

Aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der
Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)

und der
Firma ProCorde GmbH, Martinsried
Geschäftsführung: PD Dr. med. Dr. med. habil. M. Ungerer
angefertigt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt
und Frau Dr. med. vet. C. Baumgartner

Vorgelegt über
Univ.-Prof. Dr. med. vet. J. Hirschberger
Medizinische Kleintierklinik
(Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. K. Hartmann)

**Myokardiale Blockade des CD40-Liganden durch adenoviralen
Gentransfer von CD40-Fc zur Steigerung der kardialen Kontraktionskraft
und Verminderung des Remodeling im insuffizienten Kaninchenherz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Patricia Löffler

aus
Göppingen

München 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H.-Ch. Siebert

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meiner Familie und meinen Freunden

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	SCHRIFTTUM.....	2
2.1	Herzinsuffizienz	2
2.1.1	Definition	2
2.1.2	Formen und Einteilung der Herzinsuffizienz.....	3
2.1.3	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	5
2.1.4	Ultrastruktur des Myokards.....	9
2.1.4.1	Aufbau der Kardiomyozyten.....	9
2.1.4.2	Interstitielles Gewebe.....	14
2.1.5	Pathophysiologie und Pathomechanismen des kardialen Remodeling	16
2.2	CD40-Rezeptor und CD40-Ligand	20
2.2.1	CD40/CD40L-Dyade	22
2.2.2	Wirkmechanismus.....	23
2.3	Anatomie des Kaninchenherzens	25
2.4	Herzschrittmacher-induzierte Herzinsuffizienz im Tiermodell	26
2.5	Vektoren für den Gentransfer und Dauer der Transgen-Expression.....	28
2.6	Herstellung rekombinanter Viren.....	30
2.7	Techniken des Gentransfers am Herzen.....	32
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	34
3.1	Zielvorstellung	34
3.2	Material und Methoden	36
3.2.1	Versuchstiere und deren Haltung	36
3.2.2	Allgemeiner Versuchsplan	37
3.2.3	Gruppeneinteilung.....	39
3.2.4	Konstruktion und Reinigung von replikationsdefizientem CD40-Fc und Fc-Adenovirus	40
3.2.5	In-vitro-Expression und Reinigung von CD40-Fc.....	41
3.2.6	In-vitro-Bindung von CD40L.....	41
3.2.7	Thrombozyten-Präparation und FACS-Analyse	42
3.2.8	ICAM-1-Expression auf HUVECs.....	42
3.2.9	Serumanalyse	43
3.2.10	Untersuchungen und Operationen der Versuchsgruppen.....	43
3.2.10.1	Operationsvorbereitung und Anästhesie	43
3.2.10.2	Schrittmacherimplantation	45
3.2.10.3	Adenoviraler Gentransfer durch Cross-Clamping.....	48
3.2.10.4	Postoperative Versorgung	50

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.10.5	Aktivierung und Impulserhöhung des Herzschrittmachers	51
3.2.10.6	Untersuchungen und Messungen	51
3.2.10.6.1	Klinische Untersuchung	51
3.2.10.6.2	Linksventrikuläre Funktionsbestimmung per Ultraschall	52
3.2.10.6.3	Linksventrikuläre Funktionsbestimmung per TIP-Manometrie	54
3.2.10.7	Herzschrittmacherexplantation und Euthanasie	55
3.2.10.8	Postmortale makropathologische Diagnostik und Probengewinnung.....	55
3.2.11	Nachweis von GFP im Herzgewebe.....	56
3.3	Statistische Auswertung	59
3.4	Ergebnisse	60
3.4.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	60
	Expression und funktionelle Charakterisierung von CD40-Fc-Immunoadhäsion	60
3.4.2	Überlebensrate.....	64
3.4.3	Klinische Untersuchung der Tiere.....	64
3.4.4	Ergebnisse der Gewichtsentwicklung	65
3.4.5	Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung des linken Ventrikels..	66
3.4.6	Ergebnisse der TIP-Manometrischen Untersuchung.....	74
3.4.7	Serumuntersuchungen	83
4	DISKUSSION.....	85
4.1	Diskussion der Versuchsdurchführung	85
4.1.1	Herzinsuffizienz durch DCM im Tachykardie-Modell	85
4.1.2	Eignung der Vektoren und Genexpression.....	86
4.2	Diskussion der In-vitro-Voruntersuchungen.....	87
4.3	Diskussion der in vivo erhobenen Ergebnisse.....	89
4.3.1	Allgemeines.....	89
4.3.2	Überlebensrate.....	89
4.3.3	Myokardiale GFP-Expression ex vivo	90
4.3.4	Beeinflussung der klinischen Symptome der Herzinsuffizienz durch CD40... 90	
4.3.5	Beeinflussung der echokardiographischen Parameter nach CD40-Fc-Überexpression	91
4.3.6	Beeinflussung der TIP-Manometrischen Herzparameter durch CD40L-Blockade	92
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	93
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
6	SUMMARY	97
7	LITERATURVERZEICHNIS	99

INHALTSVERZEICHNIS

8	TABELLENVERZEICHNIS	115
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	116
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	118
11	DANKSAGUNG	122
12	LEBENS LAUF.....	123

1 EINLEITUNG

Entgegen dem medizinischen Fortschritt in der Therapie der Herzinsuffizienz (HI) und einer statistisch belegten längeren Lebenserwartung, sind nach Berichten der AMERICAN HEART ASSOCIATION Erkrankungen des Herzkreislaufsystems nach wie vor als häufigste Todesursache zu sehen. Mit knapp 400.000 Herzkreislauf-Neuerkrankungen jährlich (2000 bis 2002) bestätigt das STATISTISCHE BUNDESAMT DEUTSCHLAND diese Zahlen.

Dies zeigt die Wichtigkeit für die Erforschung der Pathogenese, wie auch die Notwendigkeit neuer Therapieansätze von Seiten der Wissenschaft.

Im Endstadium der HI steht häufig das Krankheitsbild der Dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Vom Zeitpunkt der Diagnosestellung aus gesehen, leben in der Regel nach fünf Jahren nur noch 50 % der Patienten mit dieser Form der Kardiomyopathie (AMERICAN HEART ASSOCIATION). Sie ist ein multifaktorielles Geschehen mit ansteigender Prävalenz, bei der vorwiegend Myokarditiden und Klappenerkrankungen als Auslöser gelten.

Grundsätzlich ist die Progression der HI im Rahmen der DCM mit Umbauprozessen im Myokard und einer linksventrikulären Dilatation mit Funktionsminderung verknüpft. In der Hauptsache betreffen die Veränderungen die extrazelluläre Matrix, deren Rolle im Zusammenhang mit dem kardialen Remodeling in dieser Studie aufgezeigt werden soll.

In letzter Zeit wird die Aktivierung entzündlicher Signalkaskaden als Auslöser der genannten Umbauprozesse diskutiert. In diesem Kontext soll die Wirkungsweise und der Mechanismus des inflammatorischen CD40-Rezeptor-Proteins und dessen CD40-Liganden näher beleuchtet werden.

Durch die Entwicklung gentherapeutischer Behandlungsmethoden ist es heute möglich, die Funktion von Proteinen im Tiermodell zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit ist es, die Entwicklung der Kontraktionskraft durch die CD40L-Blockade durch Überexpression des CD40-Fc-Adhäsionsmoleküls im Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienzmodell am Kaninchen zu untersuchen. Bei anderen kardiovaskulären Erkrankungen, wie beispielsweise der Artherosklerose und dem akuten Koronarsyndrom, konnten bereits tendenzielle Erfolge im Bezug auf die Verlangsamung der Krankheitsprogression durch Inhibition von Entzündungsmediatoren, wie der CD40L-Blockade, erreicht werden.

In Analogie dazu wird in dieser Arbeit eine Retardierung des Voranschreitens der HI durch die Blockade des CD40-Liganden postuliert.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Herzinsuffizienz

2.1.1 Definition

Herzinsuffizienz (HI) kann als pathophysiologischer Zustand beschrieben werden, in dem das Herz nicht in der Lage ist, dem Organismus belastungsadaptiert eine ausreichende Menge Blut für eine bestimmte geforderte Leistung zur Verfügung zu stellen. Meist liegt die Ursache der HI in einer unzureichenden myokardialen Kontraktionskraft begründet. In diesem Fall ist der Begriff der myokardialen Insuffizienz genauer. In der Regel geht der myokardialen Insuffizienz eine primäre Schädigung des Herzmuskels voraus, beispielsweise verursacht durch virale Myokarditiden oder angeborene Kardiomyopathien. Als weitere wichtige Ursache beim Menschen ist die Artherosklerose der Koronargefäße zu nennen, die nach ischämischer Schädigung der Herzwand sekundär eine myokardiale Insuffizienz induzieren kann (BRAUNWALD 1998, FRANCIS et al. 2001). Schließlich führen unterschiedliche Klappenanomalien, wie zum Beispiel die Aorten- oder Mitralstenose, durch mechanisch bedingte Störungen zur Schädigung des Herzmuskels. Weitere rein mechanisch bedingte Störungen, die zur myokardialen Insuffizienz führen können, sind die endokardiale Fibrose und einige Formen der hypertrophen Kardiomyopathie (BRAUNWALD 1998).

Im Endstadium steht häufig das Krankheitsbild der Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) - vorwiegend bei koronaren und valvulären Herzerkrankungen. Diese ist daher selten als primäre Ursache der Herzinsuffizienz zu finden, sondern sekundär durch die resultierenden Kompensationsmechanismen bedingt (PIESKE und HASENFUSS 2000, FRANCIS et al. 2001).

2.1.2 Formen und Einteilung der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz lässt sich durch folgende - teilweise überlappende - Einteilungen klassifizieren:

1. Es wird zwischen systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz unterschieden. Während bei der systolischen HI die Blutaustreibungsphase betroffen ist (z.B. bei Dilatativer Kardiomyopathie, Myokarditis, Klappeninsuffizienz oder Klappenstenosen), kommt es bei einer diastolischen HI zu einer Behinderung der Ventrikelfüllung. Als mögliche Ursachen sind hierbei die akute Herzbeutelamponade, aber auch die konstriktive Perikarditis zu nennen (BRAUNWALD 1998).

2. Durch ein vermindertes oder vergrößertes Herzminutenvolumen ist eine Unterteilung in „low-output-failure“ und „high-output-failure“ möglich. Beim Low-output-failure, welches die meisten Formen der Herzinsuffizienz charakterisiert, kommt es zu einer Verminderung des Herzzeitvolumens. Pathophysiologische Ursachen für ein vermindertes Herzminutenvolumen sind sowohl systolische und diastolische Ventrikelfunktionsstörungen als auch Herzrhythmusstörungen. Das High-output-failure, z.B. bei arteriovenösen Fisteln, Anämie und Hyperthyreose, führt dagegen trotz erhöhtem Herzminutenvolumen zu einer mangelhaften Sauerstoffversorgung der Peripherie (BRAUNWALD 1998).

3. Nach dem zeitlichen Verlauf unterscheidet man zwischen akuter und chronischer Herzinsuffizienz. Bei dem plötzlichen Auftreten einer anatomischen oder funktionellen Abnormalität des Herzens handelt es sich um eine akute HI, wie z.B. dem myokardialen Infarkt oder einer mechanischen Behinderung der Ventrikelfüllung durch eine Perikardtamponade. Bei der chronischen HI entwickelt sich der Funktionsverlust über einen Zeitraum von Monaten und Jahren. Als Ursache der chronischen HI kann häufig eine Herzklappenschädigung nachgewiesen werden (BRAUNWALD 1998).

4. Aufgrund der bevorzugt betroffenen Herzkammer ist eine Unterscheidung in Linksherzinsuffizienz und Rechtsherzinsuffizienz möglich. Während die Rechtsherzinsuffizienz durch Rückstau in den großen Kreislauf periphere Ödeme verursacht, geht die häufiger vorkommende Linksherzinsuffizienz mit pulmonalem Hochdruck und Lungenödem einher. Bei längerem Bestehen kann letztere nach sekundärer Schädigung des rechten Ventrikels in eine Globalherzinsuffizienz übergehen.

5. Anfangs zeigt sich die unzureichende myokardiale Funktion nur bei Belastung, man spricht von einer Belastungsinsuffizienz (ROSKAMM und REINDELL 1989). Mit zunehmender Verschlechterung kann diese dann in eine Ruheherzinsuffizienz übergehen, bei der die

Pumpleistung des Herzen selbst im Ruhezustand unzureichend ist. Dies ist auch Grundlage der Stadieneinteilung der New York Heart Association (NYHA, 1950), die eine Aussage über die Prognose der HI erlaubt. Eine objektivierbare Bewertung der Schwere der Herzinsuffizienz gelingt durch Messung echokardiographischer Parameter (BRAUNWALD 1998).

Die Schweregrade der Herzinsuffizienz werden entweder in Anlehnung an die Humankardiologie, gemäß dem Schema der New York Heart Association (NYHA, 1950) oder mehr spezifisch für die Bedürfnisse der Veterinärmedizin, gemäß dem Schema des International Small Animal Cardiac Health Council (ISACHC, 1994) eingeteilt:

<u>NYHA-Klassifizierung</u>	<u>ISACHC-Klassifizierung:</u>
<p>Klasse I : Keine Symptome sichtbar, normale Anstrengungstoleranz, nur objektive Zeichen einer Herzerkrankung (z.B. lautes Herzgeräusch)</p> <p>Klasse II: Leichte Anstrengungsintoleranz, keine Symptome bei Ruhe. Objektive Zeichen von Herzvergrößerung (Röntgen, EKG, Echokardiographie) werden zur Erkennung der Herzerkrankung beigezogen.</p> <p>Klasse III Leichte bis mittelgradige Symptome von Herzinsuffizienz bei Ruhe, Belastungsintoleranz, Dyspnoe bei Anstrengung. Mittelgradige Herzvergrößerung.</p> <p>Klasse IV Dyspnoe und Husten bei Ruhe, schwere Anstrengungsintoleranz. Massive Herzvergrößerung und Zeichen von Lungenödem und/oder Aszites</p>	<p>Klasse 1a: Zeichen einer Herzerkrankung ohne Symptome, keine Größenveränderung des Herzens</p> <p>Klasse 1b: Zeichen einer Herzerkrankung ohne Symptome, aber mit Größenveränderung des Herzens (Röntgen, Echokardiographie)</p> <p>Klasse 2: Zeichen von leichter bis mittelgradiger Herzinsuffizienz, vorwiegend verminderte Anstrengungstoleranz und Leistungsfähigkeit, Dyspnoe bei Anstrengung, Husten, leicht erhöhte Atemruhefrequenz</p> <p>Klasse 3: Dyspnoe und Husten bei Ruhe, schwere Anstrengungsintoleranz. Deutliche Größenveränderungen des Herzens. Zeichen von Ödemen.</p> <p>Klasse 3a: ambulante Behandlung möglich</p> <p>Klasse 3b: Hospitalisation zur Stabilisierung notwendig</p>

Table 1 Klassifizierung der NYHA (1950) im Vergleich zur ISACHC (1994)

2.1.3 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Prinzipiell können alle Formen der Herzerkrankung letztendlich in einer Herzinsuffizienz enden, daher ist die genaue Identifizierung eines kausalen Pathomechanismus praktisch nicht durchführbar (FRANCIS et al. 2001). Anfangs löst häufig eine primäre myokardiale Schädigung die Aktivierung kompensatorischer Gegenregulationsmechanismen aus.

Diese Mechanismen führen zunächst zur Aufrechterhaltung der Pumpleistung des Herzens, tragen aber nach einer gewissen Zeit und bei dauerhafter Aktivierung im Sinne eines Circulus vitiosus zur Progression der Herzinsuffizienz bei (PIESKE und HASENFUSS 2000).

Mechanismen, die der Körper nutzt, um allgemein einem Kreislaufversagen entgegenzuwirken, sind mit den Gegenregulations- bzw. Kompensationsmechanismen der Herzinsuffizienz vergleichbar. Handelt es sich um eine Symptom-schwache Herzinsuffizienz, können diese Mechanismen die Zeichen und Organdysfunktionen der Herzinsuffizienz fast vollständig kompensiert werden. Die klinischen Herzinsuffizienzsymptome (Ödeme, Tachypnoe, Dyspnoe, Tachykardie, periphere Vasokonstriktion) sind letztendlich das Ergebnis einer so genannten Überkompensation dieser Mechanismen (PIESKE und HASENFUSS 2000).

Im Folgenden sollen die wichtigsten Gegenregulationsmechanismen vorgestellt werden:

1. Frank-Starling-Mechanismus (Kraft-Spannungs-Beziehung):

Bei vermehrter Vorlast erhöht sich das enddiastolische Ventrikelvolumen. Aus dieser verstärkten diastolischen Vordehnung des Herzmuskels resultiert dabei eine Empfindlichkeitserhöhung der kontraktilen Proteine für Kalzium. Die Zunahme der myokardialen Kontraktilität führt schließlich innerhalb gewisser physiologischer Grenzen zur kompensatorischen Zunahme des Schlagvolumens. Die Wirksamkeit dieses so genannten Frank-Starling-Mechanismus lässt allerdings mit zunehmender Herzinsuffizienz nach (BRAUNWALD 1998, HEROLD 2002).

2. Die Aktivierung des neuroendokrinen Systems:

Zu Beginn einer akuten Herzinsuffizienz stellt die Freisetzung neurohormoneller Mediatoren einen wirkungsvollen Kompensationsmechanismus dar, der allerdings bei anhaltender Erkrankung wiederum negative Wirkungen, wie verstärktes Nachlassen der Kontraktionskraft nach sich zieht (COLUCCI und BRAUNWALD 2001).

Zu den wichtigsten Komponenten zählen das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), die Aktivierung des sympatho-adrenergen Systems und die gesteigerte Freisetzung von

Vasopressin (siehe *Abbildung 1*). Zusätzlich haben weitere Faktoren, wie die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine oder freier Sauerstoffradikale schädigende Einflüsse auf das Myokard (SCHRIER und ABRAHAM 1999, PIESKE und HASENFUSS 2000).

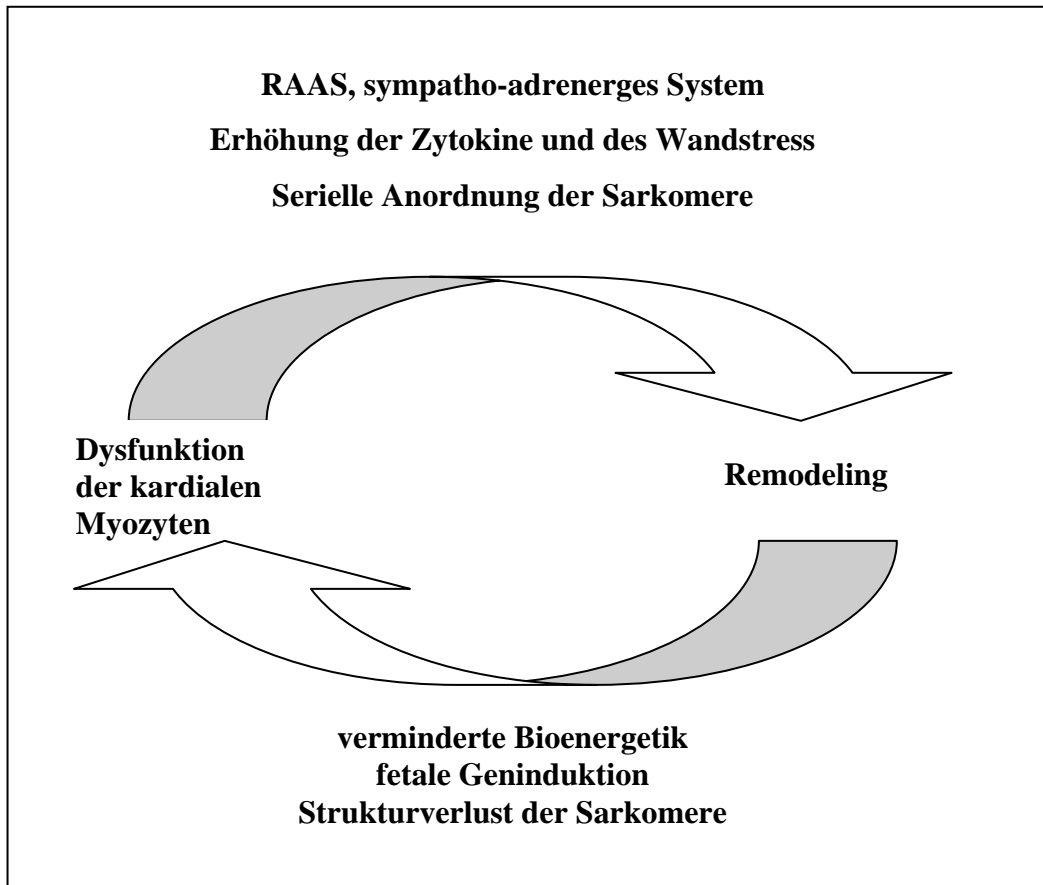


Abbildung 1 Wichtige pathophysiologische Prozesse bei der Herzinsuffizienz: Relation zwischen fortschreitender Dysfunktion der Kardiomyozyten und Remodeling (nach BRISTOW 2001)

3. Verminderung der β -Rezeptordichte im insuffizienten Myokard im Rahmen der Herzinsuffizienz:

Dies führt zu einer geringeren Stimulierbarkeit des Herzens durch Katecholamine (UNGERER et al. 1993, 2000, AKTHER et al. 1997). PETROFSKI und KOCH (2003) haben gezeigt, dass für die Kontraktilität der Muskelfasern die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin sehr wichtig sind. Diese wirken durch Stimulation der β 1-Rezeptoren im Herz positiv ino- und chronotrop. Infolgedessen ist durch die verminderte β -Rezeptordichte, wie sie beim Vorliegen einer Herzinsuffizienz nachgewiesen werden konnte, die Aktivierung der Kontraktionskraft des Herzens durch Katecholamine begrenzt. Das sympathische Nervensystem reagiert aus diesem Grund unter anderem mit einer kompensatorischen

Erhöhung der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin im Blut. Dadurch wird versucht die insuffizienten Myokardzellen zu einer verbesserten Funktion anzuregen (BRISTOW 1997, BRAUNWALD und BRISTOW 2000, BONNEFONT-ROUSSELOT et al. 2002).

4. Die myokardiale Hypertrophie mit oder ohne Kammerdilatation:

Chronische Überbelastung des Herzens führt zu einer kompensatorischen Hypertrophie der Kammerwände, als ein Versuch die Wandspannung zu verringern. Eine Drucküberlastung führt zu einer mehr konzentrischen Hypertrophie (Hypertrophie ohne Dilatation) mit einer anfangs noch normalen, später verminderten diastolischen Füllung, während eine Volumenüberlastung zu einer exzentrischen Hypertrophie (Hypertrophie mit Kammerdilatation) führen kann (COLUCCI und BRAUNWALD 2001).

5. Apoptose in Herzmuskelzellen:

Bei verstärktem Auftreten stellt die Apoptose in terminal differenzierten Geweben wie Kardiomyozyten und Neuronen nach Abschluss der fetalen und postnatalen Entwicklungsphase einen pathologischen Zustand dar (COLUCCI 1996, MACLELLAN und SCHNEIDER 1997). NARULA et al. (1996) und OLIVETTI et al. (1997), wie auch KHOYNEZHAD et al. (2004) konnten in Untersuchungen an kardiomyopathischen Herzen einen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Erkrankung und verstärkter Apoptose im Herzmuskelgewebe aufzeigen. Herzen von an dilatativer Kardiomyopathie (DCM) erkrankten Patienten wiesen in der Studie von NARULA et al. (1996) einen Apoptoseindex von 5 bis 35,5 % auf, wobei die apoptotischen Zellen immer gruppenweise vorwiegend im Myokard nachweisbar waren. Dagegen konnten apoptotische Prozesse in den glatten Muskelzellen der intrakardialen Arteriolen oder in den interstitiellen Zellen kaum nachgewiesen werden. Demzufolge wird eine erhöhte Apoptoserate im Herzmuskelgewebe als zusätzliche auslösende Komponente oder als Begleitsymptom bei progressiver Herzinsuffizienz identifiziert (NARULA et al. 1996, SABBAH et al. 1998).

Weiter zeigte BÖHM (2002), dass die Apoptose bei der chronischen Herzinsuffizienz durch Noradrenalin und Angiotensin II in Kardiomyozyten induziert werden kann. Ein durch Apoptose verursachter Myozytenverlust konnte auch bei einer Reihe von anderen kardiovaskulären Erkrankungen wie beispielsweise dem Myokardinfarkt (SHAROV 1996 und 1997), DCM durch ventrikuläres Pacing im Tachykardie-Modell (LIU 1995, KNOBLOCH 2001, BAUMGARTNER 2002), Bradyarrhythmie durch verstärkte Apoptose im Reizleitungssystem (NARULA et al. 1997, SCHNEIDER 1997) und der kongestiven Herzinsuffizienz (CHF) (NARULA et al. 1996, MACLELLAN und SCHNEIDER 1997,

OLIVETTI et al. 1997, HAUNSTETTER und IZUMO 2000, LAUGWITZ et al. 2001, KUMAR et al. 2002) nachgewiesen werden.

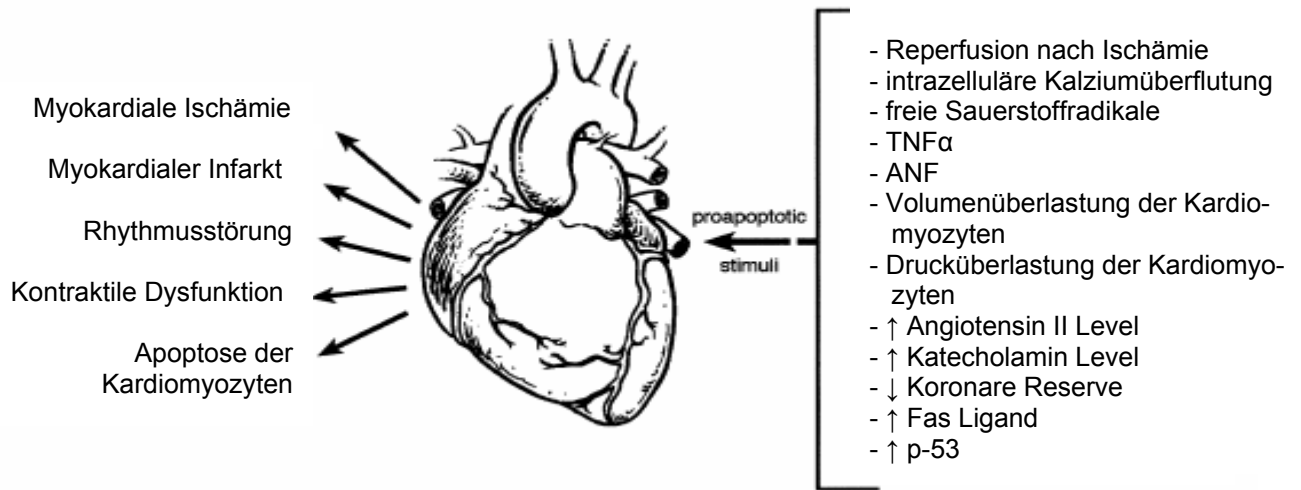


Abbildung 2 Apoptose-auslösende Faktoren und deren mögliche Wirkungen auf das Myokard (ANF =antinuclear factor, TNF = tumor necrosis factor) (nach KHOYNEZHAD et al. 2004)

6. Der kompensatorische Gefügeumbau (Remodeling) im Herzmuskelgewebe:

Es ist bekannt, dass neuroendokrine Faktoren wie Angiotensin II, Noradrenalin oder Endothelin, aber auch freie Sauerstoffradikale und Zytokine, neben mechanischen Faktoren (Dehnung) zu direkten molekularen Umbauvorgängen der Herzmuskelzellen führen. Im Rahmen des Remodeling kommt es auf der Ebene der Kardiomyozyten zunächst zur Hypertrophie und dann zur Dilatation der Zellen. Des Weiteren entsteht infolge dieser Strukturveränderungen ein veränderter molekularer Phänotyp des Myokards mit Reinduktion fetaler Genprogramme und verstärkter Apoptose. Mit zunehmendem Voranschreiten dieses Mechanismus zeigen sich Veränderungen der Quantität und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Myokardfibrose) (NARULA et al. 1996, COLUCCI 1997, PIESKE UND HASENFUSS 2000, BRAUNWALD und BRISTOW 2000).

(In der vorliegenden Arbeit wird auf das Remodeling im Zusammenhang mit CD40 in einem gesonderten Kapitel eingegangen. Aus diesem Grund werden die anderen pathophysiologischen Mechanismen nur im Überblick dargestellt.)

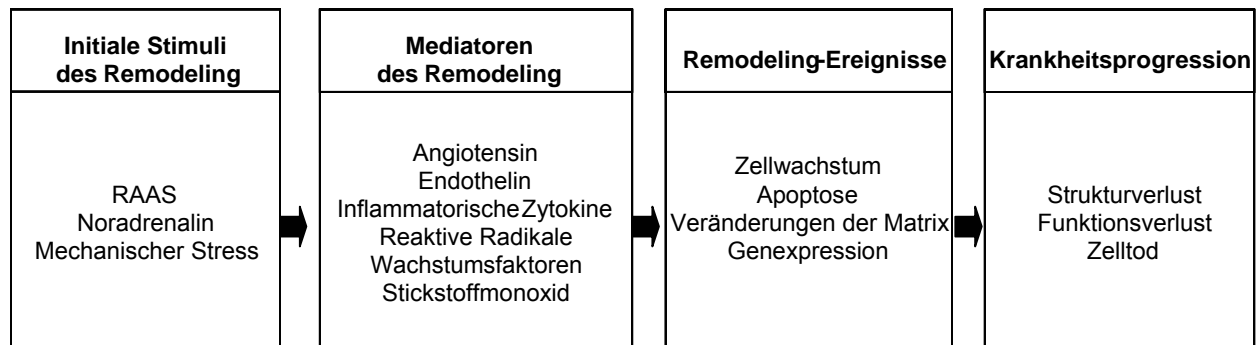


Abbildung 3 Überblick über die Mechanismen der myokardialen Umbauprozesse. Die initiierenden Stimuli involvieren vergrößerten mechanischen Stress auf das Myokard, die Aktivierung des RAAS= Renin-Angiotensin-Systems und eine verstärkte Sympathikusaktivität auf das Herz. Diese Stimuli können direkt oder indirekt via zellulärer Mediatoren, welche lokal im Myokard produziert oder aktiviert werden, verschiedene molekulare und zelluläre Umbauprozesse auslösen. Diese Remodelingprozesse im Myokard beeinflussen die strukturellen Eigenschaften und die funktionellen Fähigkeiten des Herzmuskels und bestimmen letztendlich das Voranschreiten der Krankheitsprogression (nach COLUCCI 1997)

2.1.4 Ultrastruktur des Myokards

Im Folgenden werden die zellmorphologischen Besonderheiten der Kardiomyozyten und der Aufbau des kardialen interstitiellen Gewebes (siehe 2.1.4.2.) dargestellt. Dies ist für das Verständnis des Remodeling von Bedeutung, welches als pathophysiologischer Mechanismus im Mittelpunkt dieser Arbeit steht. Das Myokard besteht hinsichtlich seines Volumens zu 75 % aus Myozyten. Allerdings machen diese nach der Zellzahl nur ein Drittel aller Zellen aus. Die restlichen zwei Drittel sind interstitielle Zellen, Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelnzellen, kardiale Fibroblasten sowie Makrophagen und Mastzellen (WILKE et al. 1995, MAISCH 1995).

