoracic and Cardiovascular Surgeon, Thieme, Volume 56, S70.

Burdorf L, Schuhmann N, **Schulz A**, Köhn M, Thein E, Brandl U, Hallek M, Reichart B, Büning H (2008) The in situ Langendorff perfusion system: A new method for viral mediated gene transfer to porcine hearts prior transplantation, International Society for Heart and Lung Transplantation, Twenty – Eighth Annual Meeting and Scientific Sessions, 9.-12.4.2008, supplement to the Journal of Heart and Lung Transplantation, Elsevier, Volume 27, Number 2S, S 190.

Burdorf L, Schuhmann N, Büning H, Postrach J, **Schulz A**, Köhn M, Thein E, Hallek M, Reichart B, Schmoeckel M (2006) AAV-Mediated Gene Transfer into

Cardiac Endothelial Cells in Heterotopic Heart Transplantation Models, 08.06.2006 - 09.06.2006: International Symposium Xenotransplantation, Berlin.

### **Vorträge**

**Schulz A**, Burdorf L, Schuhmann N, Köhn M, Thein E, Brandl U, Hallek M, Reichart B, Büning H (2006) Transfektion von kardialen Endothelzellen im Schweinmodell, Kolloquium über Chirurgische Pathophysiologie und Mikrozirkulation, Vorlesungsverzeichnis Nr. 7MC67, Herzchir. Klinik, LMU, 23.01.2006.