2.1.4.1 Aufbau der Kardiomyozyten

Ventrikuläre Kardiomyozyten sind ca. 100 bis 200 µm lang und 15 bis 25 µm breit. Die Herzmuskelzelle enthält als funktionell wichtige subzelluläre Strukturen Zellkern, Myofibrillen und sarkoplasmatisches Retikulum und wird vom Sarkolemm begrenzt (siehe *Abbildung 4*) (BRAUNWALD 1998).

Kern:

Der Kern der Herzmuskelzelle ist rundlich bis oval und seine Längsachse verläuft parallel zur Myofibrillenachse. Der Kern liegt im Gegensatz zur Skelettmuskulatur im Zentrum der Zelle. Mit Hilfe einer Doppelmembran, die durch zahlreiche Poren unterbrochen wird, grenzt sich der Kern vom Zytoplasma ab. Im Kern befinden sich eine Anhäufung von Granula und die Kernmatrix, in der die DNA als genetische Informationsträger wie auch der Nukleolus eingelagert sind. Der Kern der Myokardzelle, der das Stoffwechselzentrum der Zelle ist, spielt bei der Induktion der Zellapoptose eine wichtige Rolle (BRAUNWALD 1998).

Myofibrille:

Myofibrillen sind 0,5 bis 1,5 μm dicke feinfädige Zytoplasmastrukturen von Muskelzellen und Skelettmuskelfasern. Ihre Substrukturen sind Aktin- und Myosinfilamente, deren regelmäßige Anordnung zueinander in Myofibrillen von Herzmuskelzellen und Skelettmuskelfasern einen Wechsel anisotroper und isotroper Segmente, den sog. A- und I-Streifen, ergibt. Unterbrochen wird der helle I-Streifen durch einen dünnen dunklen Z-Streifen. Jeweils zwei Z-Streifen begrenzen dabei die strukturelle und funktionelle Einheit der Myofibrillen, das **Sarkomer** (BRAUNWALD 1998).

Das Sarkomer ist je nach Kontraktionszustand der Zelle 1,6 bis 2,2 μm lang. Aufgrund der besonders regelmäßigen Anordnung der dünnen Aktin und dicken Myosinfilamente innerhalb der Sarkomere ergibt sich die charakteristische Querstreifung der Myofibrillen, die im Lichtmikroskop als abwechselnde helle und dunkle Bänderung der Herzmuskelzelle und Skelettmuskelfaser imponiert (JAMES et al. 1968, BRAUNWALD 1998).

Bei der Kontraktion der Myofibrillen, die einer Umwandlung chemischer in mechanische Energie entspricht, gleiten Aktin- und Myosinfilamente teleskopartig ineinander und führen zur Verkürzung der Muskelzelle oder -faser (BRAUNWALD 1998).

Myofilamente:

Myofilamente sind Substrukturen der Myofibrillen, die aus 400 bis 600 Proteinmonomeren aufgebaut sind.

Die Myofilamente der Herzmuskelzelle sind aus Myosin, Aktin, Troponin und Tropomyosin aufgebaut. Die dicken Filamente der A-Bande sind aus Myosinmolekülen zusammengesetzt und sind im Durchmesser 100 bis 150 nm mit einer Länge von 1,5 bis 1,6 μm . Jedes Filament besteht aus 300 Myosinmolekülen, die der Länge nach angeordnet sind. Die dünnen Filamente, die aus Aktinmolekülen zusammengesetzt sind, reichen von der Z-Bande durch die I-Bande in die A-Bande hinein. Die I-Bande besteht nur aus dünnen Filamenten, während sich die dicken und dünnen Filamente in der A-Bande überlappen (BRAUNWALD 1998).

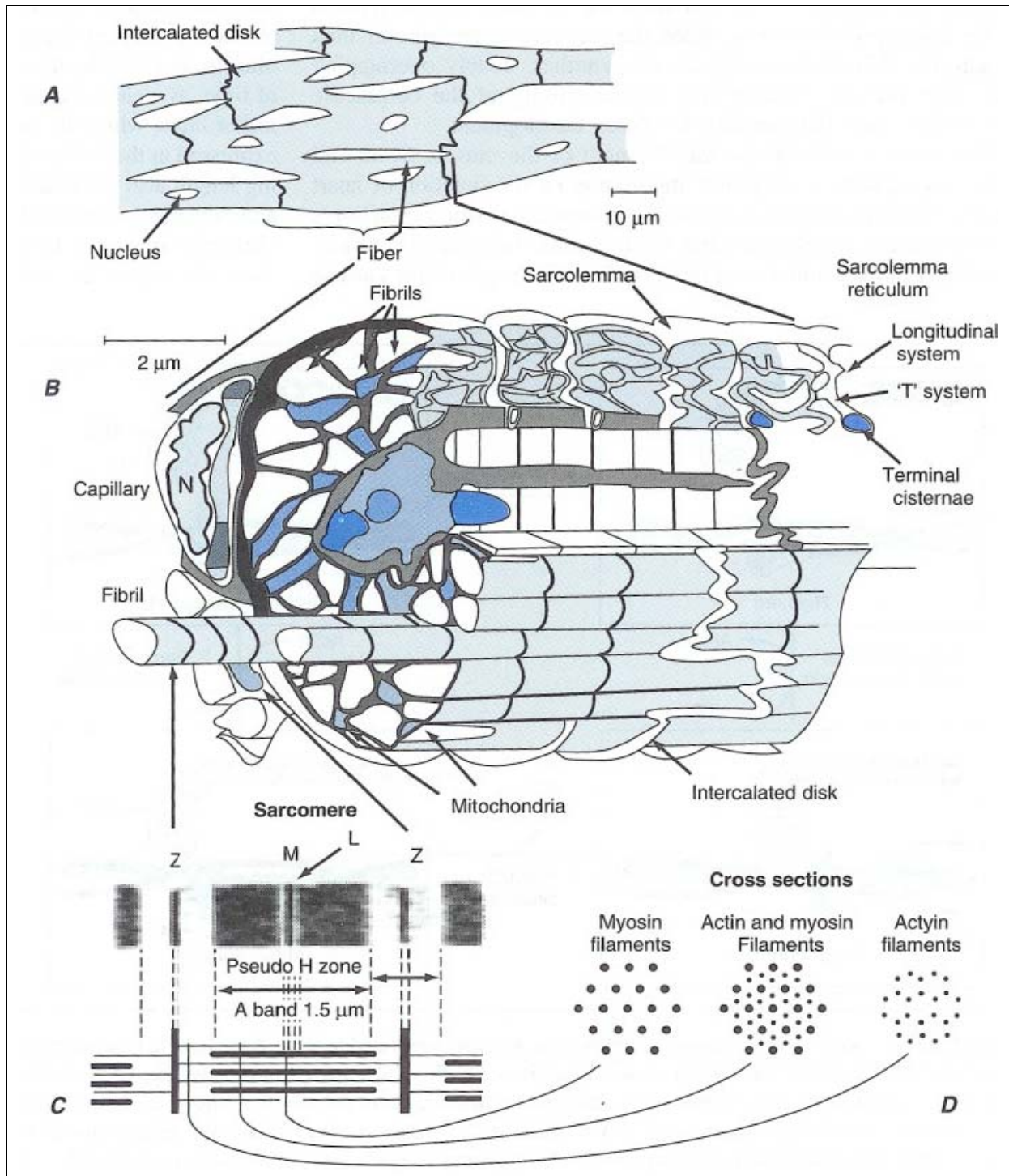


Abbildung 4 Mikroskopische Struktur des Herzmuskels
A) Lichtmikroskopische Darstellung des Myokard
B) Elektronenmikroskopische Darstellung der Herzmuskelzelle, N=Nucleus
C) Sarkomerdarstellung
D) Darstellung der Anordnung einzelner Myofilamente im Sarkomer
 (nach BRAUNWALD 1998)

Myosin:

Myosin hat ein Molekulargewicht von etwa 500.000 Dalton. Es ist ein ATP-spaltendes Enzym (ATP-ase) und besteht aus zwei umeinander gewundenen schweren Peptidketten und vier leichten Peptidketten. Die zwei helikal miteinander verdrillten schweren Ketten bilden am Aminoterminus über ein gelenkiges Halsstück zwei globuläre Köpfchen, in denen die Peptidketten aufgeknäult sind. Sie werden als Subfragment-1 bezeichnet. Die beiden identischen Köpfe besitzen ein ATPase-Zentrum und eine Stelle für die Bindung von Aktin sowie für jeweils zwei leichte Ketten. Ist der Herzmuskel in Aktion, stellen diese Bindungsstellen eine wichtige Brücke dar, um eine Verkürzung der Muskelfasern und damit der Kraftentwicklung herbeizuführen. Die Wechselwirkung von Myosin mit Aktin führt zu einer gegenseitigen Verschiebung der Aktin- und Myosinfilamente (BRAUNWALD 1998).

Aktin:

Aktin hat ein Molekulargewicht von 47.000 Dalton. Die dünnen Filamente bestehen aus einer Doppel-Alpha-Helix, die aus Aktinmolekülen aufgebaut ist. Die Filamente haben eine Länge von 1,0 μm und sind 55 nm breit. Aktin bildet zusammen mit Myosin den Komplex Aktomyosin, der in Gegenwart von Ca-Ionen eine starke ATPase Aktivität entfaltet (BRAUNWALD 1998).

Troponin und Tropomyosin:

Das Tropomyosin und die Troponine fungieren als stabilisierende und regulatorische Proteine, die in essentieller Beziehung zu den Kontraktionsmechanismen stehen. Tropomyosin hat ein Molekulargewicht von etwa 70.000 Dalton. Die etwa 40 nm langen fibrillären Tropomyosinmoleküle sind zwischen zwei Aktinketten eingesenkt. Sie bestehen aus zwei helikal umeinander gewundenen Peptidketten und überbrücken sieben Aktinmonomere. An ihre Endabschnitte sind Troponinkomplexe gebunden, die aus Troponinen C, I und T bestehen. Das Troponin T ist reich an basischen Aminosäuren und für die Bindung von Troponin an Tropomyosin verantwortlich. Das Troponin I hemmt die Bindung des Myosinköpfchens an Aktin und das Troponin C, das reich an sauren Aminosäuren ist, bildet die Ca^{++} -bindende Komponente. Im Ruhezustand unterbinden Troponin und Tropomyosin die Wechselwirkung von Actin und Myosin, da die Brückenstellen durch Tropomyosin blockiert werden, somit kommt es zu keiner Muskelaktivität. Nach der Erregungsübertragung an der motorischen Endplatte und der Depolarisierung der Membran wird Ca^{++} durch Öffnung von Kalziumkanälen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freigesetzt. Troponin C bindet dann vier Ca^{++} -Ionen, wodurch die Bindung von Troponin I an Aktin gelöst wird. Daraus folgt eine Formveränderung und

Verlagerung des Troponinkomplexes auf dem Aktinfilament und eine Verschiebung des Tropomyosins, wodurch die Myosinbindungsstelle am Aktinfilament freigelegt ist. Die hierbei ausgelöste Aktivierung der Aktomyosin-ATPase führt dann zur Auslösung eines Kontraktionszyklus (siehe *Abbildung 5*) (BRAUNWALD 1998).

Sarkoplasmatisches Retikulum:

Im Herzmuskel kommt nur das glatte endoplasmatische Retikulum vor, welches auch als Längstubulussystem bezeichnet wird. Das sarkoplasmatische Retikulum dient als wichtiger Speicher für Kalziumionen und bildet parallel zu den Myofibrillen das Longitudinalsystem.

Nach Depolarisierung des Sarkolems und der angeschlossenen T-Tubuli kann die getriggerte Kalzium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulums die Kontraktion der Sarkomere auslösen (BRAUNWALD 1998).

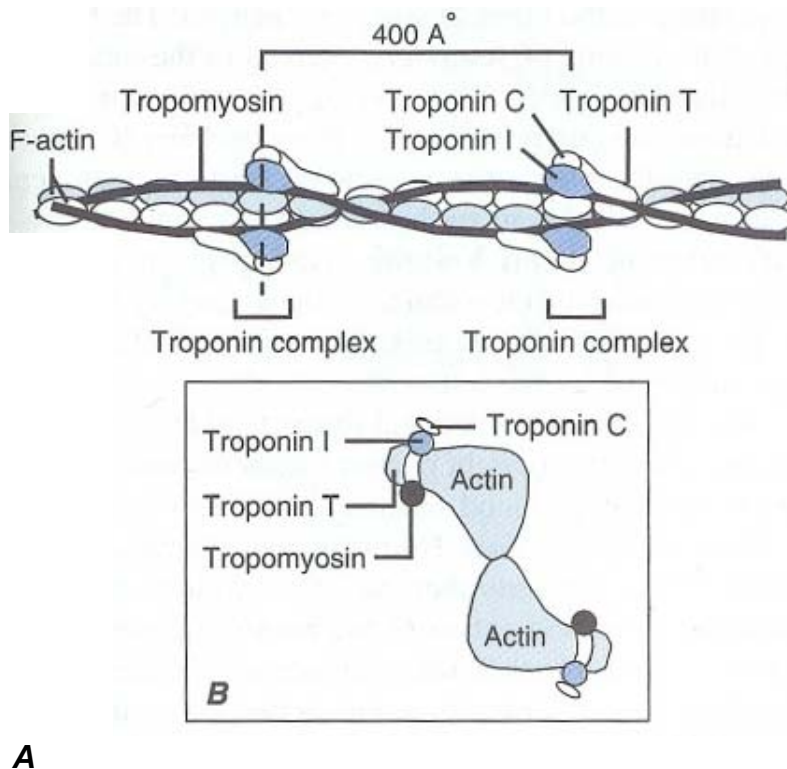


Abbildung 5 A) Darstellung der dünnen Filamente
 B) Interaktion eines einzelnen Troponin-Komplexes mit Aktin und Tropomyosin. Aufbau des Troponin-Komplexes aus Troponin I, Troponin C und Troponin T (nach BRAUNWALD 1998)

2.1.4.2 Interstitielles Gewebe

Extrazelluläre Matrix und kardiales Interstitium

Die extrazelluläre Matrix ist für eine intakte Funktion des kardiovaskulären Systems unerlässlich. Sie vermittelt dem Gewebe dynamische und passive Elastizität, wobei sie gleichzeitig die Größe und Form des Organs aufrechterhält (WEBER et al. 1995). Die extrazelluläre Matrix besteht aus verschiedenen Kollagentypen (Kollagen-Typ-I und -III sowie Typ-IV, -V, -VI), Elastin und einem Netzwerk von Glykoproteinen, darunter Proteoglykane und Fibronectin (SABRI et al. 1995). Die faserbindenden Proteine kann man nach ihrer Funktion in zwei Gruppen einteilen. Sie haben entweder Strukturaufgaben wie beispielsweise Kollagene und Elastine, oder sie dienen der Zell-Matrix-Adhäsion, wie Fibronectin und Laminin (WILKE et al. 1995). Kollagen-Typ-I und Typ-III sind die wesentlichen Bestandteile der myokardialen Matrix und spielen somit eine bedeutende Rolle für den Erhalt der Integrität und der Funktion des Herzens (PAUSCHINGER et al. 2002). Alle Bestandteile sind im interstitiellen Raum von Gewebsflüssigkeit umgeben. Hier befinden sich auch Makrophagen und Fibroblasten, die während der Gewebsreparation ihren Phänotyp ändern können.

Wichtigste Aufgabe der Fibroblasten ist physiologischerweise der Auf- und Abbau des Kollagens. Darüberhinaus befindet sich im Interstitium auch eine interstitielle Kollagenase, die nach Aktivierung der Fibroblasten vermehrt exprimiert und durch Trypsin, Plasmin und Elastase aktiviert wird (WEBER et al. 1995).

Der Umbau der extrazellulären Matrix im erkrankten Herzen spiegelt einen Wundheilungsprozess vergleichbar zu anderen Geweben wieder. Die wichtigste Rolle spielen Fibroblasten, die nach Schädigung des Herzens und nach Myozytennekrose in das geschädigte Areal einwandern. Diese Zellen sind größer als die normalerweise vorhandenen Fibroblasten und haben ein deutlich vergrößertes endoplasmatisches Retikulum sowie einen vergrößerten Kern. Sie enthalten große Mengen ACE und regulieren dadurch die lokalen Angiotensin-II- und Bradykininkonzentrationen (WEBER et al. 1995).

Dysregulation der Kollagen-Typ-I-Synthese kann durch dysproportionale Anhäufung von Kollagen zu fibrotischen Veränderungen des myokardialen Gewebes führen. Dabei kommt dem Angiotensin Converting Enzyme (ACE) der eingewanderten Fibroblasten eine entscheidende Bedeutung zu, da der Auf- und Umbau des Kollagens durch lokal produziertes Angiotensin II und Bradykinin reguliert wird.

So zeigen Zellkulturuntersuchungen, dass der Kollagenumbau nach Bildung von Angiotensin II durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) über einen auto- bzw. parakrinen Mechanismus gesteuert wird. Angiotensin II erhöht die Expression von TGF- β und von Endothelinen, die ihrerseits die Kollagensynthese der interstitiellen Fibroblasten erhöhen und die Kollagenaseaktivität senken. Bradykinin und weitere lokale Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Stickoxid etc.) können dagegen die Kollagensynthese hemmen und den Kollagenabbau fördern (WEBER et al. 1995).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Substrate des ACE die Wundheilung und dadurch die Struktur der extrazellulären Matrix in gesundem und erkranktem Gewebe entscheidend beeinflussen können (WEBER et al. 1995, MAISCH 1995).

Vor diesem Hintergrund ergibt sich für den Einsatz von ACE-Hemmern ein zusätzlicher therapeutischer Ansatzpunkt, da diese der Bildung von Kollagen und interstitieller Fibrose durch Erniedrigung des Angiotensins II entgegenwirken und dadurch einen kardioprotektiven Einfluss ausüben können (WEBER et al. 1995, BRISTOW 2001).

Untersuchungen an Tiermodellen haben entscheidend dazu beigetragen, die Rolle der extrazellulären Matrix und des interstitiellen Kollagens bei kardialen Erkrankungen zu klären. Es konnte gezeigt werden, dass die diastolische Dysfunktion oder die Restriktion nicht auf eine einzelne kardiale Erkrankung beschränkt ist. Die diastolische Dysfunktion tritt dabei bei fast allen Kardiomyopathien auf, die mit einer Hypertrophie einhergehen können (MAISCH 1995).

Die bedeutendste Rolle kommt der extrazellulären Matrix im Rahmen der postinflammatorischen Reparatur zu (WILKE et al. 1995). Hierbei entsteht die myokardiale Schädigung durch falsch gebündelte und punktuell überschießend gebildete extrazelluläre Matrix. WILKE et al. (1995) stellen die Veränderungen der extrazellulären Matrixproteine β -Tubulin, Laminin, Desmin, Vimentin, Vinculin, Fibronectin und Kollagen im Zusammenhang mit Myokarditis, Perikarditis, Endokarditis, koronarer Herzkrankheit, rheumatischer Herzerkrankung, der Herztransplantation und der Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) dar.

(Im Hinblick auf das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Versuchsmodell wird hier auf die extrazelluläre Matrix im Zusammenhang mit der DCM näher eingegangen.)

Das histologische Bild der DCM ist durch interstitielle und subendokardiale Fibrose, Faserhypertrophie und Mitochondriose charakterisiert. WILKE et al. (1995) diskutieren als mögliche Ursachen die gesteigerte Kollagensynthese als Reaktion auf mechanische Überlastung bei alteriertem Myokard. PAUSCHINGER et al. (2002) konnten zeigen, dass

neben der Zunahme des Fibroseindex bei DCM der Quotient Kollagen-Typ-I/Typ-III signifikant erhöht ist. Aufgrund der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von Kollagen-Typ-I (steif) und Typ-III (elastisch) sind diese Veränderungen für die Myokardfunktion von essentieller Bedeutung.

2.1.5 Pathophysiologie und Pathomechanismen des kardialen Remodeling

Der kardiale Remodelingprozess, der ausnahmslos bei progressiver Herzinsuffizienz initiiert wird, betrifft vorwiegend den linken Ventrikel des Herzens. Remodeling ist ein Vorgang bei dem mechanische, neurohormonelle und möglicherweise genetische Faktoren zu Veränderungen der Größe, der Funktion und der Form der Herzkammer führen (JESSUP und BROZENA 2003). Früher nahm man an, dass die Umbauvorgänge nur in den Kardiomyozyten ablaufen. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass wichtige Veränderungen auch die extrazelluläre Matrix (ECM) des Myokards betreffen. Der Remodelingprozess hängt daher von Umbauvorgängen der Myokardzellen und der ECM ab (SPINALE und PETERSON 2004).

Dies manifestiert sich bei verschiedenen klinischen Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, der Kardiomyopathie, Hypertonie und Herzklappenerkrankungen und geht mit Hypertrophie der einzelnen Herzmuskelzellen, Myozytenverlust und interstitieller Fibrose einher (EICHHORN und BRISTOW 1996, SUTTON und SHARPE 2000). Das Remodeling ist somit die Antwort auf Verletzungen auf Myokardebene, auf andauernden erhöhten Wandstress, welcher durch Volumen und Druckerhöhungen im Ventrikel bedingt ist (JANICKI et al. 2004) und letztlich auf reaktive Veränderungen des neuroendokrinen Milieus. Terminal führen die Remodelingvorgänge im Herzen zur Dekompensation des Ventrikels und somit zur hypertrophen oder dilatativen Herzinsuffizienz (siehe *Abbildung 6*).

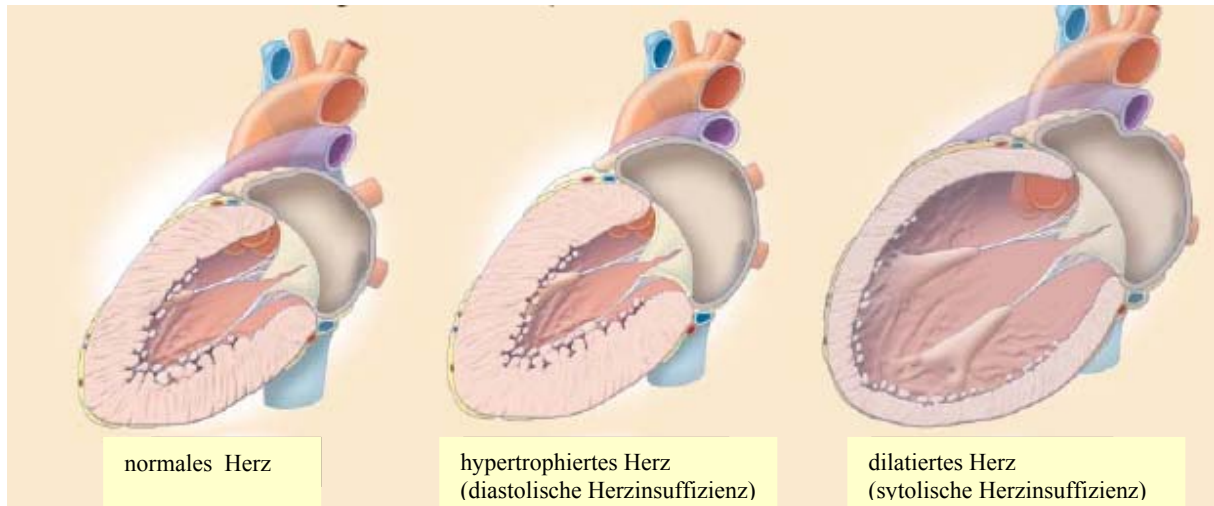


Abbildung 6 Remodeling des linken Ventrikels bei Herzinsuffizienz mit Hypertrophie und Dilatation

Die diastolische Herzinsuffizienz (mittleres Bild) führt zur Hypertrophie der Herzkammer mit normal großem Ventrikelvolumen, aber mit hypertrophierten Herzkammerwänden (konzentrische linksventrikuläre Hypertrophie) und erhaltener systolischer Funktion. Im Gegensatz dazu geht die systolische Herzinsuffizienz bei der Dilatativen Kardiomyopathie (rechtes Bild) mit einer globalen Änderung der Form des Herzens einher. Hier sind die Herzkammerwände deutlich dünner mit Abnahme der systolischen Funktion (nach JESSUP und BROZENA 2003)

In den letzten Jahren konnten dem beschriebenen makroskopischen Remodeling zunehmend auch molekulare Korrelate zugeordnet werden. Auf die Rolle von ACE wurde bereits eingegangen; der erfolgreiche Einsatz der ACE-Hemmer bei der Behandlung der Herzinsuffizienz unterstreicht die klinische Bedeutsamkeit dieser molekularen Veränderungen. Neuere Untersuchungen auf diesem Gebiet konnten nun zeigen, dass die so genannten Matrix Metalloproteinasen (MMP) aus der Gruppe der proteolytischen Enzyme, die im Myokard nachgewiesen werden können, einen entscheidenden Einfluss auf das Remodeling im Bereich der extrazellulären Matrix und während der verschiedenen Krankheitsstadien in der Entwicklung der Herzinsuffizienz haben (SPINALE und PETERSON 2004).

MMPs gehören zur Familie der Endopeptidasen, deren Aktivität von der Verfügbarkeit von Zink als auch von Kalzium abhängig ist (MCDONNELL et al. 1999). Die proteolytische Aktivität richtet sich gegen extrazelluläre Matrixkomponenten wie Elastine, Proteoglykane und Kollagen (SPINALE 2002). Mehr als zwanzig verschiedene MMPs von Säugetieren konnten bisher identifiziert und kloniert werden. Alle werden von spezifischen Gewebeinhibitoren der MMPs, den Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) gehemmt

(BRAUNWALD und BRISTOW 2000, SPINALE 2002, IKEDA et al. 2003, SIWIK und COLUCCI 2004). TYAGI (1998) und SPINALE et al. (1998) konnten in tierexperimentellen Untersuchungen zeigen, dass die Aktivierung der MMPs das Remodeling der extrazellulären Matrix entscheidend beeinflussen kann und für die, bei der Herzinsuffizienz beobachteten, strukturellen Umbauvorgänge zumindest teilweise verantwortlich gemacht werden können.

Neuere Untersuchungen bestätigen, dass der vermehrte Anstieg der Aktivität und Expression von MMPs das kardiovaskuläre Remodeling durch Umbau der extrazellulären Matrix fördern kann, welches wiederum zur kardialen Dysfunktion wie auch zur Dilatation, Restenose und Atherosklerose führt (SPINALE et al. 1999, 2002, GALIS und KHATRI 2002, SZMITKO et al. 2003).

Um den Prozess des kardialen Remodeling und das damit verbundene Voranschreiten der Herzinsuffizienz zu verlangsamen bzw. aufzuhalten, wurde in mehreren Untersuchungen versucht, die dafür verantwortlich gemachten MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-10 und MMP-13) zu hemmen und somit die kardiale Funktion zu verbessern. Dies geschah bereits mit großem Erfolg in der Prävention der kardialen Dilatation. Die Hypertrophie konnte reduziert und die Progression der Herzinsuffizienz in diesem Tiermodell deutlich verlangsamt werden (SPINALE et al. 1999, PETERSON et al. 2001, CHANCEY et al. 2002). Welche pathophysiologischen Schlüsselmechanismen im insuffizienten Herzen von MMPs aktiviert werden, ist dagegen bisher vollkommen unklar (SPINALE 1998, 1999). Dagegen konnten bei der atherosklerotischen Koronargefäßerkrankung bereits mehrere MMP-aktivierende Faktoren identifiziert werden, die für die Atherosklerose bedeutsam sind.

Insbesondere spielt hier MMP-9 (Gelatinase B, Kollagenasetyp-IV) eine Schlüsselrolle beim Abbau der extrazellulären Matrix, was zur Plaqueruptur und Migration der glatten Muskelzellen führen kann (siehe *Abbildung 7*) (SCHONBECK et al 1997, MORGAN et al. 2003, SZMITKO et al. 2003).

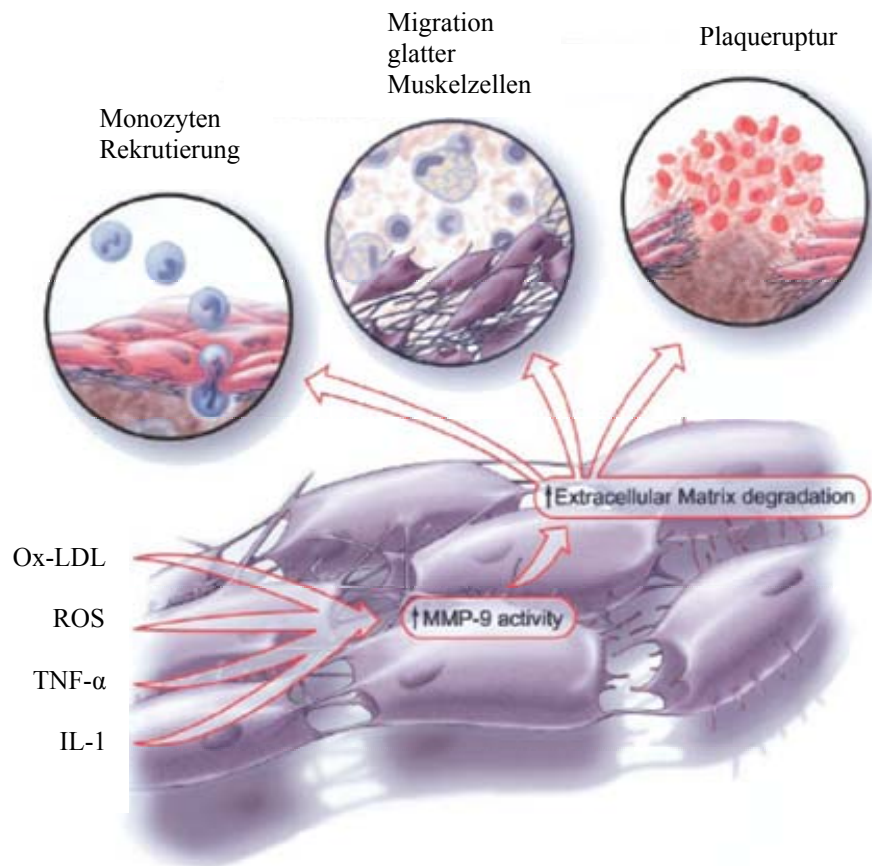


Abbildung 7 Aktivierung von MMP-9 durch oxygeniertes LDL, Sauerstoffradikale, TNF- α und IL-1. Dies führt zum Abbau der extrazellulären Matrix und schließlich zur Plaqueruptur und Migration der glatten Muskelzellen (SZMITKO et al. 2003)

Die strukturelle Komponente der fibrösen, artherosklerotischen Plaques besteht vorwiegend aus interstitiellem Kollagen. Die Balance zwischen Synthese und Abbau der extrazellulären Matrix bestimmt die Plaquestabilität und folglich erhöht sich die Gefahr der Plaqueruptur bei verstärktem Kollagenabbau (HEESCHEN et al. 2003). Zu den in der Abbildung 7 beschriebenen Aktivierungsmechanismen (ox-LDL, ROS, TNF- α , IL-1) der MMPs kommt mit der CD40/CD40L-Bindung ein wichtiger Faktor hinzu. Für die Regulierung der Signalkaskade der MMPs im Bezug auf den Kollagenabbau bei Atherosklerose ist die CD40/CD40L-Dyade ebenfalls von großer Bedeutung. SCHÖNBECK et al. (2000) und May et al. (2003) zeigten, dass die CD40/CD40L-Interaktion das Verhältnis von interstitieller Kollagensynthese in Richtung Abbau der extrazellulären Matrix über die Expression von MMP in glatten Muskelzellen des Gefäßsystems verschieben kann. Diese Interaktion ist dementsprechend im Bezug auf die Stabilität von atherosklerotischen Plaques bei der koronaren Herzerkrankung bis zu deren Ruptur von großer Wichtigkeit (SCHÖNBECK et al.

1997 und 2001, MACH et al. 1998 und 1999, HORTON et al. 2001, YAN et al. 2004, VISHNEVETSKY et al. 2004).

Auf den generellen Mechanismus der CD40-Rezeptor-CD40-Ligand-Interaktion im Bezug auf die Herzinsuffizienz wird im folgenden Abschnitt näher eingegangen.

2.2 CD40-Rezeptor und CD40-Ligand

Der CD40-Rezeptor ist ein Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 48.000 Dalton, welches zur Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF)-Rezeptor-Superfamilie gehört. Dieser CD40-Rezeptor wurde zuerst auf B-Lymphozyten entdeckt und charakterisiert, wobei bereits seine wichtige Rolle bei der T-Zell-abhängigen B-Zellaktivierung, -Proliferation und -Differenzierung gezeigt werden konnte (INWALD et al. 2003, ANAND et al. 2003). Er dient damit als ein Startermolekül bei der humoralen Abwehr (SCHÖNBECK et al. 2000, FREEDMAN 2003, STUMPF et al. 2003).

Der immunmodulatorische CD40-Ligand (CD 154) ist ein transmembranöses Typ-II-Protein in trimerischer Form und gehört der TNF-Superfamilie an (SCHÖNBECK und LIBBY 2001, STUMPF et al. 2003). Zunächst wurde der CD40-Ligand nur im Zusammenhang mit der Aktivierung der CD4-positiven T-Helferzellen beschrieben. In Lymphozyten können zwei Formen vorliegen, eine zellgebundene Form (CD40L) mit einem Molekulargewicht von 30.000 Dalton sowie eine lösliche Form (sCD40L) mit einem Molekulargewicht von 18.000 Dalton (ANAND et al. 2003, XU und SONG 2004). Der sCD40L lässt sich im Serum quantifizieren (VARO et al. 2003, CHAMORRO 2004). (Auch in dieser Arbeit wird als Diagnostikum für die HI der sCD40L-Serumspiegel ermittelt.)

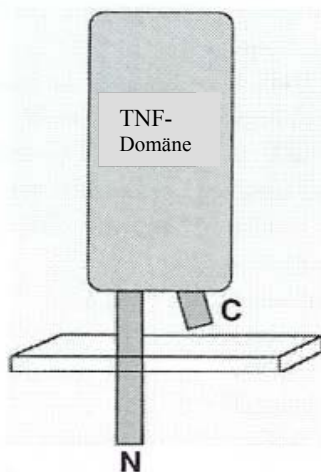


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Struktur des CD40L-Proteins. Das Typ-II-membran Protein hat einen intrazellulären Amino-Terminus und einen externen Stickstoff-Terminus. Die extrazelluläre Region des CD40L-Moleküls zeigt eine strukturelle Homologie mit anderen Vertretern der TNF-Familie (VAN KOOTEN und BANCHEREAU 2000, ANAND et al. 2003)

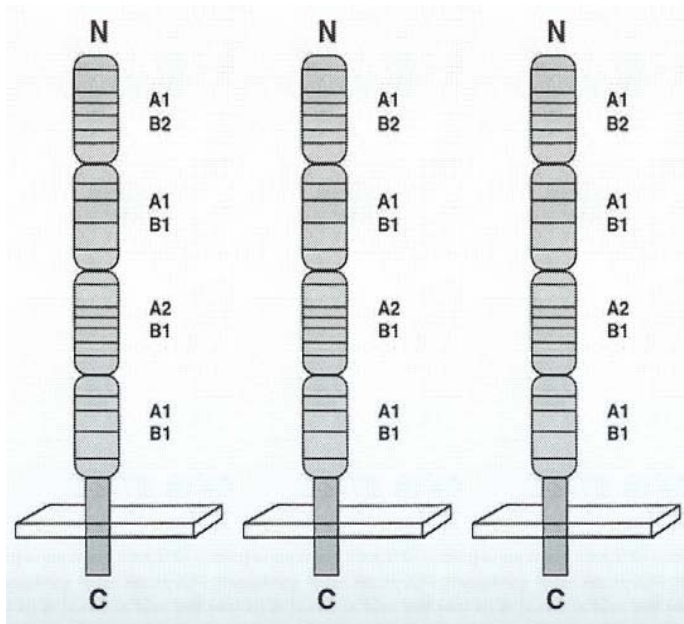


Abbildung 9

Schematische Darstellung des CD40-Rezeptors. Die extrazelluläre Region ist sehr Zystein-reich (horizontale Linien repräsentieren Zystein). Jede Domäne kann in zwei der vier Zysteinmodule (A1, A2, B1, B2) eingeteilt werden (nach VAN KOOTEN und BANCHEREAU 2000, ANAND et al. 2003)

SCHÖNBECK und LIBBY (2001) zeigten, dass der CD40-Rezeptor und sein Ligand auf vielen Zellen, die im Folgenden aufgeführt sind, exprimiert wird:

CD40-Rezeptor-exprimierende Zelltypen:

- B-Lymphozyten
- T-Lymphozyten
- CD34 Progenitor Zellen
- Granulozyten (basophile und eosinophile)
- Monozyten und Makrophagen
- Dendritische (Langerhans) Zellen
- Epithelzellen
- Endothelzellen
- glatte Muskelzellen (vaskuläre und bronchiale)
- Keratinozyten
- Fibroblasten

CD40L-exprimierende Zelltypen:

- Thrombozyten
- T-Lymphozyten
- B-Lymphozyten (wahrscheinlich nicht physiologisch)

- glatte Muskelzellen
- Endothelzellen
- Granulozyten (basophile und eosinophile)
- Mastzellen
- Monozyten und Makrophagen
- Natural killer (NK) Zellen
- Dendritische (Kupffer) Zellen

2.2.1 CD40/CD40L-Dyade

Durch das weite Spektrum der CD40/CD40L-Expression auf zellulärer Ebene kann der CD40/CD40L-Dyade auch eine zentrale Rolle als Entzündungskaskade in der Pathophysiologie der Atherosklerose, Hyperkoagulation und der Herzinsuffizienz zugeordnet werden (PENG et al. 2002, STUMPF et al. 2003, URBRICH und DIMMELER 2004).

Endothelzellen und glatte Muskelzellen werden nach Bindung des CD40-Liganden an den CD40-Rezeptor aktiviert (SCHÖNBECK et al. 1997). Diese Zellen sind nach CD40-Aktivierung in der Lage, Leukozyten anzulocken und zu aktivieren. In Endothelzellen ist dies beispielsweise durch die Sekretion des Monocyte chemoattractant Protein (MCP-1), IL-1 β , IL-6 und TNF α möglich (HENN et al. 1998, SCHÖNBECK et al. 2001). Diese Parameter können im Serum gemessen werden und stellen somit wichtige Indikatoren bei der Beurteilung der Herzinsuffizienz dar, da viele der genannten Mediatoren bei der HI erhöht sind. Sie führen potentiell zur Entwicklung und Progression der Herzinsuffizienz (AUKRUST et al. 1998, LI et al. 2000, BEHR et al. 2000; YNDESTAD et al. 2002, STUMPF et al. 2003). Darüber hinaus konnte eine Aktivierung der CD40/CD40L-Kaskade bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie Autoimmunerkrankungen (z.B. Inflammatory Bowel Disease), Arthritis, Artherosklerose und sogar Krebserkrankungen nachgewiesen werden (SCHÖNBECK und LIBBY 2001, STUMPF et al. 2003, XU und SONG 2004, DANESE et al. 2004).

2.2.2 Wirkmechanismus

Durch die Bindung des CD40-Liganden an seinen Rezeptor erfolgt die Aktivierung der CD40-Signalkaskade. Dadurch werden unterschiedliche proinflammatorische Mediatoren induziert. So lässt sich die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und VCAM-1) und proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF α , IL-1, IL-6, TGF β) sowie die Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen und verschiedenen Chemokinen (z.B. MCP-1) (SZMITKO et al. 2003, HARDING et al. 2004) nachweisen.

Insbesondere die inflammatorischen Zytokine (TNF α , IL-1 und IL-6) beeinflussen die Kontraktilität des Herzens negativ und unterstützen den Remodelingprozess bei der Herzinsuffizienz (BAUMGARTEN et al. 2000, DAMAS et al. 2001).

In Analogie zu der Aktivierung von MMPs – insbesondere von MMP-9- durch TNF- α (siehe *Abbildung 7*) steht auch CD40L in dringendem Verdacht über den Abbau der extrazellulären Matrix das kardiale Remodeling zu verursachen (MAY et al. 2003). Zusammenfassend wird damit deutlich, dass dem Entzündungsmediator CD40-Ligand infolge seiner Hochregulierung eine entscheidende Rolle im pathophysiologischen Prozess der HI zukommen kann. Dies wirft nun aber die Frage auf, von welchen Zellen CD40-Ligand im insuffizienten Herzen verstärkt gebildet oder freigesetzt werden kann.

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sich 95 % der im Blut zirkulierenden CD40-Liganden in Thrombozyten befinden (ANDRE et al. 2002). Bei chronischer Herzinsuffizienz kommt es zu einer verstärkten Aktivität der Thrombozyten (STUMPF et al. 2003). Diese exprimieren nach Aktivierung den Immunmodulator CD40-Ligand auf ihrer Oberfläche (HENN et al. 1998 und 2001, INWALD et al. 2003, FREEDMAN 2003) und können diesen als sCD40-Ligand auch freisetzen (siehe *Abbildung 10*) (ANDRE et al. 2002). Die Blockade der Freisetzung des CD40-Liganden nach Thrombozytenaktivierung könnte folglich ein vielversprechendes Ziel sein, überschießende Entzündungsreaktionen zu unterdrücken und die Progression von Herzerkrankungen zu verlangsamen.

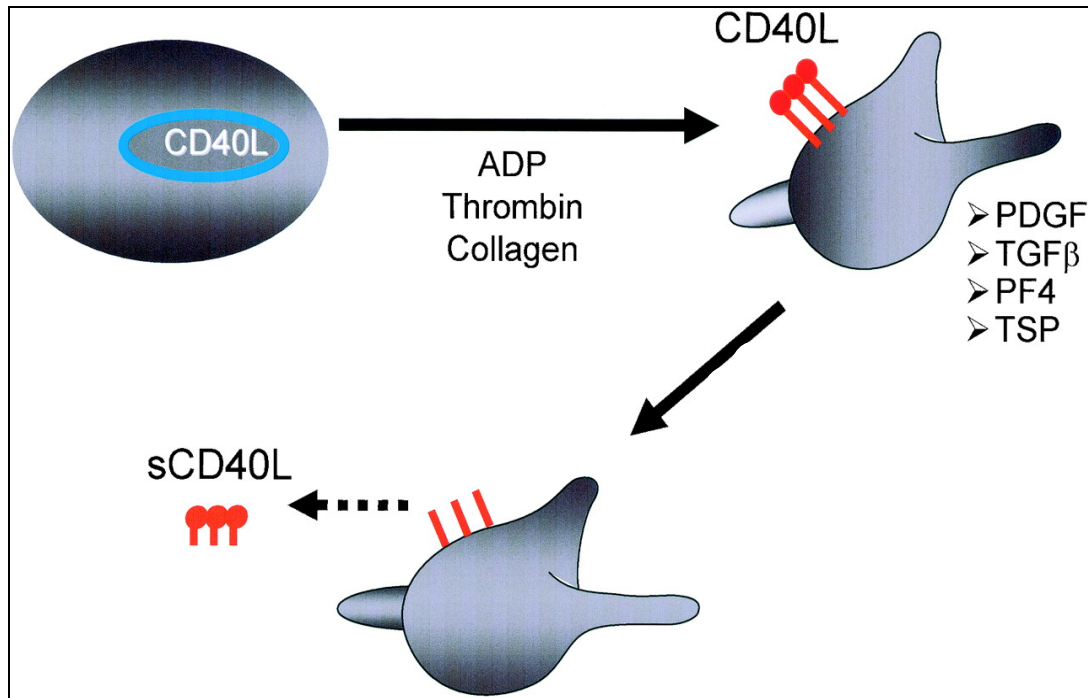


Abbildung 10 Aktivierung des CD40-Liganden. CD40L liegt in unstimulierten Thrombozyten zunächst intrazellulär vor. Wird aber bei Thrombozytenstimulierung durch ADP, Thrombin oder Kollagen sofort an deren Oberfläche transportiert. Die Lokalisation an der Oberfläche geht mit gleichzeitiger Aktivierung von platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor beta (TGFβ), platelet-factor 4 (PF4) und Thrombospondin (TSP) einher. Der an der Oberfläche exprimierte CD40-Ligand wird zeitabhängig als sCD40L (gelöste Form, soluble CD40L) losgelöst (ANDRE et al. 2002)

2.3 Anatomie des Kaninchenherzens

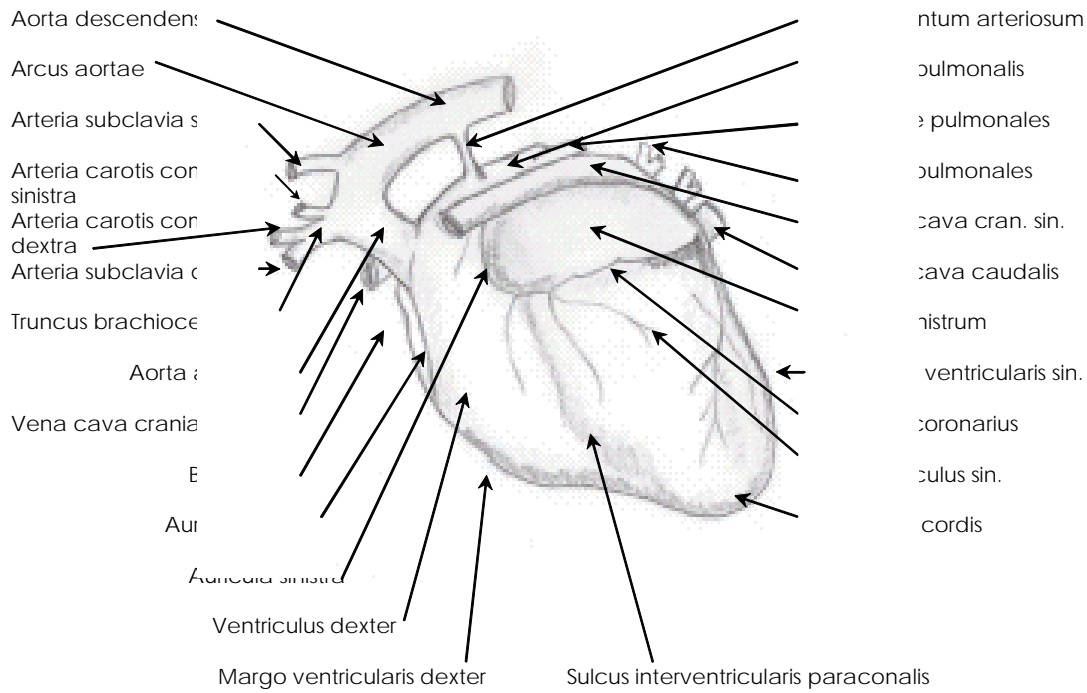
Das Herz des Kaninchens (Lagomorphus) liegt weit kranial, unmittelbar im Bereich des 2. bis 3. Interkostalraumes. Die Herzbasis zeigt nach rechts und nach rostral. Die Herzspitze liegt im Bereich des 3. Interkostalraumes dem Sternum auf und bildet mit der Medianebene einen Winkel von 30° (KRAUSE 1884).

Das relative **Herzgewicht** liegt nach KRAUSE (1884) zwischen 0,2 und 0,4 % und nach HILLYER und QUESENBERRY (1997) bei 0,3 % des Körpergewichtes.

Die **äußere Gestalt und Form** des Kaninchenherzens entspricht einem abgestumpften Kegel. Vorhöfe und Ventrikel lassen sich makroskopisch nur schlecht voneinander abgrenzen, wobei der Sulcus coronarius teilweise von den Herzohren verdeckt wird. Deutlich zu sehen ist dagegen die angedeutete Furche zwischen der rechten und der linken Herzkammer, die über die kraniale Fläche schräg von oben links nach rechts unten zieht und als Sulcus interventricularis paraconalis bezeichnet wird (BARONE et al. 1973).

Die linke Herzkammer hat eine glattere Innenwand, eine ausgeprägtere Muskulatur und ein engeres Lumen als der rechte Ventrikel. Die Muskelwand geht in Richtung Herzbasis in die kräftigen Papillarmuskeln über. Sonographisch lassen sich die Papillarmuskeln als kurze, in die Ventrikel hineinragende, zapfenförmige Fortsätze der Herzkammerwand darstellen. Im Vergleich zu den anderen Tierarten ist das Trabekelwerk beim Kaninchen nur geringgradig ausgebildet (KRAUSE 1884, KERN 1927).

FACIES AURICULARIS



FACIES ATRIALIS

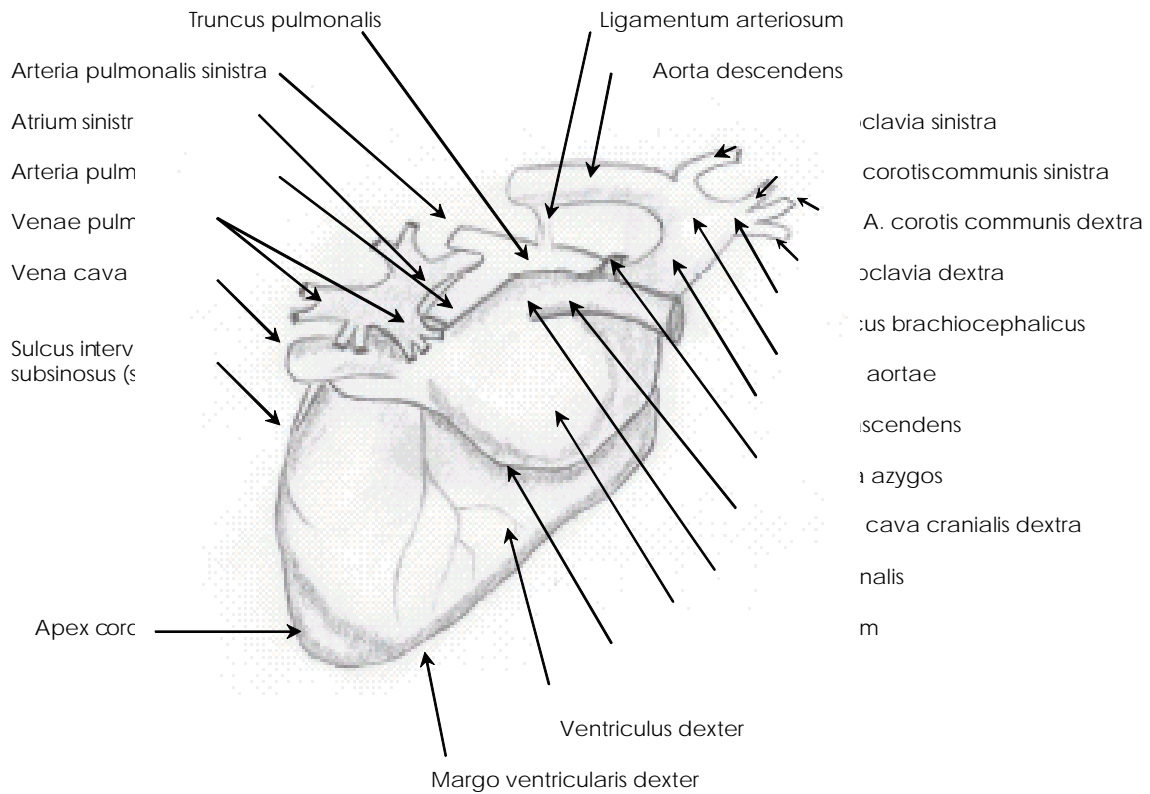


Abbildung 11 Anatomie des Kaninchenherzens (nach BARONE et al. 1973)

2.4 Herzschrittmacher-induzierte Herzinsuffizienz im Tiermodell

Aufgrund der hohen Analogie des Myokards (sowohl auf funktioneller wie auch auf molekularer Ebene) von Mensch und Kaninchen erweist sich das Tiermodell der Tachykardie-induzierten HI als besonders geeignet, um klinische, hämodynamische und pathologisch-anatomische Untersuchungen an den Tieren für die Erforschung der HI durchzuführen (HASENFUSS 1998).

Ein kontrolliertes, protokollbezogenes Pacing über einen implantierten Herzschrittmacher im Zuge der Tachykardie-induzierten HI wurde bereits bei anderen Tierarten, wie dem Schwein (SPINALE et al. 1990, HASENFUSS 1998) und dem Hund (WILSON et al. 1987, KOMAMURA et al. 1992, LERI et al. 1998) erfolgreich untersucht. Die standardisierte Entwicklung einer HI in Form einer DCM beim Kaninchen konnte in Arbeiten von MASAKI et al. (1993), SPINALE et al. (1994), STÄDELE (2001), KNOBLOCH (2001), FALTERMEIER (2002), BAUMGARTNER (2002) bereits gezeigt werden.

Die über einen Zeitraum von mehreren Wochen durchgeführte permanente Erhöhung der Herzfrequenz durch das ventrikuläre Pacing auf 320 bis 360 Herzschläge pro Minute (der physiologische Referenzbereich liegt bei 180 bis 250 Herzschlägen pro Minute nach HILLYER und QUESENBERRY 1997) führt durch die hohe Herzfrequenz und einem veränderten Verhältnis von Diastole und Systole zur Minderdurchblutung. Dies erfolgt allerdings bei maximaler Beanspruchung des Myokards. Dies führt zur sicheren Entwicklung klinischer, hämodynamischer und pathologisch-anatomischer Veränderungen und Symptomen der HI in Form einer DCM (MASAKI et al. 1994, SPINALE et al. 1994).

Durch feinstrukturelle pathologische Alterationen, die durch die experimentell induzierte DCM in Erscheinung treten und sich in Analogie zur natürlich auftretenden HI entwickeln, können pathophysiologische Zusammenhänge in diesem Tiermodell studiert werden. Es bietet eine gute Grundlage das Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen in Bezug auf das myokardiale Remodeling im Entwicklungsverlauf bis hin zur terminalen HI zu vertiefen und neue therapeutische Strategien auf molekularer Ebene zu entwickeln (SPINALE et al. 1992, 1994, HONGO et al. 1997, HASENFUSS 1998, KHAN 2004).

2.5 Vektoren für den Gentransfer und Dauer der Transgen-Expression

Mit Hilfe des Gentransfers gelingt es Genprodukte in unterschiedlichen Geweben zu exprimieren. Für den Transfer von Genen können grundsätzlich unterschiedliche Vektoren verwendet werden. Dabei kommen prinzipiell virale und nicht-virale Vektoren in Frage. Beispiele für nicht-virale Vektoren sind freie („nackte“) DNA (ISNER et al. 1996), konjugierte DNA, DNA-beladene Goldpartikel (ECK und WILSON 1996) oder liposomal gelöste DNA (STEPHAN et al. 1996).

Als virale Vektoren sind Retroviren, Adenoviren, adeno-assoziierte Viren, Vacciniaviren und Polioviren zu nennen (GRAHAM und PREVEC 1991, 1995, MULLIGAN 1993, AKTHER et al. 1997).

Ein idealer Genvektor sollte dabei folgende Voraussetzungen erfüllen:

- Ausreichend hohe und dauerhafte Expression im Zielgewebe, wie z.B. in postmitotischen Kardiomyozyten
- Fehlende unerwünschte Auswirkungen auf den Organismus
- Möglichst einfache technische Herstellung und Applikation

Da bisher keiner der bekannten Genvektoren die oben genannten Kriterien voll erfüllt, muss der gewählte Vektor an die speziellen Erfordernisse angepasst werden. Für den myokardialen Gentransfer wurden bereits als experimentelle Vektoren rekombinante, replikationsdefiziente Adenoviren etabliert (KASS-EISLER et al. 1993, HE et al 1998, HAJJAR et al. 2000, NABEL und ZAU 2001, ISNER 2002) (und erscheinen für unsere spezifische Fragestellung als besonders geeignet.)

Adenoviren:

Adenoviren sind hüllenlose Viren, die eine DNA-Sequenz mit einer Größe von 36 Kilobasenpaaren (kb) besitzen. Beim Mensch kann der Wildtyp selbstlimitierende Infektionen des Respirations- oder Gastrointestinaltraktes hervorrufen. Die Familie der Adenoviridae teilt sich in zwei Gruppen. Das Aviaadenovirus infiziert ausschließlich Vögel, während das Mastadenovirus eine Reihe von Säugetierspezies infizieren kann (DOUGLAS 2004).

Das humane Adenovirus lässt sich wiederum nach dem relativen Verhältnis von Guanin und Cytosin der viralen DNA und der Erythrozytenagglutination in sechs Untergruppen klassifizieren (DOUGLAS 2004). Von den etwa 50 adenoviralen Serotypen werden für den Gentransfer nur die humanen Serotypen 2 und 5 verwendet.

Adenovirale Vektoren haben gegenüber Retroviren den Vorteil, dass das adenovirale Genom episomal verbleibt, so dass die Gefahr einer induzierten Mutagenese nicht besteht

(FELDMAN und STEG 1997). Zudem können für den In-vivo-Transfer relativ hohe Titer hergestellt werden, die bei -80°C konserviert werden können (NABEL und ZAU 2001).

Der Nachteil des Einsatzes von Adenoviren ist die transiente Transgenexpression. Dementsprechend sind Transgene nach zwei bis vier Wochen nur noch in geringen Mengen nachweisbar (WILSON 1996). Ursachen hierfür sind der Verlust episomaler DNA im Verlauf der Zellteilung und die Beseitigung viraler Proteine und bestimmter transgener Produkte durch immunogene Reaktionen (ECK und WILSON 1996, TRIPATHY et al. 1996, FELDMAN und STEG 1997). So konnte MULLIGAN (1993) durch Versuche an Neonaten und immundefizienten Probanden zeigen, dass eine deutlich verlängerte Transgenexpressionsdauer erst bei fehlender antiviraler Immunantwort erreicht werden kann. Eine wiederholte Transfektion birgt darüber hinaus die Gefahr einer allergischen Reaktion. Zudem induziert der adenovirale Gentransfer eine starke Entzündungsreaktion (ZILLER et al. 2002, ISNER 2002). Cichon et al. (1999) zeigten in Untersuchungen mit Kaninchen eine Thrombozytopenie für die Dauer von 10 bis 14 Tagen. Erste klinische Versuche bei der Behandlung von genetischen Erkrankungen, z.B. der zystischen Fibrose (Mukoviszidose), bestätigten, dass die Expression von Adenoviren zeitlich begrenzt ist und bei wiederholter Gabe neben verstärkten inflammatorischen Nebenwirkungen auch die Effizienz des adenoviralen Gentransfer abnehmen kann (BRODY und CRYSTAL 1994, WILSON 1996, FELDMAN und STEG 1997).

In diesem Zusammenhang erscheinen nicht-virale Vektoren, wie die reine DNA, kationische Liposomen oder DNA-Plasmide in ihrer Anwendung wesentlich sicherer. Da ihrer Wirksamkeit wegen der geringen Transfektionsraten jedoch enge Grenzen gesetzt sind, zeigt sich deren Einsatz häufig als wenig praktikabel (FELDMAN und STEG 1997). Schließlich stehen die genannten immunologischen Nachteile der adenoviralen Vektoren bei einmaliger experimenteller Gabe im myokardialen System auch im Hintergrund, so dass sich Adenoviren zusammenfassend durch die hohe Effizienz der Expression im Zielgewebe bei tolerierbaren Nebenwirkungen und begrenzter viraler Pathogenität für den Gentransfer im kardialen Tiermodell qualifizieren.

2.6 Herstellung rekombinanter Viren

Das Genom der Adenoviren setzt sich aus Regionen zusammen, die früh (early = E1-E4) und spät (late = L1- L5) repliziert werden (GRAHAM und PREVEC 1991, ECK und WILSON 1996, FELDMAN und STEG 1997). Aus sicherheitstechnischen Gründen werden durch eine Deletion im Bereich der E1- oder E3-Region des Genoms replikationsdefiziente Viren hergestellt. Die hierbei frei werdende Kapazität im Genom des Virus, im Bereich von 10 kb, wird gleichzeitig für den Einbau des Transgens verwendet. Ein einzelner viraler Vektor ist somit befähigt, mehrere unterschiedliche Transgene zu exprimieren (HE et al. 1998).

Um ein Transgen (fremde Gensequenz) nach der Deletion des E1- und E3-Gens in das Genom des Adenovirus via Kotransfektion zu integrieren, werden humane 293-Zellen mit Plasmiden inkubiert (siehe *Abbildung 12*).

Dies erfolgt mit Hilfe eines Transportplasmids, das Träger der Gene ist, die in das Wirtsgenom transportiert werden sollen und eines Plasmids, welches das Genom des Rekombination-defizienten Adenovirus beinhaltet (HE et al. 1998).

Ein Rekombinationsplasmid, welches zur E3-Region des Adenovirus Typ 5 (Ad5) homologe DNA-Sequenzen sowie das auf Ad5 zu übertragende Fremdgen enthält, wird in eine Zelle transfiziert, die mit replikationsdefektem Ad5 infiziert ist. Das replikationsdefekte Ad5 hat eine Deletion in der essentiellen E1-Region, die durch die E1-Region komplementiert wird. Die E1-Region liegt in der Zelle integriert vor und wird exprimiert. Durch homologe Rekombination wird das heterologe Gen (Fremdgen) in den E3-Bereich von Ad5 inseriert. Die das E1-Genprodukt komplementierende Zelle setzt somit rekombinante, replikationsdefekte Ad5-Partikel frei. Die rekombinanten, replikationsdefekten Ad5-Partikel können Zellen infizieren und ihre Nukleinsäure in die Wirtszelle einführen. Da normale Körperzellen den Replikationsdefekt in der E1-Region nicht komplementieren können, kommt es nicht zur Produktion von infektiösen Virionen. Eine potentiell gefährliche Virusvermehrung kann dadurch verhindert werden (BETT et al. 1993, ROBERT KOCH INSTITUT 1999).

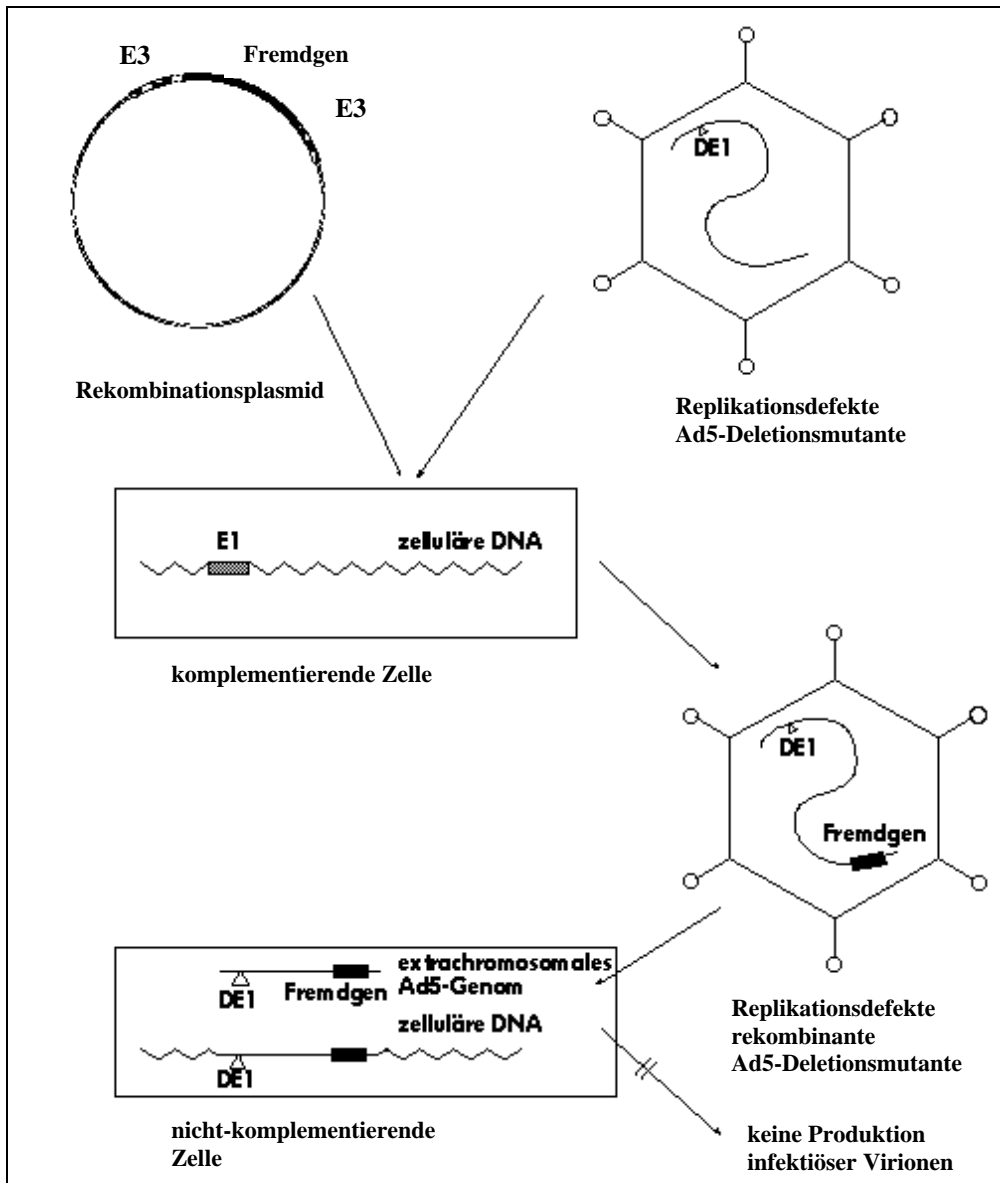


Abbildung 12 Beispiel der Herstellung rekombinanter replikationsdefekter Ad5 (Robert Koch Institut 1999)

2.7 Techniken des Gentransfers am Herzen

Der myokardiale Gentransfer durch virale Vektoren ist wiederholt beschrieben worden (KASS-EISSLER et al. 1993, KIRSHENBAUM et al. 1993, GUZMAN et al. 1993, HAJJAR et al. 2000, ISNER 2002). Hierbei werden die zuvor dargestellten rekombinanten Adenoviren eingesetzt. Eine effektive und homogene Genübertragung im gesamten Herzen ist für den Einsatz der Gentherapie bei myokardialen Erkrankungen von großer Wichtigkeit (DONAHUE et al., 1997 HAJJAR et al. 2000, ISNER 2002).

DONAHUE et al. (1998) stellen den Einfluss bestimmter Parameter wie die koronare Flussrate, die Viruskonzentration, die Kalziumkonzentration, die Kontaktzeit und die Temperatur auf die Effektivität des adenoviralen Gentransfers dar. Bei zu geringer Temperatur auf die Effektivität des adenoviralen Gentransfers dar. Bei zu geringer Temperatur des Viruskonzentrats (unterhalb der Körpertemperatur) ist die Funktionstüchtigkeit der Viren begrenzt. Die verminderte koronare Flussrate hemmt die Verteilung des Virus im Zielgewebe. Eine ungenügende Expression im Herzmuskelgewebe wird folglich durch zu kurze Kontaktzeiten der Virussuspension und eine unzureichend hohe Viruskonzentration hervorgerufen.

HAJJAR et al. (2000) beschreiben die verschiedenen Techniken zum myokardialen Gentransfer:

- 1.) Applikation des Virus über einen intrakoronaren Katheter: Diese Methode zeichnet sich durch eine vergleichsweise geringe Invasivität aus, allerdings ist die Transfektionseffizienz eingeschränkt (MÜHLHAUSER et al. 1996, BOEKSTEGE et al. 2000, WEIG et al. 2000, STÄDELE 2001).
- 2.) Virusapplikation durch Direktinjektion in das Myokard der Ventrikelwand: Hierbei ist die Transfektion effektiv und eine stabile Expression für mindestens zwei Wochen nachgewiesen worden (BAUMGARTNER 2002). Nachteilig sind dagegen die nur fokale Expression und die direkte Gewebeschädigung durch die Injektionsnadeln (KASS-EISSLER et al. 1993, GUZMAN et al. 1993, DONAHUE et al. 1998, BAUMGARTNER 2002).
- 3.) Virusapplikation durch perikardiale Injektion: Ein positives Ergebnis konnte von FROMES et al. (1999) nur durch zusätzliche Gabe von Kollagenase und Hyaluronidase erreicht werden, da anderenfalls eine ausreichende Genexpression im Myokard nicht erreicht werden kann.
- 4.) Virusapplikation durch Clamping der Aorta: Bei dieser Technik wird im Vergleich zum Cross-Clamping (siehe 5.) nur die Aorta während der Virusapplikation verschlossen. Die Katheterspitze wird für die Applikation der Virussuspension im Bulbus aortae platziert.

Die Genexpression ist bei dieser Applikationsart vorwiegend endokardial zu finden (MAURICE et al. 1999).

5.) Applikation des Virus durch Cross-Clamping der Aorta und A. pulmonalis: Bei der Cross-Clamping-Technik wird die Spitze des Katheters im Bulbus aortae platziert, danach wird die Aorta und die A. pulmonalis distal des Applikationskatheters während der Virusapplikation verschlossen und die hochkonzentrierte Virussuspension appliziert. Durch den simultanen Verschluss der A. pulmonalis und der Aorta kommt es zu einer geringen Blutvermischung, so dass die Konzentration des Adenovirus gleichmäßig bleibt. Durch die Platzierung des Applikationskatheters wird das Virus direkt in die Koronarien und das myokardiale Kapillarsystem injiziert. Durch den fehlenden enddiastolischen Druckanstieg wird die Kontaktzeit der Virussuspension im myokardialen Kapillarsystem maximiert, was zur homogenen Transfektion großer Areale des Myokards führt (HAJJAR et al. 1998, 2000).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielvorstellung

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der CD40-Ligand-Blockade auf die Entstehung einer experimentell-induzierten Herzinsuffizienz (HI) im Tiermodell untersucht werden.

Bei herzinsuffizienten Patienten konnte ein erhöhter Spiegel des CD40-Liganden im Blut nachgewiesen werden. Die Serumwerte korrelieren positiv mit dem NYHA-Schweregrad der Erkrankung und lassen CD40L daher als einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt erscheinen (YNDESTAT et al. 2002, STUMPF et al. 2003).

Die zentrale Rolle des CD40-Rezeptors und seines Liganden bei inflammatorischen Prozessen allgemein und der Einfluss von inflammatorischen Zytokinen bei der Induktion unterschiedlicher kardialer Erkrankungen (Atherosklerose und Herzinsuffizienz) scheint belegt (STUMPF et al. 2003). Diese Zusammenhänge erlauben die beobachtete Korrelation der CD40L-Serumkonzentration mit der Schwere der HI als funktionell relevant zu begreifen.

Um den Einfluss einer CD40L-Blockade unter möglichst realen Bedingungen in vivo zu untersuchen, kann ein gut charakterisiertes und seit Jahren verwendetes Tachykardie-induziertes Herzinsuffizienzmodell im Kaninchen eingesetzt werden (SPINALE et al. 1994). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es dementsprechend zu klären, ob durch eine erfolgreiche In-vivo-Blockade der CD40/CD40L-Interaktion im Herzen durch adenoviralen Gentransfers eines CD40-Fc-Konstruktes die Induktion und Progression der HI durch CD40L beeinflusst wird.

Das transferierte CD40-Fc-Konstrukt führt zur kardialen Expression eines löslichen CD40-Rezeptors, welcher nach Bindung von CD40L die pathophysiologisch relevante CD40L/CD40-Interaktion kompetitiv inhibiert.

In bisherigen Studien, in denen die Direktinjektion als Gentransfermethode im Rahmen des Tachykardie-induzierten HI-Modells verwendet wurde, konnte noch keine homogene Genexpression im Myokard erreicht werden (BAUMGARTNER 2002). Durch Einsatz der Cross-Clamping-Methode sollte die Effizienz des Gentransfers deutlich gesteigert werden, indem ein homogener Transfer in allen Regionen des Myokards erreicht wird.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Durch folgende In-vitro-Voruntersuchungen kann die Funktionalität und Spezifität des verwendeten CD40-Konstruktes abgeschätzt werden:

- Messung der Bindungsaffinität von immobilisiertem CD40-Fc an den Liganden CD40L
- Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bindung von CD40-Fc an CD40L-exprimierende Thrombozyten
- Funktionell relevante Inhibition von CD40L/CD40 in einer humanen Endothelzelllinie

In den anschließenden In-vivo-Versuchen werden Kaninchen nach Schrittmacherimplantation mit rekombinanten CD40-GFP-Fc Adenoviren (Ad-CD40-GFP-Fc) infiziert. Die Kontrollgruppe erhält dagegen den Kontrollvektor Ad -GFP-Fc. Nach iatrogener Steigerung der Herzfrequenz werden die Entstehung und der Verlauf der induzierten Herzinsuffizienz mit folgenden Methoden dokumentiert:

- Echokardiographische Messung von Ventrikelgröße und Wanddicke
- Direkte Bestimmung des intraventrikulären Druckes und der Kontraktilität durch Einsatz des TIP-Katheters
- Serumspiegel von CD40 und CD40L

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25.05.1998 (BGBl. I S. 1105) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 MATERIAL UND METHODEN

3.2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Als Versuchstiere werden NZW Kaninchen (Fa. Asamhof, 86438 Kissing) verwendet, hierbei handelt es sich um adulte weibliche, 10 bis 12 Wochen alte Tiere. Die Tiere unterstehen einem regelmäßigen Gesundheitsmonitoring, hierbei werden die Tiere stichprobenartig bakteriologischen, virologischen, mykologischen wie auch parasitologischen Untersuchungen unterzogen.

Die Kaninchen werden in einem klimatisierten Transportfahrzeug direkt in die Unterbringungsräume gebracht, zur Adaptation an die neue Umgebung und Fütterung werden sie 5 bis 7 Tage vor Versuchsbeginn angeliefert.

Die Tiere haben zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns Körpergewichte von $2,97 \pm 0,07$ kg (MW \pm SEM). Um eine optimale Beobachtung zu gewährleisten sind die Kaninchen in Einzelkäfigen untergebracht. Das Käfigmaterial besteht aus Edelstahl mit PVC-Einsätzen. Die Käfiggrundfläche beträgt 4040 cm^2 und ist als gelochter Bodenbereich gestaltet. Es erfolgt eine tägliche Nassreinigung der Käfige und der darunter befindlichen Kotschalen sowie eine wöchentliche Heißluftsterilisation der Käfige.

Die Tiere erhalten pelletiertes Alleinfutter für Kaninchen (Haltungsfutter, Fa. Altromin, 32791 Lage), Heu und Wasser aus einer Nippeltränke prä- und postoperativ ad libitum. Um dem Nagetrieb der Kaninchen nachzukommen, werden Rüben, getrocknetes Brot oder Nageholz zur Verfügung gestellt. Vor der Operation werden die Tiere keiner Nahrungskarenz unterzogen, da intraoperative Futteraspiration bei Kaninchen praktisch nicht vorkommen und ein Energiemangel und eine Hypoglykämie bei Kaninchen durch fehlendes Futter schnell hervorgerufen werden kann.

Es erfolgt eine Raumklimatisierung für konstante Bedingungen, wobei die Raumtemperatur ganzjährig 18 bis 21°C und die Luftfeuchtigkeit 50 bis 60 % beträgt. Da große Fenster im Stallbereich vorhanden sind, entspricht die Beleuchtung dem natürlichen Nacht-Tagesrhythmus bei einer Intensität von mindestens 100 Lux.

3.2.2 Allgemeiner Versuchsplan

Die Gesamtdauer des Versuchs erstreckt sich über einen Zeitraum von 21 Tagen. Am Tag 0 wird den Tieren ein Einkammerherzschrittmacher (SM) implantiert. Nach einer Rekonvaleszenzzeit von 6 Tagen werden die Tiere am Tag 7 des Versuchszeitraumes (in Narkose) der ersten sonographischen Herzuntersuchung unterzogen und dann eine Thorakotomie durchgeführt, bei welcher durch Cross-Clamping die Transfektion des Myokards mit rekombinantem Adenovirus erfolgt. Nach einer zweitägigen Rekonvaleszenzzeit wird die Herzschrittmacherfunktion geprüft und auf 320 bpm programmiert.

Die Herzfrequenz der Kaninchen wird nun von Tag 9 bis Tag 14 durch den SM auf einer kontinuierlichen Herzfrequenz von 320 bpm gehalten. Am Tag 14 erfolgt die zweite sonographische Herzuntersuchung. Für die Dauer der Untersuchung wird der SM abgeschaltet und anschließend von Tag 14 bis 21 durch den SM wieder auf einer kontinuierlichen Herzfrequenz von 360 bpm gehalten.

Am Ende der Beobachtungszeit, am Tag 21, erfolgt die dritte sonographische Herzuntersuchung (in Narkose) und daraufhin die hämodynamischen Messungen mit TIP-Manometrie (basal und unter Stimulation mit Isoprenalin unterschiedlicher Konzentrationen).

Anschließend werden die Tiere euthanasiert und der Herzschrittmacher explantiert. Die Kaninchen werden einer sofortigen pathologisch-anatomischen Untersuchung unterzogen, innerhalb der das Herz als Gesamtorgan, die Leber und die Milz für die sich anschließenden Ex-vivo-Untersuchungen frisch asserviert werden.

Tabelle 2 Versuchsplan

Tag 0:

- Klinische Untersuchung, Gewichtskontrolle, Blutabnahme
- Herzschrittmacherimplantation

Tag 7:

- Klinische Untersuchung, Gewichtskontrolle
- Sonographische Herzuntersuchung
- Thorakotomie und Virusapplikation während Cross-Clamping

Tag 9:

- Klinische Untersuchung
- Schrittmacherprogrammierung auf 320 bpm

Tag 14:

- Klinische Untersuchung, Gewichtskontrolle, Blutabnahme
- Sonographische Herzuntersuchung
- Schrittmacherprogrammierung auf 360 bpm

Tag 21:

- Klinische Untersuchung, Gewichtskontrolle, Blutabnahme
- Sonographische Herzuntersuchung
- TIP-Manometrie
- Euthanasie
- Pathologisch-anatomische Untersuchung
- Organentnahme
- Histologische Untersuchung (Auswertung nicht gezeigt)

3.2.3 Gruppeneinteilung

Insgesamt gehen in den Versuch 18 Tiere ein. Die Kaninchen werden folgenden Versuchsgruppen zugeordnet:

Ad-CD40-Rezeptor-GFP-Fc-Versuchsgruppe (Ad-CD40-GFP-Fc-G)

Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe (Ad-GFP-Fc-G)

GRUPPENPLAN:

Ad-CD40-Rezeptor-GFP-Fc-Versuchsgruppe

Die Tiere erhalten für die In-vivo-Funktionsstudie einen Herzschrittmacher zur Induktion der Dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Daraufhin erfolgt der myokardiale Gentransfer von Ad-CD40-Fc und GFP (Markergen) während Cross-Clamping. Hierbei werden 2 ml Virussuspension mit einem Titer von 4×10^{10} pfu appliziert.

Ad-GFP Fc-Kontrollgruppe

Hierbei handelt es sich um die Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe. Die Tiere erhalten für die In-vivo-Funktionsstudie einen Herzschrittmacher zur Induktion der DCM. Der adenovirale Gentransfer von Ad-GFP-Fc erfolgt während Cross-Clamping. Hierbei werden ebenfalls 2 ml Virussuspension mit einem Titer von 4×10^{10} pfu appliziert.

Diese Tiergruppe dient als direkte Kontrollgruppe gegenüber der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe und durchläuft das Protokoll vollständig.

3.2.4 Konstruktion und Reinigung von replikationsdefizientem CD40-Fc und Fc-Adenovirus

Humanes Fc- Fragment wird mit Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durch Benutzung des vorwärts gerichteten Primers 5'-CGCGGGGCGGCCGCGAGTCCAAATCTTGTGAC-AAAAC-3' und dem entgegengesetzt gerichteten Primer 5'-GCGGGAAGCTTTCATTTACCCGGAGACAGGGAG-3' aus einer humanen Herz cDNA-Bibliothek amplifiziert (Clontech, Palo Alto, CA). Das PCR-Fragment wird in das Plasmid pAdTrack-CMV mit NotI/HindIII kloniert um pAdTrack-CMV-Fc herzustellen.

Um die extrazelluläre Domäne des humanen CD40 zu klonieren, wird eine PCR mit den Primern 5'-CGCGGGGCGGCCGC-GAGTCCAAATCTTGTGACAAAAC-3' und 5'-GCGGGAAG-CTTTCATTTACCCGGAGACAGGGAG-3' zur Amplifikation aus der oben erwähnten humanen Herz-cDNA-Bibliothek eingesetzt. Das PCR Fragment wird unter Verwendung von KpnI/NotI-Schnittstellen in das pAdTrack-CMV-Fc Plasmid inseriert, um pAdTrack-CMV-CD40-Fc zu gewinnen.

Das Primerpaar 5'-CGCGGGGCGGCCGC-GAGTCCAAATCTTGTGACAAAAC-3' und 5'-GCGGGAAG-CTTTCATTTACCCGGAGACAGGGAG-3' wird benutzt, um das CD40-Start-Peptid zu vervielfachen und daraus das Kontroll-Fc-Fragment herzustellen. Das PCR Fragment wird unter Verwendung der KpnI/NotI-Schnittstellen in das pAdTrack-CMV-Fc-Plasmid kloniert.

Jeder rekombinante Vektor wird auf korrekte Insertion und Sequenz der PCR-Produkte hin überprüft. Sowohl CD40-Fc als auch Fc werden mit Vektor-kodiertem grün fluoreszierendem Protein (GFP) in einem bicistronischen System koexprimiert.

Nach erfolgreicher Klonierung werden elektrokompetente *E.coli* mit den jeweiligen pAdTrack-Shuttleplasmiden und dem adenoviralen Vektor pAd-Easy-I (Q-Biogen) kotransformiert. Die linearisierte virale DNA wird in E1-exprimierende 293-Producerzellen transfiziert und das entstehende Adenovirus über mehrere Runden in den Zellen amplifiziert.

Nach Amplifikation in E1-exprimierenden HEK-293-Producerzellen wird das Virus mit einem Cäsium-Clorid-Gradienten zentrifugiert und somit gereinigt (HE et al. 1998). Die Lagerung des gereinigten Virus erfolgt in einer Nährlösung (PBS und Saccharose) mit 10 %igem Glycerin bis zur Applikation bei -80°C (GRAHAM und PREVEC 1991, ECK und WILSON 1996, HE et al. 1998).

Rekombinante E1- und E3-defiziente Adenoviren (Serotyp 5), die CD40-Fc bzw. Fc exprimieren, werden nach der Methode von HE et al. (1998) im Labor der Firma ProCorde GmbH in Martinsried hergestellt, vermehrt und am Tag der Intervention zur Applikation bereitgestellt. Adenovirale Titer werden durch Anwendung der Plaque-Titration auf HEK-293-Zellen bestimmt.

3.2.5 In-vitro-Expression und Reinigung von CD40-Fc

Um die Genprodukte als Protein zu exprimieren, transfiziert man HEK-293-Zellen mit Plasmid-DNA. CD40-Fc und Fc werden mit Protein-A-Sepharose-Kügelchen (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) aus 1 ml Zellüberstand ausgefällt. Die Identität des rekombinanten Proteins bestimmt man mit einem Peroxidase-konjugierten antihumanen Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) in der Westernblot Analyse.

Eine ergiebigere Proteinreinigung gewinnt man drei Tage nach Infektion mit rekombinanten Adenoviren aus dem Zellüberstand von HeLa Zellen. Proteine fällt man mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung aus und schüttelt über Nacht bei 4 °C. Die Proteinsuspension wird abzentrifugiert (3000 g, 30 Minuten, 4°C), in 0,1 vol. PBS resuspendiert und über Nacht bei 4°C in PBS dialysiert. Die Proteinlösung zentrifugiert man erneut (14000 g, 30 Minuten, 4°C), filtriert sie (0,2 µm) und trägt sie auf eine Protein-Säule auf (HiTrap™ Protein A HP, Amersham Pharmazie Biotech AB, Uppsala, Schweden). Das Protein wird gemäß der Herstellungsangabe eluiert. Die Proteinfractionen werden gesammelt, in PBS über Nacht bei 4°C dialysiert und bei -20°C gelagert.

Gereinigtes Fc und CD40-Fc trägt man auf ein SDS-PAGE auf und markiert es mit Coomassie Blue. Die FITC-Markierung von Proteinen erfolgt unter Verwendung des FITC-Protein-Markierungsprotokolls von Pierce (Rockford, USA).

3.2.6 In-vitro-Bindung von CD40L

Mikrotiterplatten (MaxiSorp, Nalge Nunc Intl.) inkubiert man mit 100 µl pro Well einer 50 nM Fc- oder CD40-Fc-Lösung in PBS über Nacht bei 4°C. Nach dem Waschen mit

0,1 %igem Tween 20 in PBS (PBS-T) und Blocken mit 5 %igem Milchpulver in PBS-T wird CD40L-Flag (Alexis, Grünberg, Deutschland) in unterschiedlichen Verdünnungen in die Wells hinzugegeben. Markierung und Quantifizierung des gebundenen CD40L erfolgt durch einen Anti-Flag-Antikörper (Sigma-Aldrich).

3.2.7 Thrombozyten-Präparation und FACS-Analyse

Man entnimmt drei Milliliter Vollblut aus der A. auricularis des Kaninchens und vermischt es mit 3,13 %iger Natrium-Zitrat-Lösung im Verhältnis 1:10. Die Blutproben werden 20 Minuten mit 55 Umdrehungen/min abzentrifugiert und die obere Phase erneut mit 1000 Umdrehungen/min für 20 Minuten zentrifugiert. Anschließend pelletiert man das Thrombozytenangereicherte Plasma (PRP) mit HEPES Puffer (mmol/L: HEPES 20, NaCl 138, NaH₂ PO₄ 0,5, MgCl₂ 1, KCl 2,9, Glucose 1, pH 6,5). Der Thrombozytenniederschlag wird in 200 µl HEPES Puffer (pH 6,5) resuspendiert und mit HEPES Puffer (pH 7,2) 1:2 gemischt.

Fünf Mikroliter der Plättchen-Suspension versetzt man zur Aktivierung mit 10 U/ml menschlichen Thrombin (Sigma) und inkubiert sie anschließend mit Fc-FITC oder CD40-Fc-FITC (jeweils 100 und 250 nM) plus 50 µl PBS für 30 Minuten. Die erfolgreiche Thrombozytenaktivierung bestätigt man durch anti-CD40L-PE-Antikörper (Pharmingen). Der Nachweis von gebundenem Fc-FITC und CD40-FITC erfolgt mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Becton Dickinson, FACSCalibur).

3.2.8 ICAM-1-Expression auf HUVECs

$7,5 \times 10^4$ Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC) (Clonetics) kultiviert man in 24-Loch-Platten mit EBM Medium und HUVEC Supplement (Clonetics). Nach 24 Stunden erfolgt der Austausch des Medium durch frisches CaCl₂-haltiges Medium (4 mM), und die Vorinkubation mit oder ohne 55 nM humanem CD40L-Flag, 1 µg/ml Enhancer (beides Alexis Corp.), 550 nM Fc oder CD40-Fc für 30 Minuten. Nach weiteren 24 Stunden werden die adhären Zellen mit PE-konjugierten anti-ICAM-1 Antikörpern (anti-CD54, Immunotech) gefärbt und mit 1 %igem Paraformaldehyd fixiert. Die Messung der Expression des ICAM-1 erfolgt mittels Durchflusszytometrie. (Die gesamten In-vitro-Untersuchungsergebnisse wurden unter der Leitung von Dr. med. H.-J. Weig und K. Adler im Herzzentrum München aufgestellt.)

3.2.9 Serumanalyse

Blutprobenentnahme erfolgt aus der A. auricularis media eine Woche vor sowie ein und zwei Wochen nach dem Cross-Clamping. Man zentrifugiert sie fünf Minuten lang bei 1000 Umdrehungen/Minute und das Serum lagert man anschließend bei -20 °C. Die Serumkonzentration von CD40-Fc (bis zu 1:10000 Verdünnung) misst man mit humanem IgG-ELISA-Kit vom Immuno-Tek. Der lösliche CD40-Ligand wird hingegen unverdünnt mit humanem CD40L-ELISA bestimmt.

3.2.10 Untersuchungen und Operationen der Versuchsgruppen

3.2.10.1 Operationsvorbereitung und Anästhesie

Am Versuchstag 0 stehen den Kaninchen bis zum Narkosebeginn Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Zunächst erfolgt eine klinische Untersuchung, mit besonderem Augenmerk auf das Herzkreislaufsystem und den Respirationstrakt und die Ermittlung des Gewichtes des vorgesehenen Kaninchens. Daraufhin wird über einen arteriellen Zugang (Venenverweilkatheter, Vasofix Braunüle[®], 0,9 x 25 mm, B.Braun, 34209 Melsungen) aus der A. auricularis media sinistra Blut entnommen. Aus der hier entnommenen Blutprobe kann man die Parameter CD40-Fc-Immunoadhäsion und CD40-Ligand bestimmen.

Den Tieren werden dann zwei venöse Zugänge über die V. auricularis lateralis sinistra und dextra mit Venenverweilkathetern (Vasofix Braunüle[®], 0,9 x 25 mm, B.Braun, 34209 Melsungen) gelegt, über die dann die Narkoseeinleitung mit Propofol 1 % (Propofol 1 %, Fresenius AG, Bad Homburg) als Bolusinjektion in einer Dosierung von 5 bis 10 mg/kg KGW nach Wirkung erfolgt.

Augensalbe (Dexpanthenol, Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe, Hoffmann La-Roche AG, 79630 Grenzach-Wyhlen) wird sofort nach Narkoseeinleitung auf die Cornea verbracht. Das Tier wird nach Erlöschen des Stellreflexes ventral am Hals und am Abdomen mit einer Schermaschine (Elektra II, Aesculap AG, Tuttlingen) sorgfältig ausrasiert. Um die orotracheale Intubation durchzuführen, schaltet man den Schluckreflex durch eine weitere Gabe von Propofol (ca. 7 mg/kg KGW) aus. Hierzu wird das Kaninchen in Brustlage verbracht und der Hals durch Zug über eine Mullbinde, welche in das obere Incisivipaar

eingehängt ist, in die für die Intubation notwendige Streckstellung gebracht. Die Intubation erfolgt beim Kaninchen blind, unter palpatorischer Kontrolle des Larynx, wobei ein Magill-Tubus mit Cuff (Innendurchmesser 2,5 bis 3,5 mm, Fa. Rüschi AG, Waiblingen) während der Inspiration in die Trachea geschoben wird. Präoperativ erhalten die Tiere bei der Schrittmacherimplantation zur antibiotischen Prophylaxe Sulfadoxin und Trimethoprim (Borgal[®] Lösung 7,5 %, Intervet). Des Weiteren erhalten sie zur Thromboseprophylaxe Heparin (Heparin-Natrium Braun[®], 25000 IE/5 ml, Braun-Melsungen AG, 34209 Melsungen) in einer Dosierung von 200 IE/ kg KGW i.v..

Den Tieren wird darüber hinaus ein Kombinationspräparat, bestehend aus Prednisolon und Dexamethason (Predixon[®], Fa. Chassot, Ravensburg) s.c. appliziert. Dies ist notwendig, um einer Fibrose im Myokard nach Herzschrittmacher-Sondenimplantation entgegenzuwirken. Somit wird eine myokardiale Fibrosierung in der Sondenschraubengegend vermindert, durch welche Schwierigkeiten in der Überleitung entstehen können.

Die Tiere werden während der Operation über ein Perfusionsgerät (Perfusor[®], ED1-300, B. Braun, Melsungen AG) mit 2 %igem Propofol (Disoprivan 2 %, Fresenius AG, Bad Homburg) als Dauertropfinfusion versorgt. Dies geschieht in einer Dosierung von 40 bis 50 mg/kg/h für die OP-Vorbereitung und 80 bis 93 mg/kg/h während der chirurgischen Intervention. Die analgetische Versorgung der Kaninchen erfolgt durch Fentanyl (Braun[®], 0,5 mg/ 10 ml Ampulle, Braun-Melsungen-AG, 34209 Melsungen) in einer Dosierung von 0,01 bis 0,02 mg/kg KGW i.v.. Die Nachdosierung erfolgt nach Bedarf alle 30 Minuten in der Dosierung von 0,01 bis 0,02 mg/kg KGW. Die auftretende Dämpfung des Atemzentrums führt zur Überleitung von der spontanen Atmung zur kontrollierten Beatmung. Die Beatmung des Tieres erfolgt durch ein Kleintierbeatmungsgerät (Anesthesia Workstation, Hallowell EMC, Völker GmbH, Kaltenkirchen) mit 100 % Sauerstoff bei einem Beatmungsdruck von ca. 10 mmHg und einem Beatmungsvolumen von 8 bis 12 ml/kg KGW. Die Beatmungsfrequenz liegt zwischen 29 und 32 Atemzügen pro Minute, wodurch ein CO₂-Partialdruck in der Expirationsluft von ca. 35 mmHg erreicht wird. Das Monitoring der Herzkreislauffunktion des Tieres erfolgt intraoperativ über ein EKG (Medtronic[®], 9790 Programmer, Vitatron Medical B.V., Dieren, Niederlande). Zur Überwachung der Beatmung und des Kreislaufes dienen Pulsoximetrie (Nonin[®], 9847V Model, UL Medical Equipment, Helsinki, Finnland) und Kapnometrie (Datex[®], Datex-Ohmeda, Finnland). Während der gesamten Narkose befinden sich die Kaninchen auf einer elektrischen Wärmematte (Heizkissen, Fa. Beurer, 230V, 60W) und erhalten eine intravenöse Dauertropfinfusion mit Ringer-Lösung (Delta-

Select GmbH, 72793 Pfullingen) in einer Dosierung von 10-15 ml/kg/h. Zur Vorbereitung der Schrittmacherimplantation wird das Kaninchen nun mit gestrecktem Hals und mit nach kaudal ausgebundenen Vorderbeinen in Rückenlage fixiert. Der Operationsbereich wird dann sorgfältig mit Cutasept[®]-Lösung (Bode Chemie, Hamburg) entfettet und mit Braunoderm[®], Alkoholische Lösung (B.Braun, 34209 Melsungen) desinfiziert.

3.2.10.2 Schrittmacherimplantation

Zuerst wird die Präparation der V. jugularis externa dextra durchgeführt. Die Inzision erfolgt paramedian entlang der Trachea, hierbei werden die Haut und der darunter liegende Hautmuskel im rechten kaudoventralen Halsbereich ca. 2 cm lang durchtrennt. Der Zugang zur V. jugularis dextra erfolgt durch stumpfes Präparieren bis das Gefäß durch die darüber liegende Hautfaszie sichtbar wird und weiterer Präparation aus dem benachbarten Fettgewebe. Nach der lockeren Fixation der V. jugularis dextra mit zwei Unterbindungsschlingen (Vicryl[®], 3-0, V452, Ethicon) wird die kraniale Schlinge ligiert. Die kaudale Unterbindungsschlinge wird so weit angezogen, dass der Blutfluss gehemmt und das Gefäß leicht gespannt ist. Daraufhin kann das Gefäß zwischen den Unterbindungsschlingen halbblutig eröffnet und ein zentralvenöser Katheter (ZVK) (Cavafix[®], Fa. Braun, Melsungen AG, Deutschland; Innendurchmesser: 1,1 mm) als Führungsschiene für die Herzschrittmachersonde eingeführt werden. Unter Röntgenkontrolle (Röntgengerät: Siremobil 3H, Fa. Siemens, Deutschland) und über einen Mandrin erfolgt das Einführen des Katheters in den rechten Ventrikel des Herzens, wobei die Katheterspitze nach Entfernen des Mandrins im Apexbereich des rechten Ventrikels positioniert wird. Bei der Lagekontrolle über das EKG werden bei Berührung der Ventrikelwand mit dem Kathetermandrin deutliche ventrikuläre Extrasystolen aufgezeichnet (siehe *Abbildung 13*). Somit kann die korrekte Lage der Sonde bestimmt werden. Nun wird der Mandrin herausgezogen, um durch den Katheter eine Herzschrittmachersonde (Model 10494 DST, Fr. 2, Medtronic[®] GmbH), welche an der Spitze mit einem feinen Schraubgewinde verbunden ist, einzuführen. Diese Herzschrittmachersonde wird unter Röntgenkontrolle im Apexbereich des rechten Ventrikels durch rechtsseitiges Eindrehen des Schraubengewindes der Sonde endokardial fixiert (siehe *Abbildung 15*).

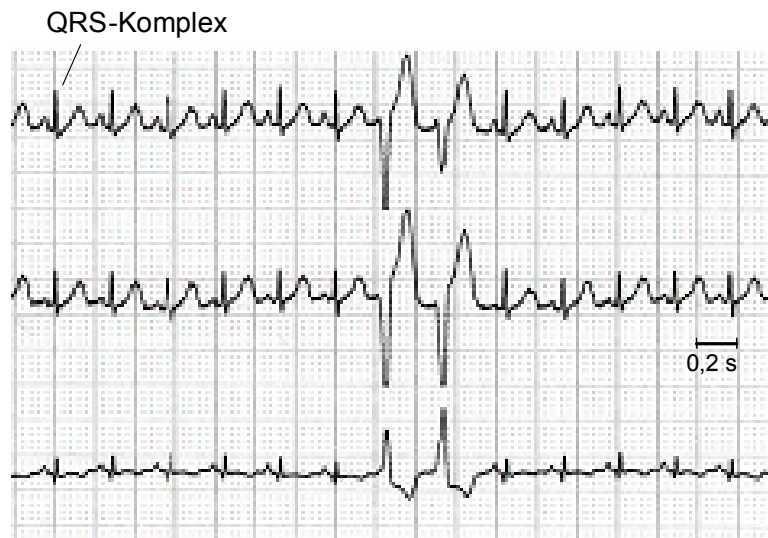


Bild A

Abbildung 13

EKG, Kaninchen.
Durch die Sonden-
implantation
hervorgerufene
Extrasystolen

Durch leichten Zug ist die korrekte Verankerung zu überprüfen, die sich wiederum im EKG als ventrikuläre Extrasystolen (siehe *Abbildung 13A*) darstellt. Der Katheter wird vorsichtig über die im Herzen fixierte Sonde nach kranial aus der V. jugularis dexter zurückgezogen. Eine Ligatur (Vicryl[®], 3-0) fixiert schließlich die Herzschrittmachersonde und das Gefäß im Halsbereich.

Auf die Sondenimplantation folgt nun die Schrittmacherimplantation. Ein zweiter ca. 4 cm langer Schnitt durchtrennt die Haut und die Subkutis mit darunter liegendem Hautmuskel im Bereich ventral am Abdomen. Die Schnittführung erfolgt parallel zum letzten Rippenbogen, ca. 1 cm kaudal davon entfernt in einem Winkel von 45°. Zwischen dem sich darstellenden M. obliquus externus und dem Hautmuskel wird die Hauttasche stumpf präpariert. Ihr Durchmesser beträgt mindestens 6 cm, so dass das 5 x 4 x 0,7 cm große Herzschrittmachergerät ohne Spannung Platz findet. Von der Schrittmachertasche aus führt man eine 8 cm lange Hohnadel (Innendurchmesser: 1,4 mm, Fa. Braun, Melsungen) subkutan bis zu der Stelle, an der die Herzschrittmachersonde aus der V. jugularis dextra austritt und schiebt die Sonde durch die Hohnadel bis zur Herzschrittmachertasche. Hier wird die Sonde mit dem Herzschrittmacher (Vita[®] 2, DDD- Model 730, 6950-Dieren, Niederlande) fixiert.

Anschließend wird der Schrittmacher in der Hauttasche platziert und dessen Funktion am EKG (siehe *Abbildung 14 B*) überprüft. Hierbei zeigt das EKG deutliche Schrittmacherimpulse mit darauffolgender Kammererregung (starke Verbreiterung des QRS-Komplexes).

Die Muskelschicht wird fortlaufend mit Vicryl[®] (3-0, Fa. Ethicon, V 452, resorbierbar, Norderstedt) genäht und die Haut mit Einzelheften (Nylon[®], 2 metric, 3-0 USP, nicht resorbierbar, Fa. Resorba, 90443 Nürnberg) adaptiert.

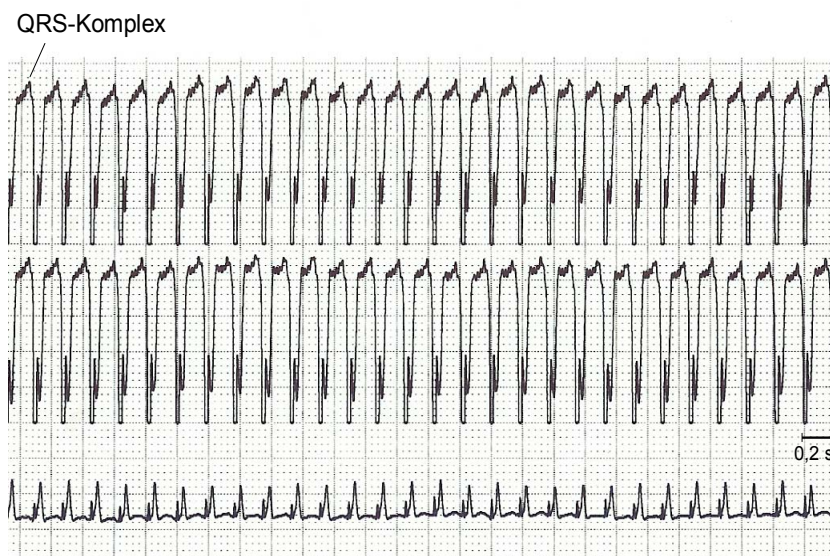


Bild B

Abbildung 14

EKG,
Kaninchen
Schrittmacher-
impulse,
Frequenz 320
bpm

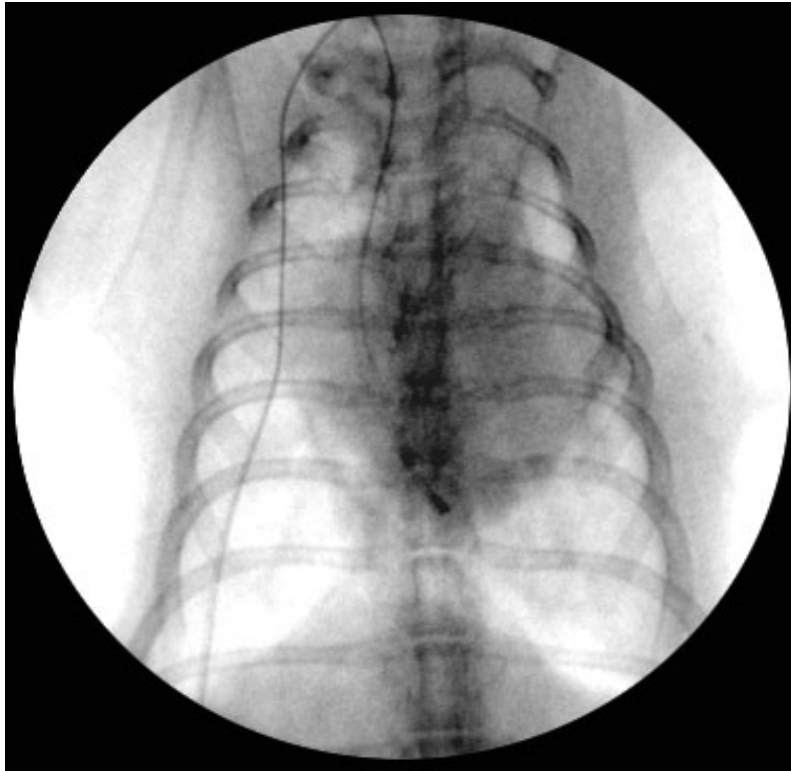


Abbildung 15 Röntgenkontrolle Thorax mit Sonde im rechten Ventrikel

3.2.10.3 Adenoviraler Gentransfer durch Cross-Clamping

Nach der Herzschrittmacherimplantation erhalten die Tiere eine Rekonvaleszenzzeit von 6 Tagen. Der Gentransfer wird nach Thorakotomie mit Hilfe der Cross-Clamping-Technik durchgeführt. Die Narkose erfolgt wie bei der Schrittmacherimplantation. Vor der Operation erhalten die Tiere zur Thromboseprophylaxe Heparin (Heparin-Natrium Braun[®], 25000 IE/ 5 ml, Braun-Melsungen AG, 34209 Melsungen) in einer Dosierung von 200 IE/kg KGW i.v.. Als Antihistaminikum wird Cimetidinhydrochlorid (Tagamet[®], GlaxoSmithKline, München) in der Dosierung von 5 mg/kg KGW mit NaCl-Lösung verdünnt und der H₁-Antagonist Dimetindenmaleat (Fenistil[®], Novartis Consumer Health GmbH, München) 0,1 mg/kg KGW (mit NaCl-Lösung verdünnt) nacheinander langsam i.v. infundiert.

Die A. carotis communis sinistra wird im Halsbereich stumpf präpariert. Die Virusapplikation erfolgt über diese Arterie, indem ein Polyurethan-Katheter (Cavafix[®], 1.1* 1.1 mm/16G, REF 4173589, Fa. B. Braun Melsungen AG, 34209 Melsungen) im Bulbus aortae vor den Koronarien positioniert wird. Nach der Positionierung des Katheters führt man eine Thorakotomie

in rechter Seitenlage durch. Der Zugang erfolgt über den 2. Interkostalraum. Kurz nach der Virusapplikation verabreicht man Methylprednisolon-21-hydrogensuccinat (Urbason® soluble, Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt a. M.) 10 mg/kg KGW i.v..

Nach der Eröffnung des Perikards macht man mit Hilfe eines Deschamps eine lockere Umschlingung der Aorta und der A. pulmonalis im Herzbasisbereich mit einer Ligatur (Vicryl®, 3-0), um während der Virusapplikation eine Okklusion dieser Gefäße durchzuführen. Unter Röntgenkontrolle (Siremobil® 3H, Fa. Siemens) platziert man die Katheterspitze im Bulbus aortae (siehe *Abbildung 16*). Nachdem die exakte Position erreicht ist, wird die Blutzirkulation im Herzen, durch Zuziehen der Ligatur und damit induzierter Okklusion der Aorta und A. pulmonalis, unterbunden (Cross-Clamping). Gleichzeitig wird der Katheter mit NaCl-Lösung (1-2 ml) gespült und anschließend die Virussuspension ($4 \cdot 10^{10}$ pfu) appliziert. Zum Abschluss spült man den Katheter wiederum mit NaCl-Lösung. Sofort nach der Virusapplikation stellt sich der Blutfluss durch Öffnen der Ligatur wieder her. Der ganze Prozess des Clamping dauert zwischen 10 und 15 Sekunden. Nach Entfernung der Ligatur erfolgt die Rückverlagerung des Herzens in den Herzbeutel. Nach Blähung der Lunge verschließt man den Thorax durch Umschlingen der zweiten und dritten Rippe mit zwei Einzelheften aus Nylon® (3 metric, 2-0 USP, Fa. Resorba, Nürnberg). Die Muskulatur wird durch fortlaufende Nähte mit Vicryl® (3-0, Ethicon) adaptiert und die Haut mit Einzelheften aus Nylon®

(3 metric, 2-0 USP, Fa. Resorba, Nürnberg) am Thorax und Hals verschlossen.

Die Tiere werden bis zum Abfluten des Propofol und dem Wiedereinsetzen der Spontanatmung noch am Beatmungsgerät belassen. Nachdem die selbstständige Atmung und der Schluckreflex wieder vorhanden sind, extubiert man die Kaninchen und versorgt sie mit 100 % Sauerstoff bis zum Wiederkehren des Stellreflexes. Schließlich bringt man die Tiere in Einzelboxen und hält sie bis zum vollständigen Erwachen warm (Wärmflasche).

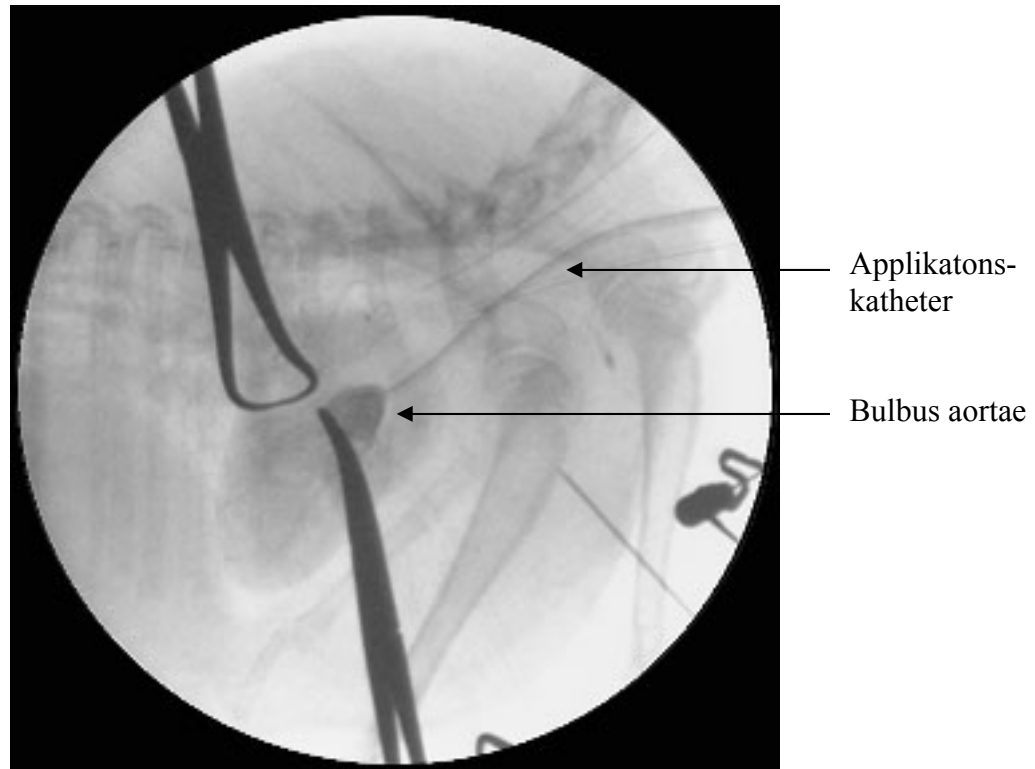


Abbildung 16 Röntgenkontrolle beim Cross-Clamping mit Kontrastmittel

3.2.10.4 Postoperative Versorgung

Zur postoperativen Analgesie und als Antiphlogistikum erhalten die Kaninchen über einen Zeitraum von 72 Stunden Carprofen (Rimadyl[®], Pfizer) s.c. in einer Dosierung von 4 mg/kg KGW und 0,01mg/kg KGW Buprenorphin s.c. (Temgesic[®], Fa. Boehringer, Mannheim).

In den Tagen nach der Operation wird besonderes Augenmerk auf das Allgemeinbefinden und die Futter- und Wasseraufnahme der Kaninchen gerichtet. Die Operationswunden werden mehrmals täglich kontrolliert. Die Tiere erhalten über die Dauer des Versuchszeitraumes im Abstand von jeweils 3 Tagen das bereits erwähnte Prednisolon-Dexamethason-Kombinationspräparat (Predixon[®], 1 mg/kg KGW s.c.) um eine antivirale Immunantwort zu unterdrücken.

3.2.10.5 Aktivierung und Impulserhöhung des Herzschrittmachers

Am 9. Versuchstag, zwei Tage nach der ersten echokardiographischen Messung und der Thorakotomie, wird der Herzschrittmacher aktiviert und auf eine Impulsfrequenz von 320 bpm eingestellt. Die Impulsdauer stellt man auf 0,4 bis 0,5 Millisekunden und die Spannung auf 3,8 Volt ein. Über eine angelegte EKG-Ableitung und den EKG-Monitor kann man die Impulsüberleitung des Schrittmachers, welche das Herz auf eine kontinuierliche Frequenz von 320 Schlägen pro Minute stimuliert, kontrollieren (siehe *Abbildung 14 B*). Am Versuchstag 14 erfolgt die Überprüfung der Impulsübertragung des Herzschrittmachers wieder durch Aufzeichnung eines EKG's. Für die Dauer der zweiten echokardiographischen Untersuchung wird der Herzschrittmacher auf die niedrigste Impulsfrequenz des Gerätes (160 Schläge pro Minute) programmiert, welche unter der physiologischen Herzfrequenz (180 bis 250 Schläge pro Minute) der Tiere liegt. Anschließend erfolgt die oben beschriebene Herzschrittmacherprogrammierung wieder in Form einer Frequenzerhöhung auf 360 bpm. Am 21. Versuchstag kontrolliert man die Schrittmacherfunktion erneut durch eine EKG-Ableitung und stellt sie wieder für die dritte echokardiographische Untersuchung und die abschließende hämodynamische Messung auf die niedrigste Impulsfrequenz ein.

3.2.10.6 Untersuchungen und Messungen

3.2.10.6.1 Klinische Untersuchung

Die Beobachtung der Kaninchen im Zeitraum nach der Operation kann durch das Einstellen in Einzelkäfige gut durchgeführt werden. Der Schwerpunkt der regelmäßigen Allgemeinuntersuchungen liegt auf der Futter- und Wasseraufnahme, dem Kot- und Harnabsatz sowie der Beurteilung der Ausprägung klinischer kardiovaskulärer Symptome (Tachypnoe, Haut- und Schleimhautblässe, periphere Vasokonstriktion und Ödembildung).

Da diese Symptome individuell unterschiedlich sind, werden sie im Einzelfall beurteilt, aber nicht vergleichend quantifiziert.

3.2.10.6.2 Linksventrikuläre Funktionsbestimmung per Ultraschall

Die echokardiographische Untersuchung der Tiere erfolgt am 7., 14. und 21. Tag des Versuchszeitraumes. Die Messung vor dem Gentransfer dient als Basalwert. Wie schon beschrieben, wird der Herzschrittmacher vor der Ultraschalluntersuchung ausgeschaltet. Man ermittelt die Daten der ersten und dritten Messung in Narkose (Tag 7 und 21). Über die Narkosezeit kann man die Herzfrequenz während der Messung zwischen 200 bis 220 bpm einstellen. Dies ist wichtig, da die Herzfrequenz und die ventrikuläre Verkürzungsfraktion (FS), die sich aus anatomischen Parametern, wie dem enddiastolischen Durchmesser und dem endsystolischen Durchmesser des linken Ventrikels errechnen, eine positive Korrelation zeigen (RYU et al. 1997). Die zweite Messung (Tag 14) dient als Verlaufskontrolle. Um narkosebedingte Komplikationen zu vermeiden, werden die Tiere hierfür wach gemessen.

Für die sonographische Funktionsuntersuchung des linken Ventrikels verwendet man ein Ultraschallgerät (GE Vingmed Ultrasound, CFM/ S5/ Vivid Five, Seriennummer 1015, 42655 Solingen) und einen Schallkopf mit 10 MHz (FPA, 10 MHz, Fa. GE Medical Systems, 42655 Solingen). Die Tiere werden dazu, nachdem sie ventro-lateral am rechten Thorax geschoren wurden, in Bauchlage auf einem Untersuchungsgestell positioniert, welches eine Aussparung im Thoraxbereich für den Schallkopf hat. Der linke Ventrikel wird nun im B-Mode parasternal im Kurzachsenschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln dargestellt (siehe *Abbildung 17*). Als Eindringtiefe wählt man 4 cm. Im M-Mode (Motion-Mode) bestimmt man den enddiastolischen (LVDD), den endsystolischen Durchmesser (LVDs) des linken Ventrikels, die Septumdicke und die Dicke der lateralen Außenwand über vier Herzzyklen pro Untersuchung (siehe *Abbildung 18*).

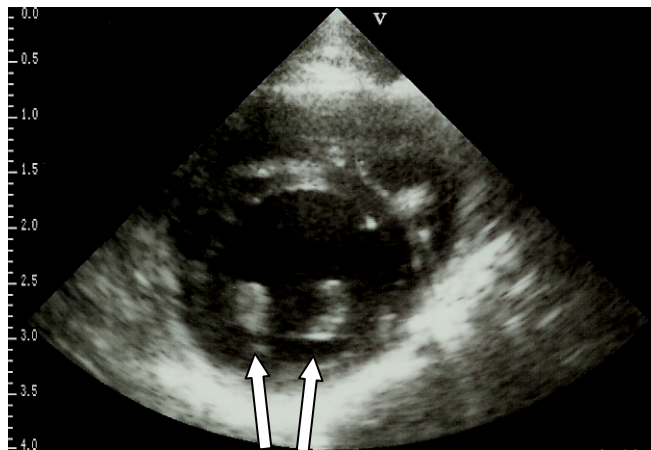
Die linksventrikuläre Verkürzungsfraktion (fractional shortening = FS) kann aus den Werten des endsystolischen und des enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels errechnet werden. Über den LVDs und LVDD und die Wanddicke können die anatomischen Veränderungen des linken Ventrikels (verminderte Wanddicke) direkt quantifiziert werden. Die Fractional Shortening (FS) ist die prozentuale fraktionelle Durchmesserverkürzung des linken Ventrikels, ein wichtiger Parameter der systolischen Funktion des linken Ventrikels. Sie lässt sich nach folgender Formel errechnen:

$$FS (\%) = \frac{LVDD - LVDs \times 100}{LVDD}$$

LVDD = enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels

LVDs = endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels

Die Angabe der FS erfolgt als Prozentzahl (DE MENESES et al. 1989).



Papillarmuskeln

Abbildung 17

Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels, B-Mode, rechts parasternaler Kurzachsenschnitt auf Papillarmuskelhöhe am Tag 21 (AD-GFP-Fc-Gruppe)

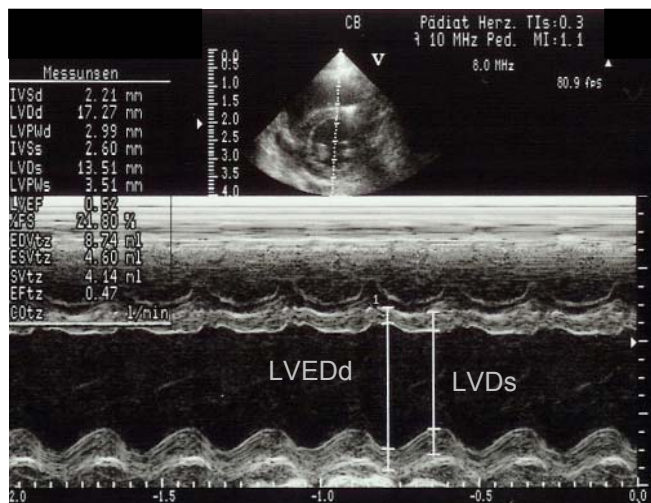


Abbildung 18

Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels im M-Mode, rechts parasternaler Kurzachsenschnitt auf Höhe der Papillarmuskeln am Tag 21 (Ad-GFP-Fc-Gruppe)

3.2.10.6.3 Linksventrikuläre Funktionsbestimmung per TIP-Manometrie

Die Untersuchung erfolgt am letzten Tag des Versuchszeitraumes (Tag 21) unter Allgemeinanästhesie, wie in Kapitel 3.2.10.1 beschrieben. Die Tiere werden im Halsbereich ausgeschoren und in Rückenlage fixiert.

Für einen Zugang zur A. carotis communis dextra werden die Haut und der Hautmuskel paramedian auf der rechten Seite am kaudoventralen Abschnitt des Halses inzidiert.

Durch stumpfe Präparation wird die zwischen M. sternohyoideus und M. sternomastoideus gelegene A. carotis communis dextra dargestellt. Der Truncus vagosympathicus ist von dieser stumpf abzupräparieren. Nun werden zwei Haltefäden (Vicryl[®], 3-0) um die A. carotis communis gelegt, wobei die kranial gelegene ligiert und die kaudal gelegene soweit gespannt wird, dass der Blutaustritt bei der sich anschließenden halbblumigen Gefäßinzision minimiert wird.

Nun wird in die Arterie eine Gefäßschleuse (Radiofocus[®], Introducer II, Fr. 4, 11 cm, Fa. Cordis, 3001- Leuven, Belgien) eingeführt. Für die intraventrikuläre Druckmessung wird über die Gefäßschleuse ein Mikro-TIP-Katheter (Mikro-TIP-Katheter[®], Mod.-Nr. SPR-249, Fa. Millar Instruments INC, Houston, Texas, USA) in die A. carotis communis eingeführt. Der Katheter wird durch die Aorta und über die Aortenklappenebene hinweg in den linken Ventrikel geschoben, so dass der an der Katheterspitze befindliche Drucksensor frei im linken Ventrikel liegt und eine ventrikuläre Druckkurve auf dem Gerätedisplay erscheint. Mit der Datenerfassungssoftware (Haemodyn[®], Fa. Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, 79232 March-Hugstetten) werden die Daten digitalisiert. Erfasst werden der maximale systolische Druck im linken Ventrikel (LVsys), der linksventrikuläre enddiastolische Druck LV EDP, die Herzfrequenz (HR) und die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit und Druckabfallsgeschwindigkeit (LVPdp/dt max bzw. min), die sich aus der Druckveränderung pro Zeiteinheit (dp/dt) errechnet. Nachdem man Basalwerte erfasst hat, wird das Myokard zum Test auf die kontraktile Reserve mit einem intravenös verabreichten, synthetischen Katecholamin (Isoprenalin) in aufsteigenden Konzentrationen stimuliert.

Die Isoprenalin-Dosierungen 0,1; 0,5; 1,0 µg/kg/min werden über einen Perfusor (Perfusor[®] Compact, Fa. B. Braun, Melsungen) über jeweils 10 Minuten verabreicht.

Während dieser Zeit (insgesamt 30 Minuten) werden die oben aufgeführten Druckparameter und die Hämodynamik fortlaufend aufgezeichnet.

3.2.10.7 Herzschrittmacherexplantation und Euthanasie

Wie bereits im Kapitel 3.2.10.1 beschrieben, legt man die Tiere am letzten Versuchstag, dem Tag 21, in Narkose. Nachdem die TIP-manometrischen Messungen erfolgt sind, euthanasiert man die Kaninchen in tiefer Narkose mit Pentobarbital (Pentobarbital-Natrium, Narcoren[®], 0,48 g/kg KGW, Merial GmbH, Hallbergmoos) i.v..

Die Hautinzision erfolgt nun mit einem 4 cm langen Schnitt am kaudalen Rand der Herzschrittmachertasche. Durch vorsichtige Präparation explantiert man den Herzschrittmacher. Die Sonde präpariert man an der Eintrittsstelle in die V. jugularis dextra am Hals des Tieres unter Schonung der Sondenisolierung frei und entfernt sie nach Lösung der Gefäßligatur aus dem Herzen.

3.2.10.8 Postmortale makropathologische Diagnostik und Probengewinnung

Nach Eintritt des Todes entnimmt man den Tieren das Herz möglichst frisch und asserviert es für weitere Ex-vivo-Untersuchungen. Hierfür erfolgt eine beidseitige Durchtrennung der Brustwand auf Höhe der Rippenknorpelgrenze wodurch man den Brustkorb eröffnet.

Das Herz wird nach Durchtrennen der zu- und abführenden Gefäße entnommen und nach makroskopischer Beurteilung in kalter mit 5000 IE Heparin versehener steriler NaCl-Lösung (Isotonische Natriumchloridlösung, DeltaSelect[®] GmbH, 72739 Pfullingen) blutleer gewaschen. Nach pathologisch-anatomischer Beurteilung und Gewichtsbestimmung erfolgt die Asservierung des Herzens zur weiteren Untersuchung.

Für die immunzytochemische Untersuchung werden die dafür vorgesehenen Herzgewebeteile ebenfalls in steriler Kochsalzlösung gewaschen und in Probenröhrchen bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

Die Obduktion der Versuchstiere erfolgt gemäß den Richtlinien veterinärmedizinischer Bildungsstätten (GEISEL 1976). Im Rahmen der Untersuchungen liegt das Hauptaugenmerk vor allem auf der Beurteilung der Ausprägung typischer Herzinsuffizienzsymptome wie Aszites, Pleuraerguss, Herzgewicht, Herzform und Leberstauung. Diese Parameter werden aber aufgrund der individuellen Unterschiede nicht vergleichend quantifiziert.

3.2.11 Nachweis von GFP im Herzgewebe

Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP

GFP dient als Markergen für die Expressionseffizienz in der CD40-Fc-Gruppe und der GFP-Fc-Gruppe. Unter dem Fluoreszenzmikroskop (Inverse Microscope Axiovert 25, Fa. Zeiss, Jena, Germany) wird die Expression von GFP in Kryoschnitten (Parallelschnitte in 3 Schnittebenen zwischen Apex, Papillarmuskelebene und Herzbasis) stichprobenartig in den Versuchsgruppen untersucht. Das Herz wird direkt nach der Euthanasie entnommen, mit steriler NaCl-Lösung (Isotonische Natriumchloridlösung, DeltaSelect[®] GmbH, 72739 Pfullingen) gewaschen und bei -80°C kältefixiert. Anschließend werden unter Verwendung eines Gefrierkryotoms (Cryocut E 6588, Leica, Fa. Reichert- Jung, München) in den drei Schnittebenen Gewebsschnitte mit einer Dicke von 40 µm angefertigt. Mit Hilfe eines Filters der Wellenlänge von 450 bis 490 nm wird das grün fluoreszierende Protein (GFP) bei einer 100-fachen Vergrößerung sichtbar gemacht.

In den Schnitten des Myokards beider Gruppen (Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe und Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe) wird eine deutliche Expression erreicht, was für eine gute Virus-transfektion spricht (siehe *Abbildung 19*).

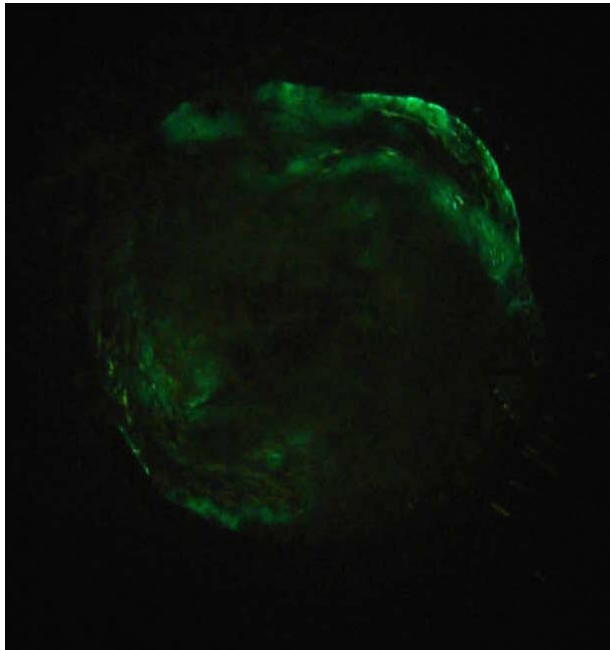


Abbildung 19 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von GFP in Gefrierschnitten des Herzens

Immunhistochemischer Nachweis von GFP

Um den Nachweis der GFP-Expression noch besser zu visualisieren, wurde auch ein histochemischer Nachweis des Markergens an Herzen der CD40-Fc-Gruppe und der GFP-Fc-Gruppe durchgeführt.

Für den immunhistochemischen Nachweis werden Parallelschnitte in 3 Schnittebenen zwischen Apex, Papillarmuskelebene und Herzbasis mit jeweils 2 Schnitten pro Sektion mit einer Schnittdicke von je 6 µm (Gefrierkryotom: Cryocut E 6588, Leica, Fa. Reichert- Jung, München) stichprobenartig in den Versuchsgruppen untersucht.

Die Gefrierschnitte werden nach PBS-Zugabe mit einem monoklonalen Anti-GFP-Antikörper (Monoclonal Anti-Green-Fluorescent Protein (GFP), Clone GFP-20, Mouse Ascites Fluid, Sigma, 89552 Steinheim) in FBS (Fetales bovines Serum, Sigma, 89552 Steinheim) -haltigem 1% Tritonpuffer für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle werden Parallelschnitte lediglich mit PBS inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wird ein biotinylierter Sekundärantikörper (Anti-Mouse Immunglobulin-Bio / Dako A/S, Dänemark) für 30 Minuten hinzugegeben. Anschließend wird wieder mit PBS gewaschen. ABC (Stept-ABCComplex/ HRP, Dako A/S, Dänemark) wird für weitere 30 Minuten hinzugegeben und danach mit Tris gepuffert. Vor der letzten Waschung mit PBS wird für 10 Minuten DAB Chromogen (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, DakoCytomation A/S, Dänemark) hinzugefügt. Nach Zugabe von destilliertem Wasser werden die Schnitte in Konzentrationen von 70 %, 95 % und 100 %igem Ethanol dehydriert und mit Essigsäure-n-butylester (99 %, Roth, 76185 Karlsruhe) gewaschen. Abschließend wird mit Permout[®] (Fisher Scientific, New Jersey, USA) fixiert. Die GFP-Expression wird schließlich durch einen braunen Farbumschlag, welcher durch die Peroxidase hervorgerufen wird, sichtbar (siehe *Abbildung 20*).

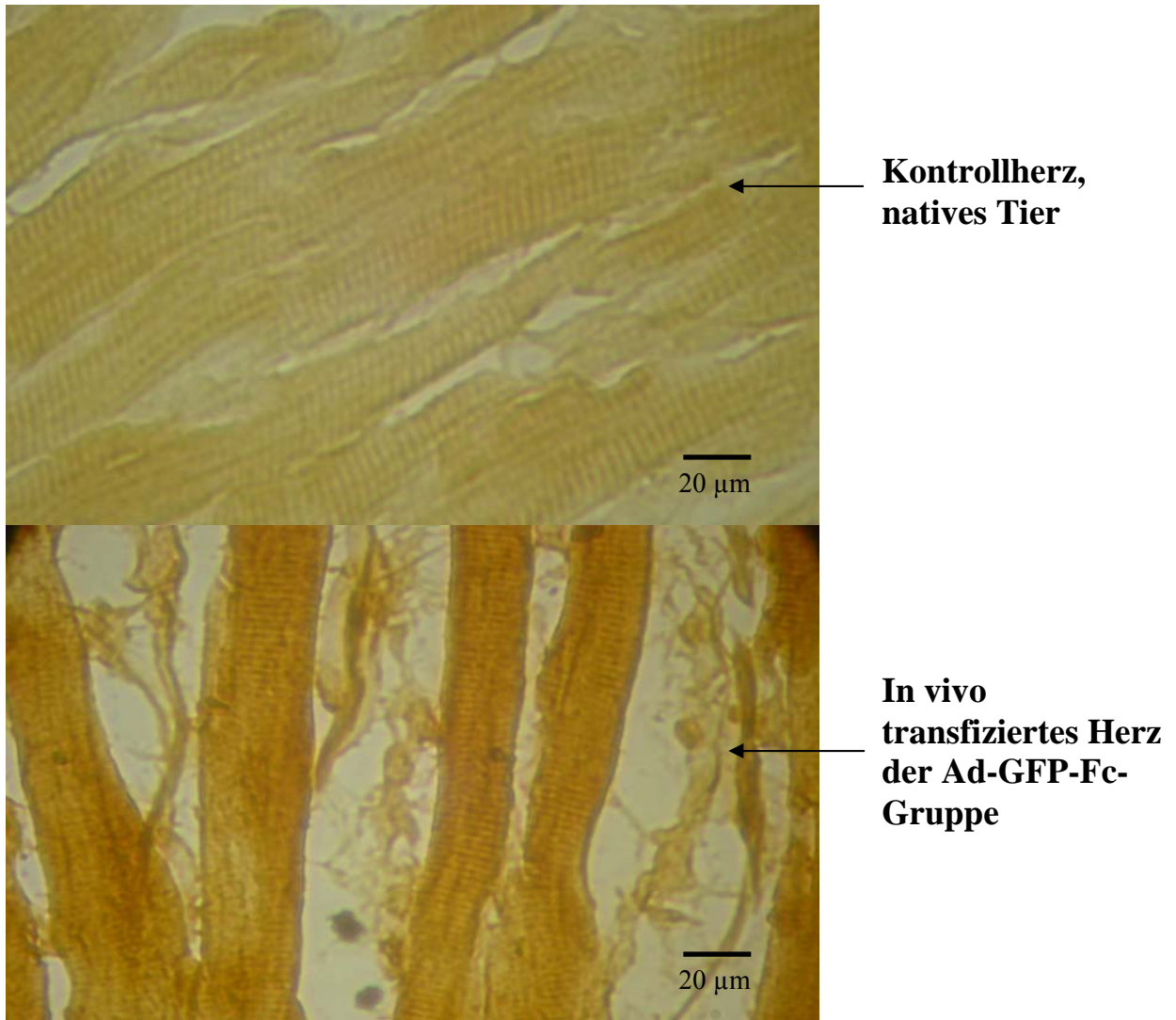


Abbildung 20 Immunhistochemischer Nachweis von GFP im Myokard im Vergleich zu einem Kontrollherz eines nativen Tieres

3.3 Statistische Auswertung

Der Mittelwert (MW, arithmetisches Mittel) und die Standardabweichung (SD) bzw. der Standardfehler (SEM) werden aus den Einzelwerten der jeweiligen Versuchsgruppen ermittelt. Zur Beurteilung der Kontraktilität und der Hämodynamik des Herzens finden die Daten der Ultraschalluntersuchung (fractional shortening, endsystolischer und enddiastolischer Durchmesser des linken Ventrikels, Dicke des interventrikulären Septums und der lateralen Wand des linken Ventrikels) und die Ergebnisse der TIP-Kathetermessungen (maximaler systolischer Druck im linken Ventrikel, maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit und Druckabfallsgeschwindigkeit im linken Ventrikel, linksventrikulärer Druck in der Enddiastole) Verwendung. Weiterhin werden das Körpergewicht und die Herzfrequenz der Versuchstiere ermittelt.

Der Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt wird mit Hilfe der parametrischen Varianzanalyse ANOVA mit dem LSD-Test (least significant difference) als Post-hoc-Test durchgeführt.

Zur statistischen Sicherung von signifikanten Unterschieden zwischen den Messwiederholungen (Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe) wird das allgemeine lineare Modell (general linear model) mit dem t-Test für verbundene Stichproben als Post-hoc-Test verwendet. Alle Tests werden zweireihig durchgeführt.

Als Programm wird die SPSS-Version 11.5 (statistical program for social sciences) verwendet.

Als Signifikanzniveau wird die Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ als signifikant festgelegt.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Ergebnisse der Vorversuche

Expression und funktionelle Charakterisierung von CD40-Fc-Immunoadhäsın

Virus-kodierte Proteine werden erfolgreich in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK, human embryonal kidney) exprimiert, aufgereinigt und Gel-elektrophoretisch analysiert (siehe *Kapitel 3.2.5* und *Abbildung 21 A*). Die Coomassie-Färbung zeigt eine mindestens 90 % reine Proteinpräparation ohne Nachweis von Kontaminations- beziehungsweise Degradationsprodukten. Die Proteingröße entspricht den rechnerischen Molekulargewichten von 26 kD für Fc und 45 kD für CD40-Fc.

Die Bindung des CD40-Fc-Immunoadhäsins an den Ligand CD40L kann mit ELISA in vitro gemessen werden. Mit Fc oder CD40-Fc beladene Titrationsplatten werden mit aufsteigenden Konzentrationen von CD40L inkubiert (*Abbildung 21 B*). Eine Sättigung der CD40-Fc-CD40L-Bindung wird bei ca. 50 nM erreicht, während Fc bei gleicher CD40L-Konzentration nur geringe Mengen des Liganden binden kann. Die Bindung ist somit spezifisch für den CD40-Anteil des Fusionsproteins. Die halb-maximale Bindung von CD40L an CD40-Fc wird bei 10 nM Ligand-Konzentration erreicht.

Um die Bindungseigenschaften von CD40-Fc mit dem spezifischen CD40-Liganden in vivo zu untersuchen, werden Thrombozyten aus Kaninchenblut gewonnen und mit Thrombin stimuliert. In der durchflusszytometrischen Untersuchung kann nach Thrombozytenaktivierung eine 2,8-fache Steigerung der CD40L-Expression im Vergleich mit ruhenden Blutplättchen nachgewiesen werden (*Abbildung 22 A*).

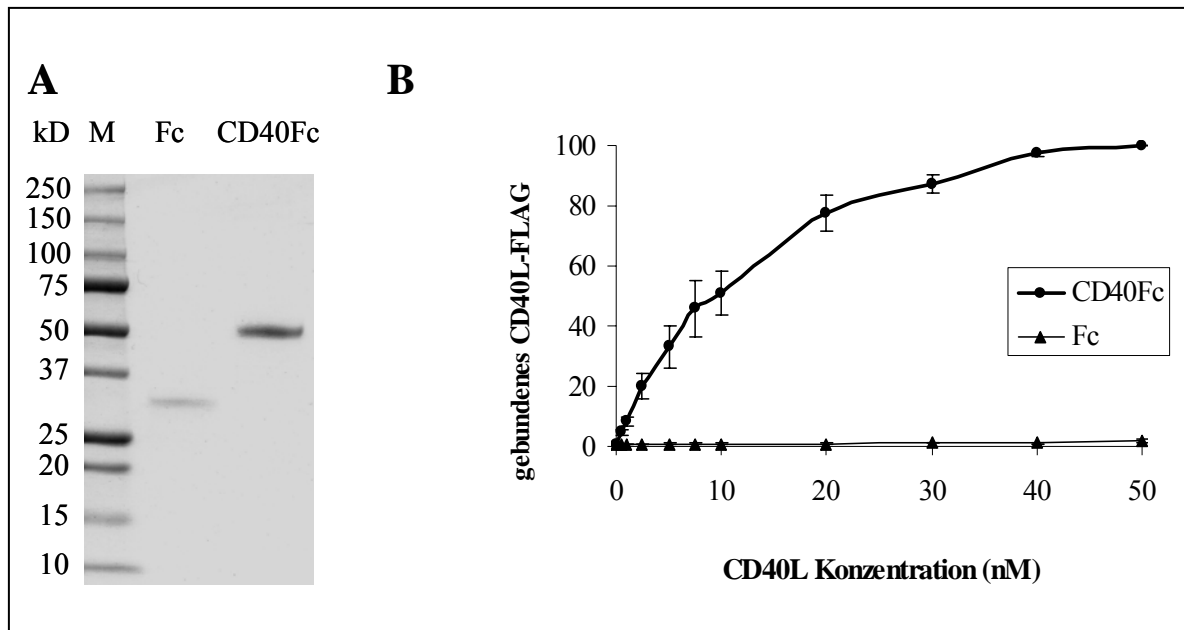


Abbildung 21

In-vitro-Charakterisierung von rekombinatem Fc-Fragment und CD40-Fc. kD = Kilodalton, M = Marker, nM = nanomolar

- A) 4µg der mit Protein-A aufgereinigten Proteine werden pro Bahn aufgetragen und mit Coomassie-blue gefärbt
- B) Bindung von CD40L-Flag an immobilisiertes Fc (Dreiecke) oder CD40-Fc (Kreise). Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten werden gezeigt (Normalisierung auf 50 nM CD40L)

Zur weiterführenden Charakterisierung der Bindungsaffinität erfolgt die Inkubation von Thrombozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fluoreszenz (FITC)-markierten CD40-Fc bzw. Fc in Kombination mit nicht markiertem Fc. Der Zusatz von fluoreszenzfreiem Fc unterbindet dabei potentielle unspezifische oder Fc-Rezeptor-vermittelte Bindungen der Fc-Region des Fusionsproteins. In einer FACS-Analyse kann gebundenes FITC-markiertes Protein direkt gemessen werden. Die *Abbildung 22 B* zeigt, dass die Bindung von CD40-Fc nach Aktivierung im Vergleich mit unstimulierten Plättchen konzentrationsabhängig um den Faktor 12,5- (100 nM) beziehungsweise 23,3-fach (250 nM) zunimmt, während Fc 2,0- (100 nM) bis 5,2-fach (250 nM) stärker binden kann. Die CD40-Fc-Bindung an CD40L ist spezifisch.

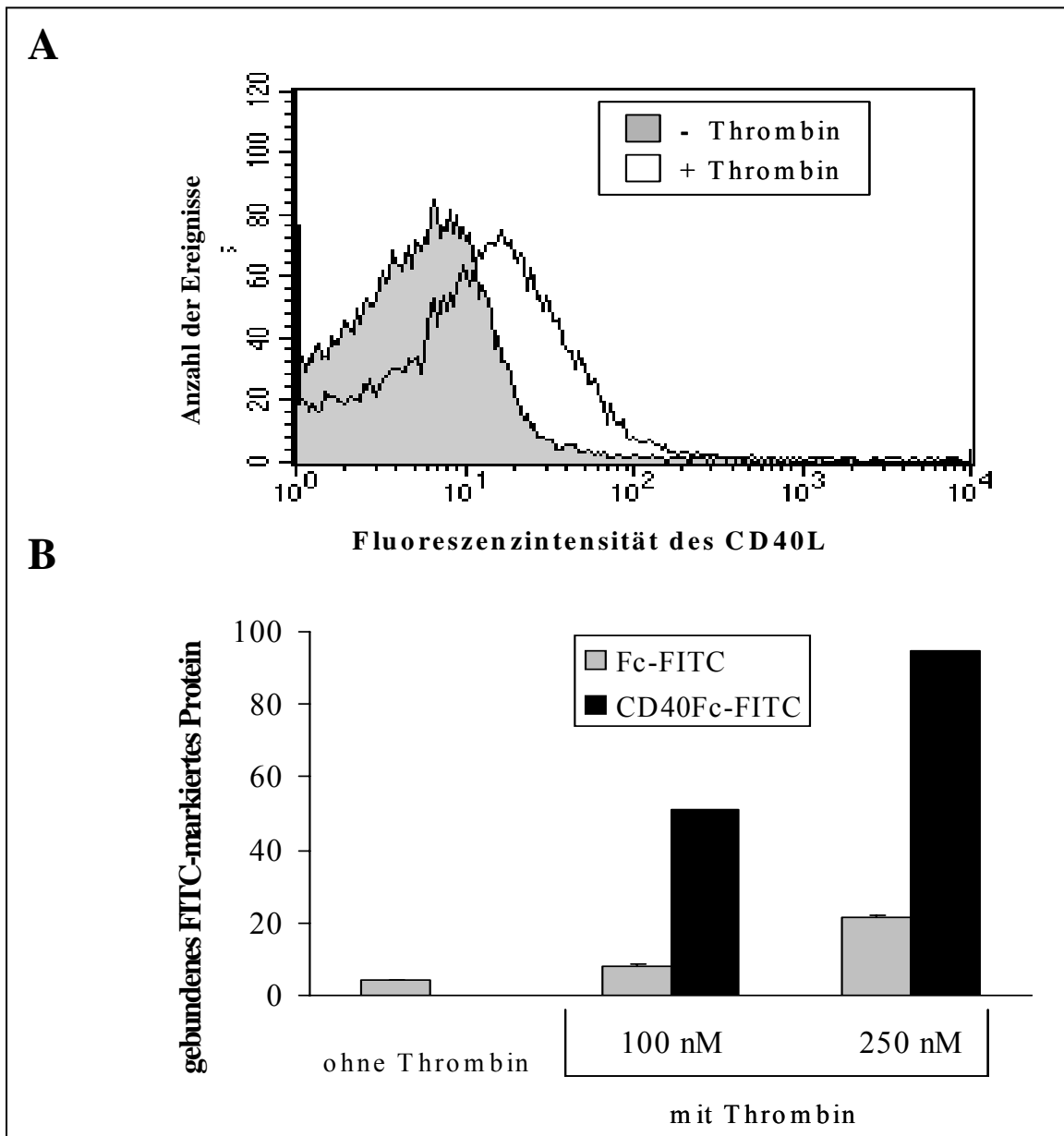


Abbildung 22 A) Bindung von Fc und CD40-Fc an nicht stimulierte und an Thrombin - stimulierte Thrombozyten von Kaninchen. Die Oberflächenexpression von CD40L ist in der Durchflusszytometrie gemessen. FITC = Fluoreszein Isothiozyanat

B) Die mit $1\mu\text{M}$ unmarkierten Fc-blockierten Thrombozyten werden mit zwei Konzentrationen (100 nM, 250 nM) von FITC-markiertem-Fc und -CD40-Fc koinkubiert. Mittelwerte und Standardfehler von gebundenem FITC-markiertem- (mittlerer Fluoreszenzaktivität) Fc (grauen Säule) und CD40-Fc (schwarze Säule) sind dargestellt

Lösliches CD40-Fc sollte eine Bindung von CD40L an seinen natürlichen membranständigen CD40-Rezeptor kompetitiv hemmen. Um die inhibitorische Potenz des Fusionsproteins abzuschätzen, wird ein Zell-basierter Ansatz gewählt. In HUVEC-Zellen induziert die CD40L-Bindung die Expression des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (*Abbildung 23*). Während bei alleiniger Zugabe von CD40L eine Zunahme von ICAM-1 an der Zelloberfläche gemessen werden kann, kann diese durch zugesetztes CD40-Fc bei einem molaren Verhältnis von 10:1 (CD40-Fc:CD40L) unterbunden werden.

(Die gesamten In-vitro-Untersuchungsergebnisse wurden unter der Leitung von Dr. med. H.-J. Weig und K. Adler im Herzzentrum München angefertigt.)

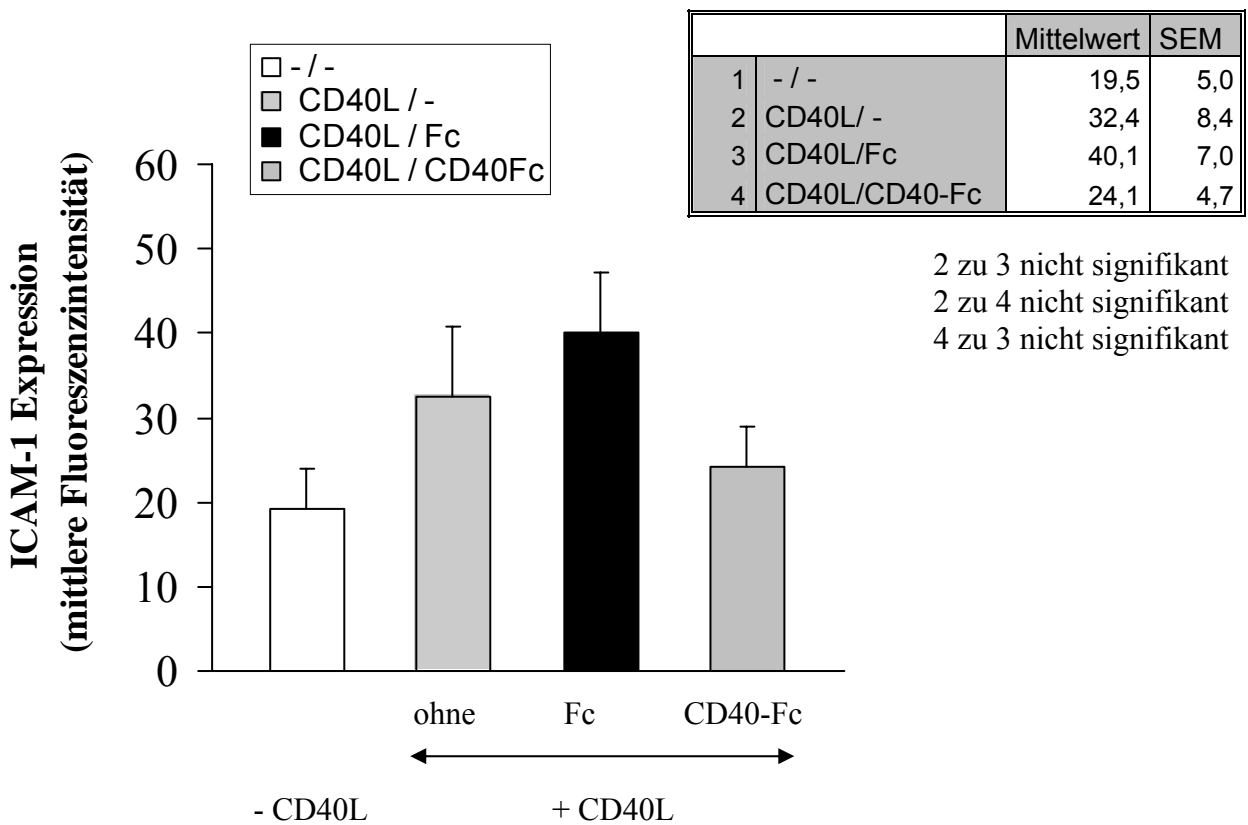


Abbildung 23 CD40-Fc hemmt CD40L-induzierte ICAM-1-Expression auf humanen Endothelzellen aus Umbilikalgefäßen (HUVECs).
-/- = keine Stimulation mit CD40L, CD40L/- = Zellen, die nur mit CD40L stimuliert werden, CD40L/Fc = Zellen, die mit CD40L und Fc stimuliert werden, CD40L/CD40-Fc = Zellen, die mit CD40L und CD40-Fc stimuliert werden, ICAM-1 = interzelluläres Adhäsionsmolekül-1. Darstellung der ICAM-1-Expression von CD40L-stimulierten und unstimulierten Zellen in Gegenwart von Fc (550 nM) oder CD40-Fc. Die ICAM-1 Expression wird per FACS-Analyse (FACS = fluorescent activated cell sampler) ausgewertet. MW und SEM von drei unabhängigen Experimenten werden gezeigt

3.4.2 Überlebensrate

Zwei der dreizehn Tiere aus der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe können nicht in die Auswertung miteinbezogen werden. Ein Kaninchen erleidet unter der Narkoseeinleitung mit Propofol und während des Intubationsversuches einen Atemstillstand, welcher nach Kreislaufversagen zum Exitus letalis führt. Bei dem zweiten Tier löst sich die Herzschrittmachersonde aus dem Myokard und kann nicht replaziert werden. Dadurch kommt es zu keiner Impulsüberleitung und damit zu keiner permanenten Erhöhung der Herzfrequenz.

Des Weiteren können zwei Tiere der Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe nicht ausgewertet werden. Bei einem Tier kommt es ebenfalls zur Sondendislokation am Versuchstag 8, ein Tag nach erfolgtem Cross-Clamping. Das zweite nicht miteinzubeziehende Tier der Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe wird vorzeitig aus dem Versuch genommen, da es bei schlechtem Allgemeinbefinden am 15. Versuchstag eine starke Ruhedyspnoe zeigt und somit der Herzschrittmacher ausgestellt werden musste.

Die 18 ausgewerteten Tiere erreichen alle am Tag 21 das vorgesehene Versuchsende.

3.4.3 Klinische Untersuchung der Tiere

Nach der Schrittmacherimplantation und der Cross-Clamping-Operation zeigen die Tiere nach der Aufwachphase für einige Stunden eine reduzierte Futteraufnahme, danach aber ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Mit zunehmender Pacingdauer nimmt die periphere Durchblutung ab und die Schleimhautfarbe wird blasser. Bei einem Tier aus der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe kann man gegen Ende des Versuchs abdominal eine Flüssigkeitsansammlung palpieren. Insbesondere bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung können bei einigen Tieren Aszites und Pleuraergüsse in unterschiedlicher Ausprägung festgestellt werden. Eine quantitative Erfassung wurde allerdings nicht durchgeführt, da im vorliegenden Stadium aufgrund individueller Schwankungen keine eindeutige Korrelation zwischen Schweregrad der Herzinsuffizienz und Ausprägung der Flüssigkeitsansammlung festgestellt werden konnte.

3.4.4 Ergebnisse der Gewichtsentwicklung

Tiergewicht (KGW, g)

Die Messung des Körpergewichtes erfolgt am Tag 0 (prae OP), am Tag 7 (M1), am Tag 14 (M2) und am Tag 21 (M3) des Untersuchungszeitraumes. Die Ausgangsgewichte vor der ersten Operation liegen bei $2,97 \pm 0,07$ kg (MW \pm SEM). Die Darstellung der Entwicklung des Körpergewichtes erfolgt relativ zum Ausgangsgewicht in Prozent (siehe *Abbildung 24, Tabelle 3*). Die Ad-CD40-GFP-Gruppe zeigt im Mittel eine nicht signifikante Gewichtsabnahme vom Tag 0 bis zum letzten Versuchstag (prae OP bis M3) auf $97,62 \% \pm 1,59 \%$ des Ausgangsgewichtes. Der Vergleich der Mittelwerte der ersten (Tag 7) Messung (Tag 14) von $99,68 \pm 1,10 \%$ zur zweiten Messung von $89,75 \pm 2,32 \%$ zeigt einen signifikanten Unterschied. Der Vergleich der Mittelwerte der zweiten zur dritten Messung von $97,62 \pm 1,59 \%$ (Tag 21) zeigt einen signifikanten Anstieg der Körpergewichte. Die Ad-GFP-Fc-Tiere nehmen von der ersten Messung vor der Operation bis zum Versuchsende (prae OP bis M3) im Mittel auf $110,51 \% \pm 4,89 \%$ zu, wobei die Tiere dieser Gruppe zwischen der zweiten und der dritten Messung (M1 und M2) zunächst eine signifikant rückläufige Entwicklung von $108,82 \% \pm 4,49 \%$ auf $102,02 \% \pm 5,12 \%$ zeigen. In der dritten Messung kann wiederum eine signifikante Erhöhung ($110 \pm 4,89 \%$) festgestellt werden.

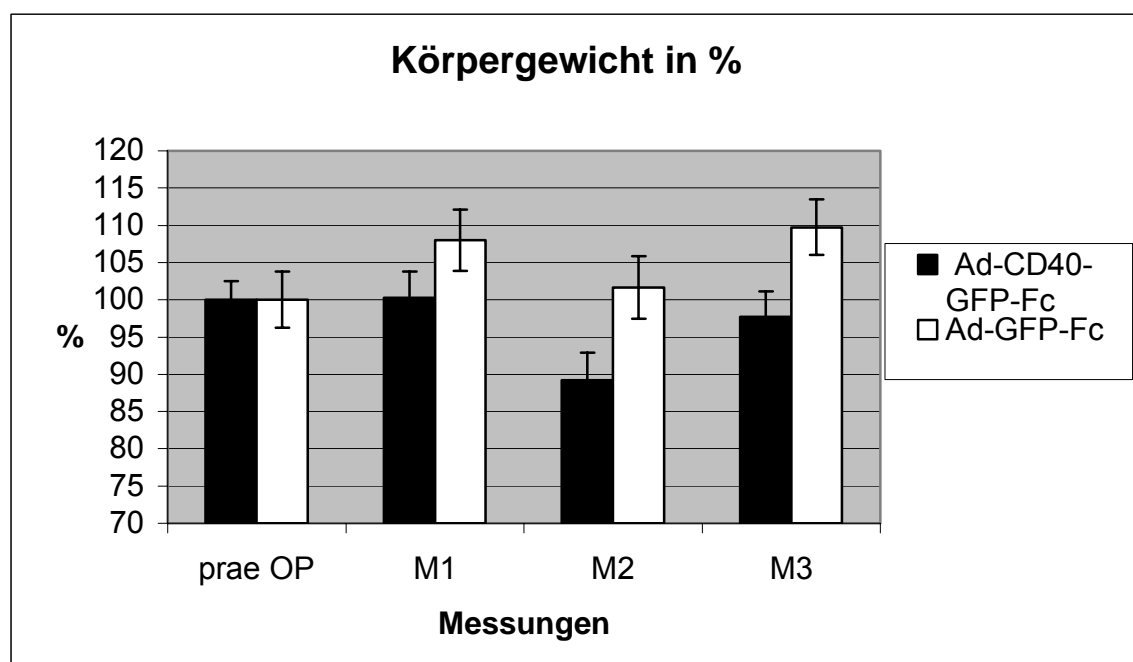


Abbildung 24 Körpergewicht der Versuchstiere, prae OP = vor der Operation, M = Messung, % = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler, Ad-CD40-GFP-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe

Tabelle 3 Gewichtsentwicklung (KGW, relativ, %) im Versuchszeitraum

KGW		Tag 0	GzsM	Tag 7	GzsM	Tag 14	GzsM	Tag 21	GzsM	ViG
Tiergruppe	n	prae OP %	S	M1, %	S	M2, %	S	M3, %	S	S
Ad-CD40-GFP-Fc, MW ± SEM	11	100 ±2,37	-	99,68 ±1,10	-	89,75 ±2,32	s	97,62 ±1,59	s	pOP/M2 M1/M2 M2/M3
Ad-GFP-Fc, MW ± SEM	7	100 ±4,61	-	108,82 ±4,49	-	102,02 ±5,12	s	110,51 ±4,89	s	M1/M2 M2/M3

M = Messung, MW = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler, S = Signifikanz, GzsM = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, - = nicht signifikant, s = signifikant, prae OP = vor der Operation, Ad-CD40-GFP-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, ViG = Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe, pOP = prae OP

3.4.5 Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung des linken Ventrikels

Für die linksventrikuläre Funktionsuntersuchung werden 11 Tiere der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe und 7 Tiere der Ad-GFP-Fc-Gruppe verwendet. Es werden vier Messungen jedes einzelnen Parameters durchgeführt, um daraus einen Mittelwert zu erheben. Die aufgeführten Messdaten zeigen vergleichend die Veränderung der prozentualen linksventrikulären Durchmesserverkürzung (fractional shortening, FS), des endsystolischen und enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels am Versuchstag 7, 14 und 21. Des Weiteren wird die Wanddicke der lateralen Wand des linken Ventrikels und des interventrikulären Septums in der diastolischen Phase gemessen.

Fractional Shortening (FS, %), linksventrikuläre Verkürzungsfraction

Der Ausgangswert der prozentualen Durchmesserverkürzung (Fractional Shortening, FS) des linken Ventrikels beträgt für die Versuchsgruppe Ad-CD40-GFP-Fc im Mittel $37,13 \pm 1,03$ % und für die Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe $37,08 \pm 1,27$ %.

Nach fünf Tagen ventrikulärer Stimulation mit 320 bpm (M2, Tag 14) verringert sich die FS der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe im Mittel auf $31,73 \pm 1,06$ % und die der Kontrollgruppe Ad-

GFP-Fc auf $32,31 \pm 1,23$ %. Beim Vergleich der beiden Gruppen in der zweiten Messung ergibt sich kein signifikanter Unterschied der FS.

Am letzten Versuchstag (M3, Tag 21) und einer weiteren Woche ventrikulärer Stimulation auf 360 bpm zeigen sich folgende Ergebnisse. Die FS in der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe verringert sich auf $27,79 \pm 1,04$ %, die der Kontrollgruppe Ad-GFP-Fc allerdings auf $23,62 \pm 1,99$ % (siehe *Abbildung 25, Tabelle 4*). Somit hat sich die FS bei beiden Gruppen in der zweiten und dritten Messung im Vergleich zur ersten Messung (M1) signifikant verringert. Bei beiden Gruppen ergibt sich ein signifikanter Unterschied bei der zweiten und dritten Messung innerhalb der Gruppe. Bei der 3. Messung kann eine signifikant höhere FS in der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden.

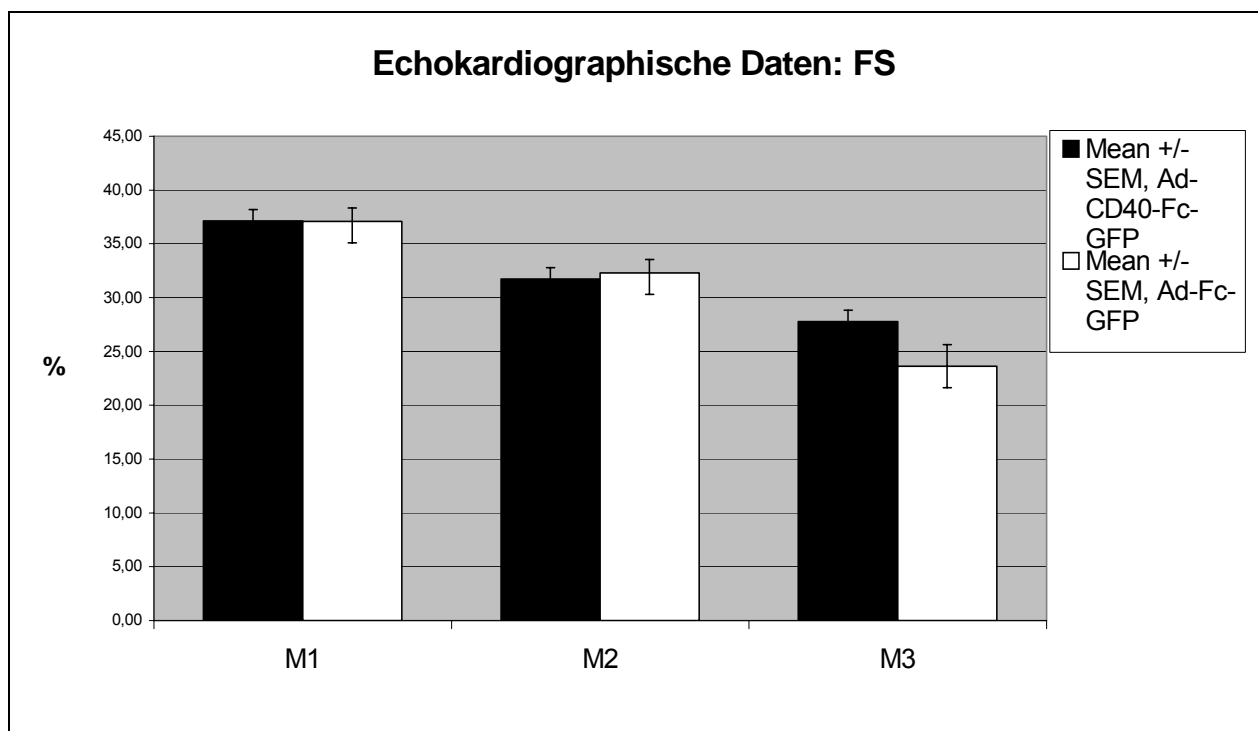


Abbildung 25 Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS) der CD40-Fc-GFP-Gruppe und der Ad-Fc-GFP-Gruppe

M1 = Tag 7, M2 = Tag 14, M3 = Tag 21, Mean = MW = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler, CD40-Fc-GFP = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-Fc-GFP = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe

Tabelle 4 Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS) der Gruppen in Prozent

FS %		Tag 7	GzsM	Tag 14	GzsM	Tag 21	GzsM	ViG
Tiergruppe	n	M1, %	S	M2, %	S	M3, %	S	S
Ad-CD40-GFP-Fc, MW ± SEM	11	37,13 ±1,03	-	31,37 ±1,06	-	27,79 ±1,04	s	M1/M2 M1/M3 M2/M3
Ad-GFP-Fc, MW ± SEM	7	37,08 ±1,27	-	32,31 ±1,23	-	23,62 ±1,99	s	M1/M2 M1/M3 M2/M3

M = Messung, MW = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler, S = Signifikanz, GzsM = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, - = nicht signifikant, s = signifikant, Ad-CD40-GFP-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, ViG = Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe

Enddiastolischer und endsystolischer Durchmesser des linken Ventrikels

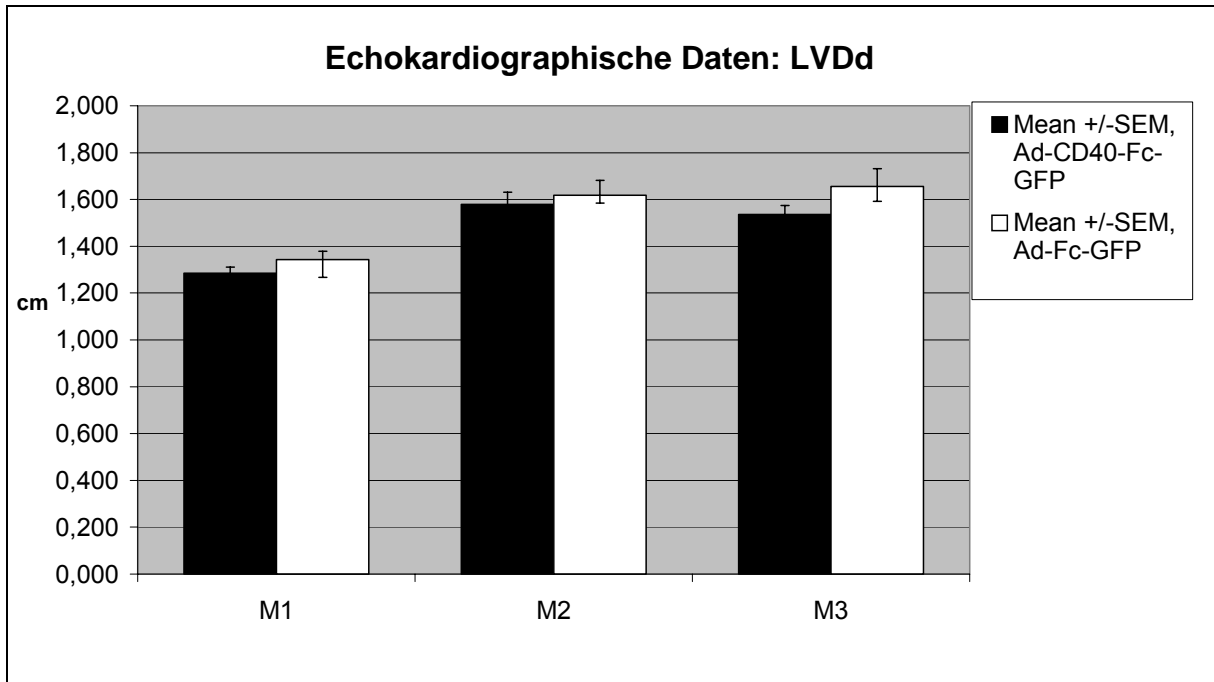
(LVDD, LVDs, cm)

Der Basalwert (M1) für den enddiastolischen Diameter des linken Ventrikels in der Diastole liegt im Mittel in der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe bei $1,28 \pm 0,03$ cm, bei der Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe bei $1,34 \pm 0,04$ cm. Bei der zweiten Messung (Versuchstag 14) ergibt sich eine signifikante Vergrößerung des Durchmessers des linken Ventrikels in der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe zunächst auf $1,58 \pm 0,05$ cm. Bei der dritten Messung von im Mittel $1,54 \pm 0,04$ cm zeigt sich der Ventrikel im Vergleich zur ersten Messung wiederum signifikant vergrößert. Innerhalb der Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe vergrößert sich der linke Ventrikel bei der zweiten Messung im Mittel zunächst auf $1,62 \pm 0,06$ cm und bei der dritten Messung weiter auf $1,66 \pm 0,08$ cm (siehe *Abbildung 26 A, Tabelle 5*). Sowohl die Werte von M2 als auch M3 der Ad-GFP-Fc-Gruppe sind zur ersten Messung signifikant erhöht.

Der Basalwert (M1) des endsystolischen Ventrikeldurchmessers liegt im Mittel bei der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe bei $0,80 \pm 0,02$ cm. Der Basalwert (M1) der Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe misst im Mittel $0,85 \pm 0,03$ cm. Im Untersuchungszeitraum vergrößern sich die linken Ventrikel der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe in der Systole signifikant auf $1,08 \pm 0,04$ cm in der zweiten Messung. Am Tag der letzten Messung (M3) zeigt sich eine im Vergleich zur ersten Messung signifikante Vergrößerung auf im Mittel $1,11 \pm 0,04$ cm.

In der Ad-GFP-Fc-Gruppe sind die Mittelwerte der zweiten ($1,10 \pm 0,02$ cm) und dritten ($1,27 \pm 0,08$ cm) Messung zur ersten Messung von im Mittel $0,85 \pm 0,03$ cm signifikant erhöht (siehe *Abbildung 26 B, Tabelle 5*).

A



B

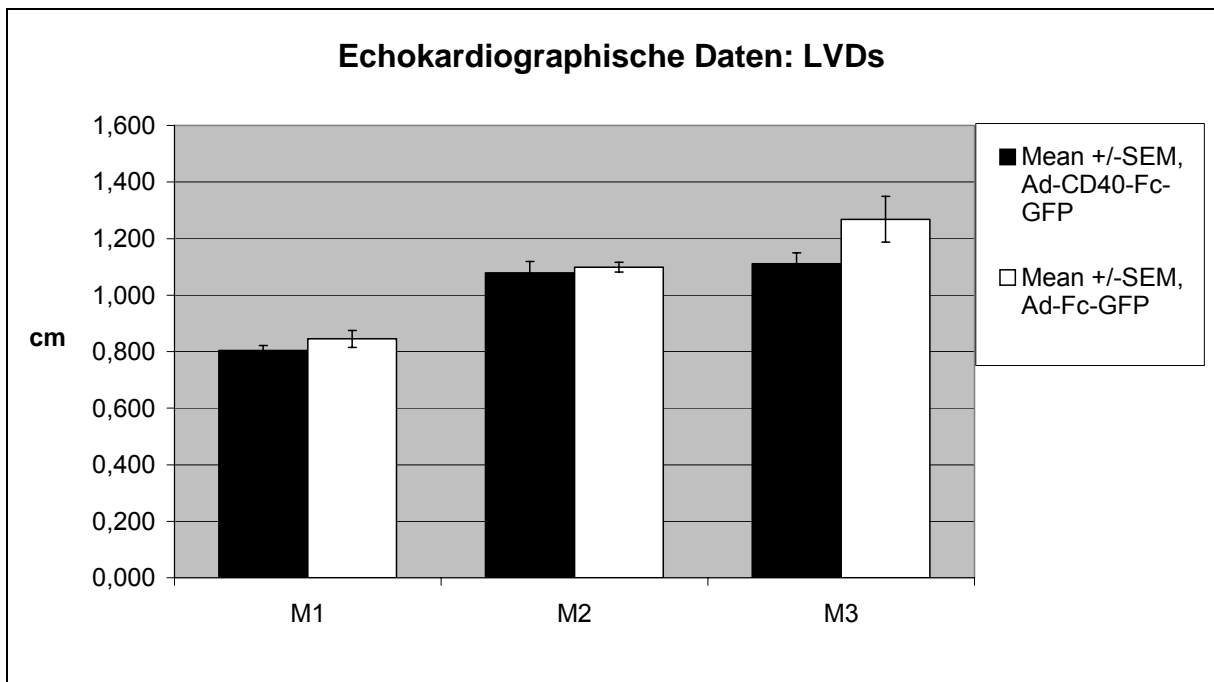


Abbildung 26 Enddiastolischer (A) und endsystolischer (B) Durchmesser des linken Ventrikels (LVDd = in der Diastole) und (LVDs = in der Systole), M1 = Messung am Tag 7, M2 = Messung am Tag 14, M3 = Messung am Tag 21, MW = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler, Ad-CD40-GFP-Fc = Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Kontrollgruppe

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 5 Echokardiographische Daten der enddiastolischen und endsystolischen Durchmesser (LVDd und LVDs) des linken Ventrikels der Versuchsgruppen

LVDd (cm)		Tag 7	GzsM	Tag 14	GzsM	Tag 21	GzsM	ViG
Tiergruppe	n	M1	S	M2	S	M3	S	S
Ad-CD40-GFP-Fc, MW ± SEM	11	1,28 ±0,03	-	1,58 ±0,05	-	1,54 ±0,04	-	M1/M2 M1/M3
Ad-GFP-Fc, MW ± SEM	7	1,34 ±0,04	-	1,62 ±0,06	-	1,66 ±0,08	-	M1/M2 M1/M3

LVDs (cm)		Tag 7	GzsM	Tag 14	GzsM	Tag 21	GzsM	ViG
Tiergruppe	n	M1	S	M2	S	M3	S	S
Ad-CD40-GFP-Fc, MW ± SEM	11	0,80 ±0,02	-	1,08 ±0,04	-	1,11 ±0,04	s	M1/M2 M1/M3
Ad-GFP-Fc, MW ± SEM	7	0,85 ±0,03	-	1,10 ±0,02	-	1,27 ±0,08	s	M1/M2 M1/M3

M = Messung, MW = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler, S = Signifikanz, s = signifikant, GzsM = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, n = Anzahl der Tiere, Ad-CD40-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, ViG = Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe

Laterale Wanddicke des linken Ventrikels und des interventrikulären Septums in der Diastole

Bei der sonographischen Messung am Versuchstag 7 (M1) ergeben sich für die Wanddicke der lateralen Wand des linken Ventrikels in der Diastole Basalwerte von $0,27 \pm 0,01$ cm im Mittel für die Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe und für die Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe $0,27 \pm 0,02$ cm. Nach 14 Tagen (Tag 21) zeigt sich eine nicht signifikante Abnahme der Wanddicke der lateralen Ventrikelwand in beiden Gruppen auf $0,26 \pm 0,01$ cm im Mittel in der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe und auf $0,26 \pm 0,02$ cm in der Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe (siehe *Abbildung 27, Tabelle 6*).

Die Wanddicke des interventrikulären Septums verringert sich in der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe im Mittel von der Ausgangsmessung ($0,27 \pm 0,01$ cm) auf $0,24 \pm 0,01$ cm in der zweiten Messung am Versuchstag 21. Im Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen M1 und M2.

Ein ähnliches Bild, allerdings ohne signifikanten Unterschied, ergibt sich bei der Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, die Septumdicke dieser Tiere verringert sich im Mittel von $0,25 \pm 0,01$ cm auf $0,23 \pm 0,01$ cm (siehe *Abbildung 28, Tabelle 7*).

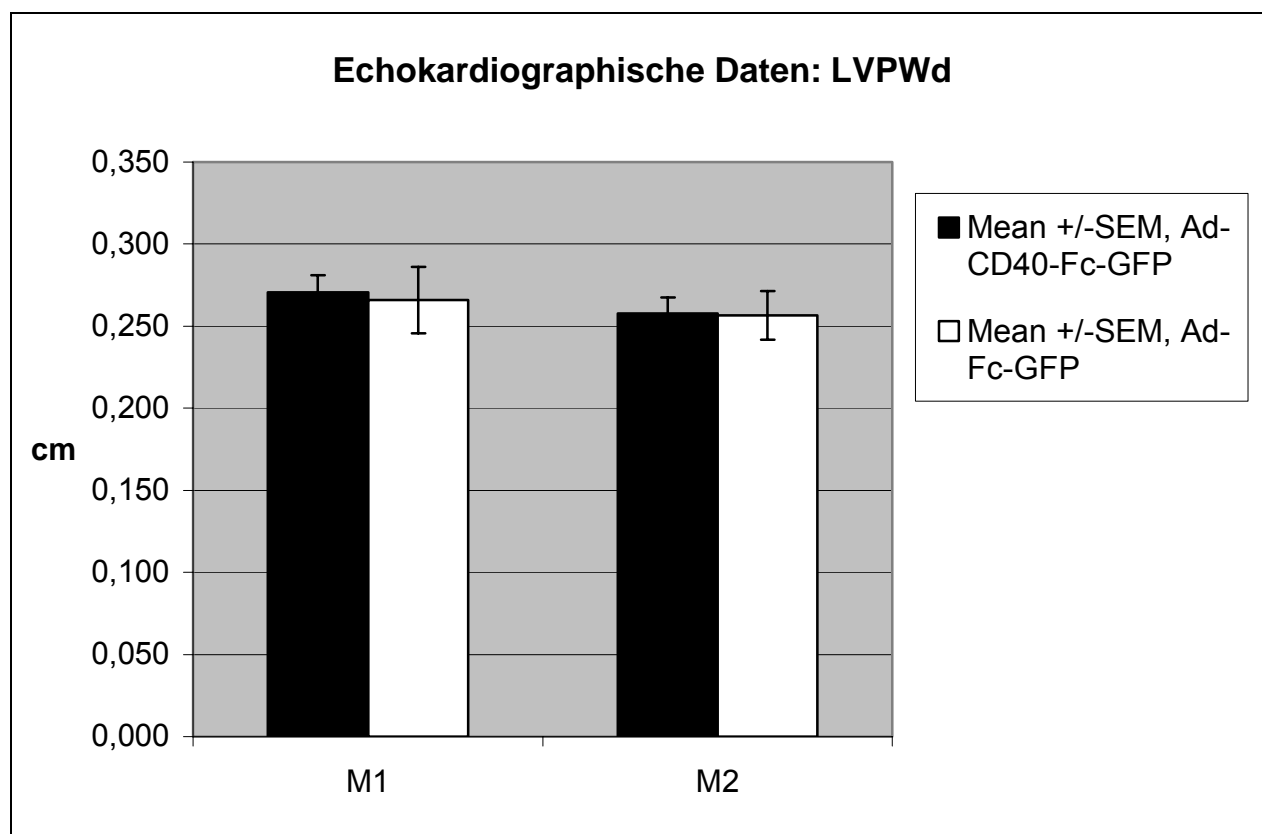


Abbildung 27 Sonographische Messung der Wanddicke der lateralen Außenwand des linken Ventrikels in der Diastole

Mean ± SEM = Mittelwert ± Standardfehler, LVPWd = laterale Wanddicke des linken Ventrikels in cm, M1 = erste Messung am 7. Versuchstag, M2 = zweite Messung am 21. Versuchstag

Tabelle 6 Dicke der lateralen Außenwand des linken Ventrikels

LPWDD (cm)		Tag 7	GzsM	Tag 21	GzsM	ViG
Tiergruppe	n	M1, cm	S	M2, cm	S	S
Ad-CD40-GFP-Fc, MW ± SEM	11	0,27 ±0,01	-	0,26 ±0,01	-	-
Ad-GFP-Fc, MW ± SEM	7	0,27 ±0,02	-	0,26 ±0,02	-	-

M = Messung, MW = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler, S = Signifikanz, - = nicht signifikant, GzsM = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, n = Anzahl der Tiere, Ad-CD40-GFP-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, ViG = Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe

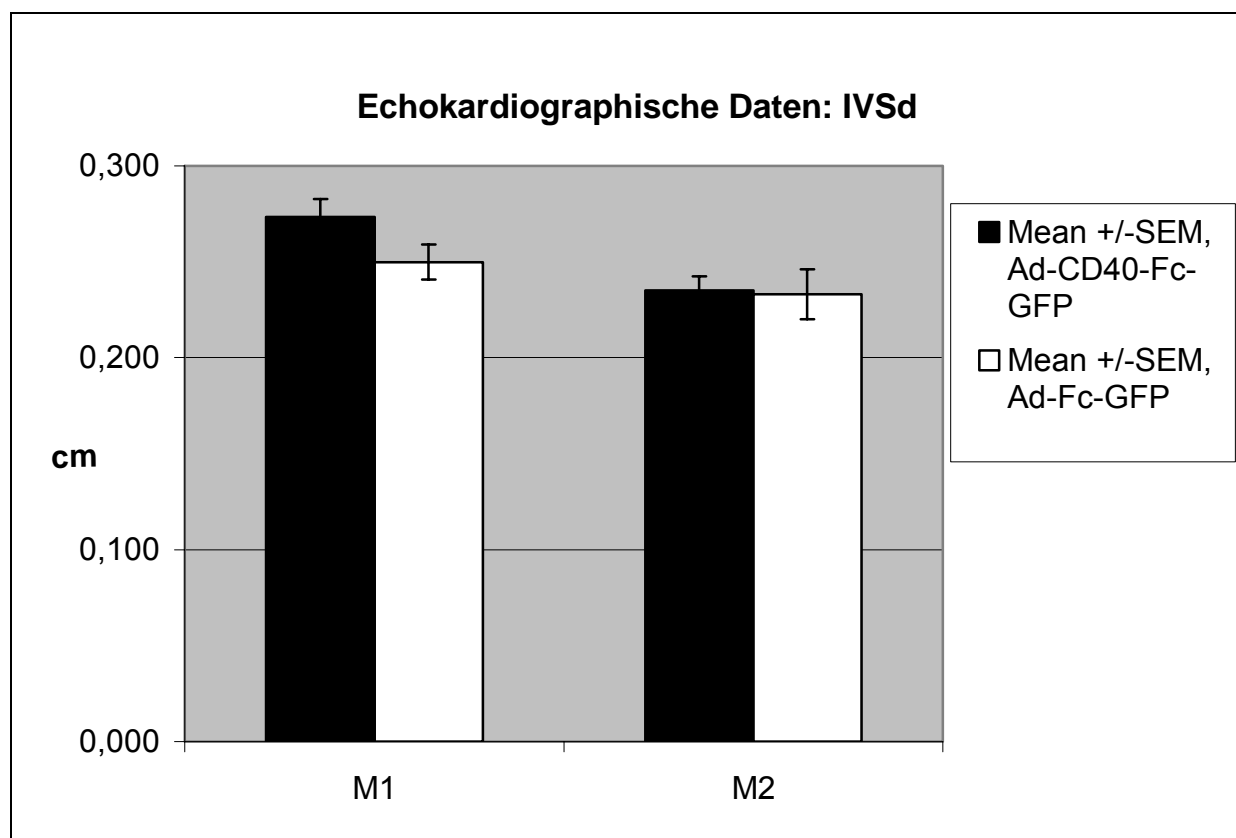


Abbildung 28 Sonographische Messung der Dicke des interventrikulären Septums des linken Ventrikels in der Diastole

Mean \pm SEM = Mittelwert \pm Standardfehler, IVSd = interventrikuläre Septumdicke in cm, M1 = erste Messung am 7. Versuchstag, M2 = zweite Messung am 21. Versuchstag

Tabelle 7 Dicke des interventrikulären Septums

IVSd (cm)		Tag 7	GzsM	Tag 21	GzsM	ViG
Tiergruppe	n	M1, cm	S	M2, cm	S	S
Ad-CD40-GFP-Fc, MW \pm SEM	11	0,27 \pm 0,01	-	0,24 \pm 0,01	-	M1/M2
Ad-GFP-Fc, MW \pm SEM	7	0,25 \pm 0,01	-	0,23 \pm 0,01	-	-

M = Messung, MW = arithmetisches Mittel, SEM = Standardfehler, S = Signifikanz, GzsM = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, n = Anzahl der Tiere, Ad-CD40-GFP-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, ViG = Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe

3.4.6 Ergebnisse der TIP-Manometrischen Untersuchung

Bei der hämodynamischen Messung im linken Ventrikel werden folgende Parameter erhoben: der maximale systolische Druck im linken Ventrikel (LV_{sys}), der enddiastole Druck (LV EDP), die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (LV dp/dt max), die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (LV dp/dt min) und die Herzfrequenz. Die Stimulation mit Isoprenalin erfolgt in aufsteigender Konzentration von 0,1; 0,5 und 1,0 µg/kg/min über jeweils 10 Minuten.

Die Entwicklung des maximalen systolischen Druckes (LV_{sys}, mmHg)

Beim Basalwert von $55,15 \pm 3,49$ mmHg der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe kommt es nach zehnmütiger Infusion mit einer Isoprenalinkonzentration von zuerst 0,1 µg/kg/min zu einer signifikanten Erhöhung auf $66,63 \pm 2,95$ mmHg. Bei der Erhöhung auf 0,5 µg/kg/min erfolgt eine signifikante Steigerung auf $81,76 \pm 2,87$ mmHg. Der maximale systolische Druck im linken Ventrikel hat in der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe bei der Isoprenalingabe von 1,0 µg/kg/min den höchsten Wert mit im Mittel $84,20 \pm 2,83$ mmHg.

Der Basalwert der Ad-GFP-Fc-Gruppe beträgt $71,13 \pm 6,88$ mmHg. Bei der Ad-GFP-Fc-Gruppe kommt es nach zehnmütiger Isoprenalingabe zu einer signifikanten Erhöhung des maximalen systolischen Druckes von $77,36 \pm 7,55$ mmHg auf $93,46 \pm 3,71$ mmHg. Bei der letzten Messung und einer Isoprenalinkonzentration von 1,0 µg/kg/min erhöht sich der Druck im Vergleich zum Basalwert und zur Isoprenalinkonzentration von 0,1 µg/kg/min signifikant auf $96,00 \pm 5,67$ mmHg (Konzentrationssteigerung von Isoprenalin i.v. von 0,1 auf 0,5 auf 1,0 µg/kg/min in zehnmütigen Intervallen).

Bei folgenden Messzeitpunkten zeigt die Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe im Vergleich innerhalb der Gruppe signifikante Unterschiede: Basalmessung zur Isoprenalinkonzentration von 0,1; 0,5 und 1,0 µg/kg/min und bei der Isoprenalinkonzentration von 0,1 µg/kg/min zu 0,5 und 1,0 µg/kg/min (siehe *Abbildung 29, Tabelle 8*).

Bei der Ad-GFP-Fc-Gruppe können signifikante Unterschiede im Vergleich des Druckes bei der Isoprenalingabe von 0,1 µg/kg/min zu den Isoprenalinkonzentrationen von 0,5 und 1,0 µg/kg/min erhoben werden (siehe *Abbildung 29, Tabelle 8*).

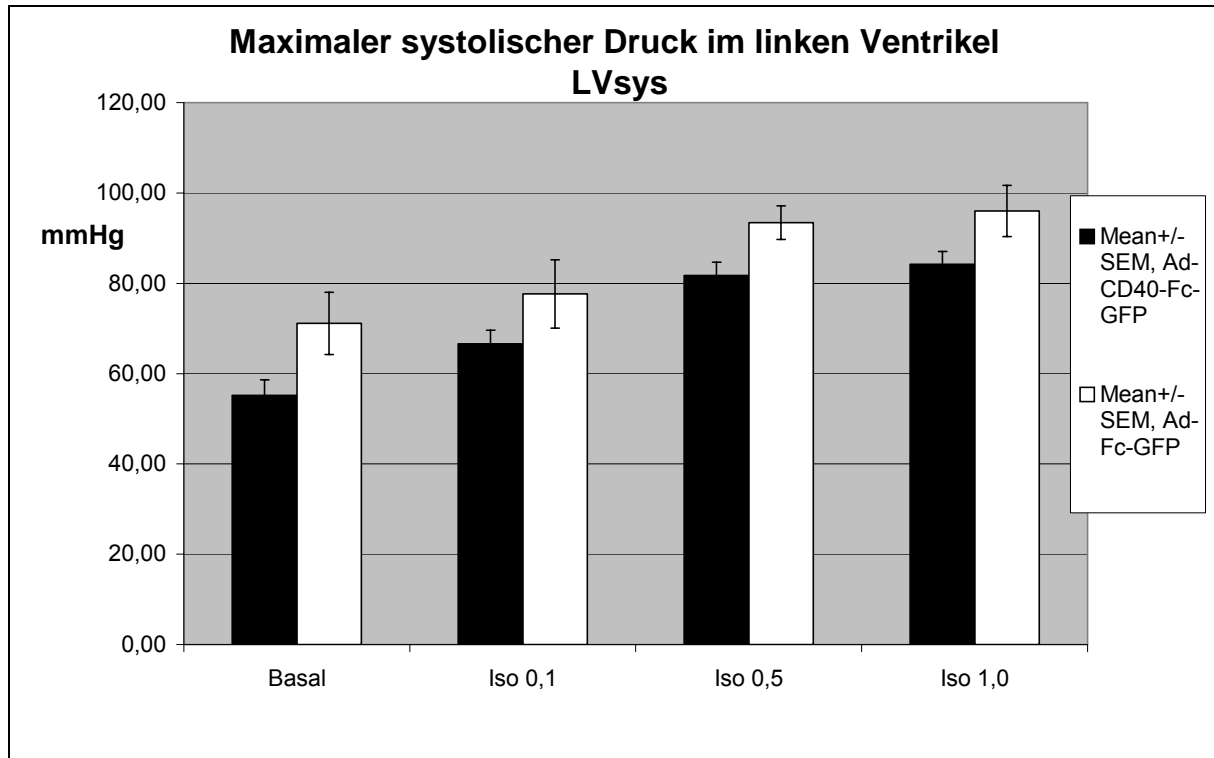


Abbildung 29 Entwicklung des maximalen systolischen Druckes im linken Ventrikel unter Isoprenalinstimulation (LVsys)

Mean ± SEM = Mittelwert ± Standardfehler, LVsys = maximalen systolischen Druckes im linken Ventrikel, Ad-CD40-Fc-GFP = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-Fc-GFP = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, Basal = Basalwert, Iso = jeweilige Isoprenalinkonzentration; Iso 0,1 = Druckwert nach 10 Minuten 0,1 µg/kg/min Isoprenalin i.v. Infusion

Tabelle 8 Entwicklung des maximalen systolischen Druckes im linken Ventrikel (LVsys) in mmHg unter Stimulation mit Isoprenalin ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)

LVsys, mmHg		Basal	Gzsm S	Iso 0,1	Gzsm S	Iso 0,5	Gzsm S	Iso 1,0	Gzsm S	ViG S
Tiergruppe	n									
Ad-CD40-GFP-Fc, MW \pm SEM	11	55,15 \pm 3,49	s	66,63 \pm 2,95	-	81,76 \pm 2,87	-	84,20 \pm 2,83	-	b/Iso 0,1 b/Iso 0,5 b/Iso 1,0 Iso0,1/Iso0,5 Iso0,1/Iso1,0
Ad-GFP-Fc, MW \pm SEM	7	71,13 \pm 6,88	s	77,36 \pm 7,55	-	93,46 \pm 3,71	-	96,00 \pm 5,67	-	b/Iso 0,5 b/Iso 1,0 Iso0,1/Iso0,5 Iso0,1/Iso1,0

Mean \pm SEM = Mittelwert \pm Standardfehler, LVsys = des maximalen systolischen Druckes im linken Ventrikel, Ad-CD40-GFP-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, n = Anzahl der Tiere, Basal = Basalwert, Iso = jeweilige Isoprenalinkonzentration; Iso 0,1 = Druckwert nach 10 Minuten 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ Isoprenalin i.v. Infusion, Gzsm = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, ViG = Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe, S = Signifikanz, s = signifikant, - = nicht signifikant, b = basal

Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel (LV dp/dt max)

Bei den Tieren der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe erhöht sich die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel von einem Basalwert von $1728,36 \pm 196,06$ mmHg/sec signifikant auf $3102,27 \pm 375,28$ mmHg/sec nach jeweils zehnmütiger perfusorgesteuerter Isoprenalingabe bei einer Isoprenalinkonzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. Nach einer Konzentrationserhöhung auf 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ erhöht sich der Druck im Mittel signifikant auf $6942,91 \pm 521,33$ mmHg/sec und bei einer Konzentration von 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ Isoprenalin wiederum signifikant auf im Mittel $7084 \pm 450,97$ mmHg/sec.

In der Ad-GFP-Fc-Gruppe steigt der Wert unter Verwendung derselben Isoprenalinkonzentrationen von einem Basalwert von $2061,71 \pm 271,24$ mmHg/sec signifikant auf $3879,57 \pm 697,32$ mmHg/sec nach jeweils zehnmütiger perfusorgesteuerter Isoprenalingabe und bei der Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ Isoprenalin signifikant auf $7403,14 \pm 716,54$ mmHg/sec. Nach Gabe der höchsten Isoprenalinkonzentration von 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ erhöht sich der Druck nicht signifikant auf $7404,43 \pm 737,42$ mmHg/sec. Im Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb der Gruppen zeigt die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit aller Tiere signifikante Unterschiede beim Vergleich der Basalwerte mit allen Isoprenalinkonzentrationen (0,1; 0,5 und 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$). Signifikante Unterschiede ergeben

sich wie bereits beschrieben auch im Vergleich der Messzeitpunkte bei Isoprenalinkonzentrationen von 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ zu 0,5 und 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (siehe *Abbildung 30*, *Tabelle 9*).

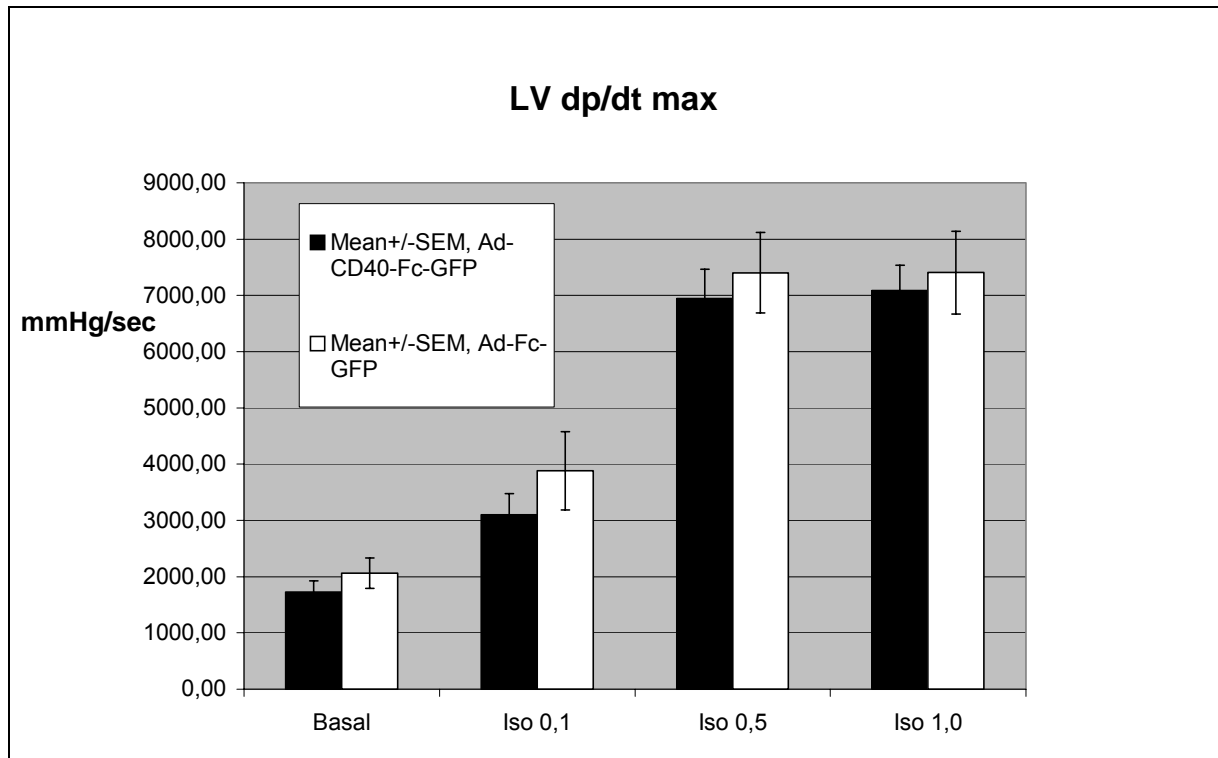


Abbildung 30 Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel

Mean \pm SEM = Mittelwert \pm Standardfehler, LV dp/dt max =maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel, Ad-CD40-Fc-GFP = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-Fc-GFP = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, Basal = Basalwert, Iso = jeweilige Isoprenalinkonzentration; Iso 0,1 = Druckwert nach 10 Minuten 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ Isoprenalin i.v. Infusion

Tabelle 9 Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel (LV dp/dt max) in mmHg/sec unter Stimulation mit Isoprenalin (in µg/kg/min)

LV dp/dt max, mmHg/sec		Basal	GzsM S	Iso 0,1	GzsM S	Iso 0,5	GzsM S	Iso 1,0	GzsM S	ViG S
Tiergruppe	n									
Ad-CD40-GFP-Fc, MW ± SEM	11	1728,36 ±196,06	-	3102,27 ±375,28	-	6942,91 ±521,33	-	7084,73 ±450,97	-	b/Iso 0,1 b/Iso 0,5 b/Iso 1,0 Iso0,1/Iso0,5 Iso0,1/Iso1,0
Ad-GFP-Fc, MW ± SEM	7	2061,71 ±271,24	-	3879,57 ±697,32	-	7403,14 ±716,54	-	7404,43 ±737,42	-	b/Iso 0,1 b/Iso 0,5 b/Iso 1,0 Iso0,1/Iso0,5 Iso0,1/Iso1,0

Mean ± SEM = Mittelwert ± Standardfehler, LV dp/dt max =maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel, Ad-CD40-GFP-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, Basal = Basalwert, S = Signifikanz, - = nicht signifikant, n = Anzahl der Tiere, Iso = jeweilige Isoprenalinkonzentration; Iso 0,1 = Druckwert nach 10 Minuten 0,1 µg/kg/min Isoprenalin i.v. Infusion, GzsM = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, ViG = Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe, b = basal

Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit im linken Ventrikel (LV dp/dt min)

In der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe steigt die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit von einem Basalwert von -1591,00 ± 172,89 mmHg/sec signifikant auf -2555,09 ± 206,24 mmHg/sec nach zehnminütiger perfusorgesteuerter Isoprenalingabe von 0,1 µg/kg/min. Nach zehnminütiger Konzentrationserhöhung auf 0,5 µg/kg/min Isoprenalin ist ein Wert von -3741,64 ± 258,80 mmHg/sec erreicht, bei der Konzentration von 1,0 µg/kg/min Isoprenalin liegt der Wert im Mittel bei -3781,64 ± 202,44 mmHg/sec.

In der Ad-GFP-Fc-Gruppe liegt der Basalwert des LV dp/dt min bei -2170,57 ± 248,83 mmHg/sec. Nach Erhöhung der Isoprenalinkonzentration von 0,1 und 0,5 µg/kg/min erfolgt eine maximale Druckabfallsgeschwindigkeit von -3137,00 ± 418,72 mmHg/sec auf -4489,86 ± 345,85 mmHg/sec. Bei der letzten zehnminütigen Konzentrationserhöhung auf 1,0 µg/kg/min Isoprenalin wird ein Wert von -4423,86 ± 361,56 mmHg/sec gemessen.

Im Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb der Gruppen zeigt die maximale Druckabfallgeschwindigkeit aller Tiere signifikante Unterschiede in den Basalwerten mit allen Isoprenalinkonzentrationen (0,1; 0,5 und 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$). Signifikant sind auch die Messungen nach Isoprenalinkonzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ zu den Messzeitpunkten nach Isoprenalinkonzentrationen von 0,5 und 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ bei der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe wie auch der Ad-GFP-Fc-Gruppen (siehe *Abbildung 31, Tabelle 10*).

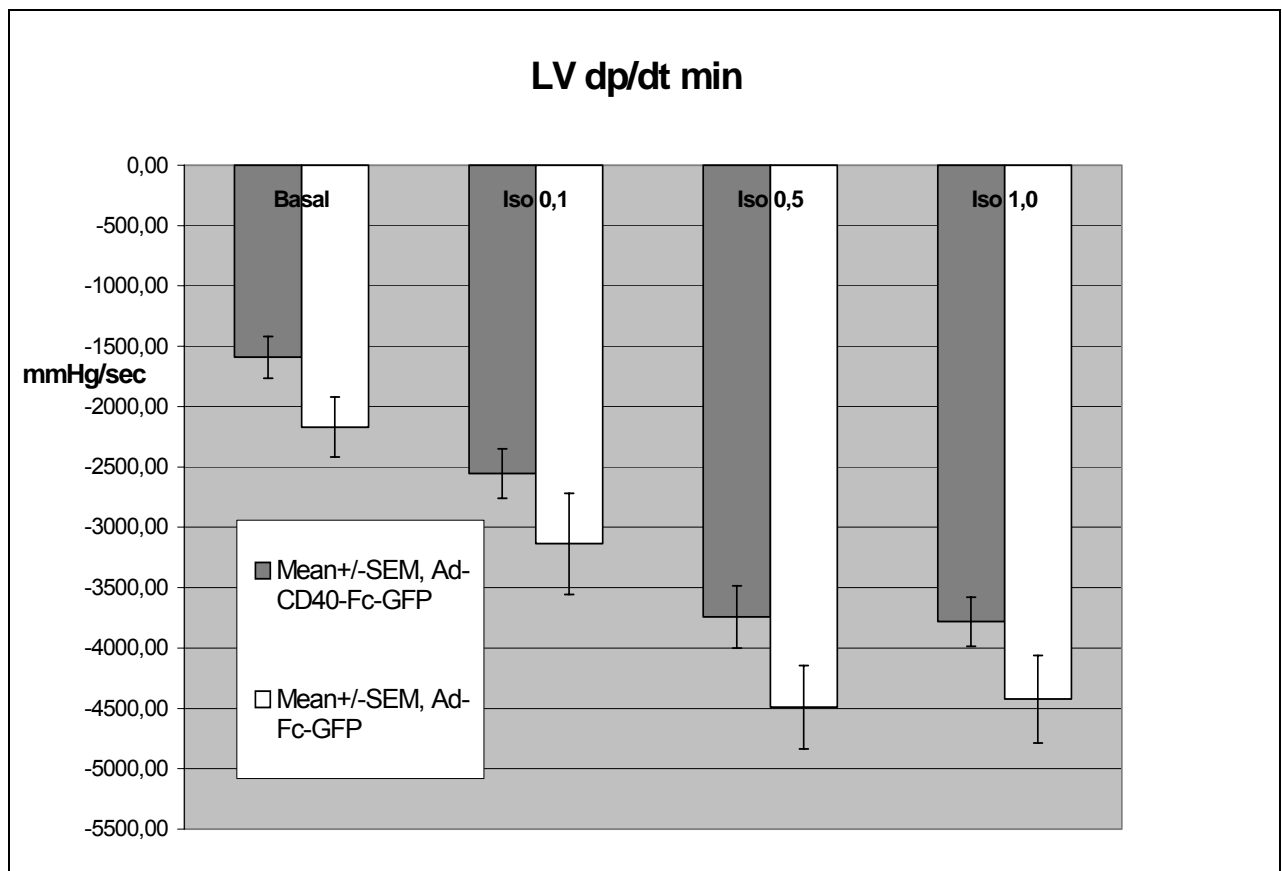


Abbildung 31 Maximale Druckabfallgeschwindigkeit im linken Ventrikel

Mean \pm SEM = Mittelwert \pm Standardfehler, LV dp/dt min =maximale Druckabfallgeschwindigkeit im linken Ventrikel, Ad-CD40-Fc-GFP = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-Fc-GFP = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, Basal = Basalwert, Iso = jeweilige Isoprenalinkonzentration; Iso 0,1 = Druckwert nach 10 Minuten 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ Isoprenalin i.v. Infusion

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 10 Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit im linken Ventrikel (LV dp/dt min) in mmHg/sec unter Stimulation mit Isoprenalin (in µg/kg/min)

LV dp/dt min, mmHg/sec		Basal	Gzs M S	Iso 0,1	Gzs M S	Iso 0,5	Gzs M S	Iso 1,0	Gzs M S	ViG S
Tiergruppe	n									
Ad-CD40-GFP-Fc, MW ± SEM	11	-1591,00 ±172,89	s	-2555,09 ±206,24	-	-3741,6 ±258,80	-	-3781,6 ±202,44	-	b/Iso 0,1 b/Iso 0,5 b/Iso 1,0 Iso0,1/Iso0,5 Iso0,1/Iso1,0
Ad-GFP-Fc, MW ± SEM	7	-2170,57 ±248,83	s	-3137,00 ±418,72	-	-4489,8 ±345,85	-	-4423,8 ±361,56	-	b/Iso 0,1 b/Iso 0,5 b/Iso 1,0 Iso0,1/Iso0,5 Iso0,1/Iso1,0

Mean ± SEM = Mittelwert ± Standardfehler, LV dp/dt min = maximale Druckabfallsgeschwindigkeit im linken Ventrikel, Ad-CD40-GFP-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, Basal = Basalwert, Iso = jeweilige Isoprenalinkonzentration; Iso 0,1 = Druckwert nach 10 Minuten 0,1 µg/kg/min Isoprenalin i.v. Infusion, S = Signifikanz, s = signifikant, - = nicht signifikant, n = Anzahl der Tiere, GzsM = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, ViG = Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe, b = basal

Der Basalwert der **Herzfrequenz (HF, bpm)** der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe liegt im Mittel bei 199 ± 3 bpm. Nach jeweils zehnmütiger Isoprenalinperfusion von 0,1; 0,5 und 1,0 µg/kg/min ergeben sich Werte von 222 ± 8 bpm, 317 ± 15 bpm und 321 ± 14 bpm.

Bei der Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe beträgt der Ausgangswert im Mittel 195 ± 4 bpm. Die Herzfrequenz erhöht sich nach jeweils zehnmütiger Isoprenalinperfusion von 0,1 µg/kg/min zunächst signifikant auf 225 ± 11 Schläge pro Minute. Bei einer Konzentrationserhöhung von 0,5 µg/kg/min erhöht sich die Herzfrequenz nicht signifikant auf 305 ± 12 Schläge pro Minute. Der höchste Wert von 311 ± 11 bpm ergibt sich nach einer Erhöhung der Isoprenalinkonzentration von 1,0 µg/kg/min. Der Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe und innerhalb der Ad-GFP-Fc-Gruppe ergeben, mit Ausnahme des

Vergleiches der Messung mit einer Konzentration von 0,5 auf 1,0 µg/kg/min Isoprenalin, signifikante Unterschiede (siehe *Abbildung 32, Tabelle 11*).

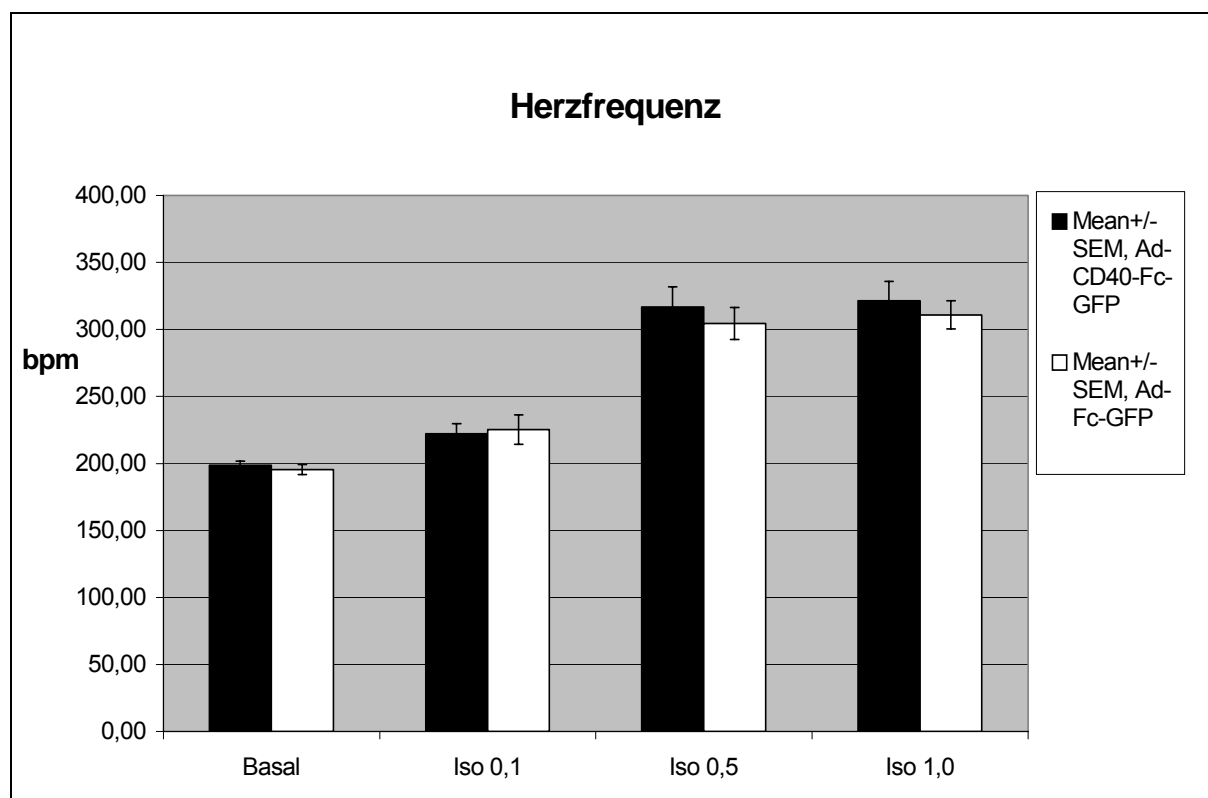


Abbildung 32 Entwicklung der Herzfrequenz unter Isoprenalinstimulation

Mean ± SEM = Mittelwert ± Standardfehler, Ad-CD40-Fc-GFP = Ad-CD40-Fc-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-Fc-GFP = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, Basal = Basalwert, Iso = jeweilige Isoprenalinkonzentration; Iso 0,1 = Druckwert nach 10 Minuten 0,1 µg/kg/min Isoprenalin i.v. Infusion, bpm = beats per minute (Herzfrequenz in Schlägen pro Minute)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Tabelle 11 Entwicklung der Herzfrequenz (HF, bpm) unter Isoprenalinstimulation

Herzfrequenz, bpm		Basal	GzsM S	Iso 0,1	GzsM S	Iso 0,5	GzsM S	Iso 1,0	GzsM S	ViG S
Tiergruppe	n									
Ad-CD40- GFP-Fc, MW ± SEM	11	199 ±3	-	222 ±8	-	317 ±15	-	321 ±14	-	b/Iso 0,1 b/Iso 0,5 b/Iso 1,0 Iso0,1/Iso0,5 Iso0,1/Iso1,0
Ad-GFP-Fc, MW ± SEM	7	195 ±4	-	225 ±11	-	305 ±12	-	311 ±11	-	b/Iso 0,1 b/Iso 0,5 b/Iso 1,0 Iso0,1/Iso0,5 Iso0,1/Iso1,0

Mean ± SEM = Mittelwert ± Standardfehler, Ad-CD40-GFP-Fc = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-GFP-Fc = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe, bpm = beats per minute (Schläge pro Minute), Basal = Basalwert, Iso = jeweilige Isoprenalinkonzentration; Iso 0,1 = Druckwert nach 10 Minuten 0,1 µg/kg/min Isoprenalin i.v. Infusion, S = Signifikanz, - = nicht signifikant, n = Anzahl der Tiere, GzsM = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, ViG = Vergleich der Messzeitpunkte innerhalb einer Gruppe, b = basal

Der enddiastolische Druck (LV EDP) im linken Ventrikel in mmHg

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck wird nur zum Zeitpunkt der Basalmessung vergleichend betrachtet. Hierbei zeigen die Tiere der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe im Mittel einen Wert von $4,48 \pm 0,77$ mmHg. Die Ad-GFP-Fc-Gruppe zeigt einen signifikant höheren linksventrikulären Druck von $8,80 \pm 2,15$ mmHg im Vergleich zur Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe (siehe *Abbildung 33*).

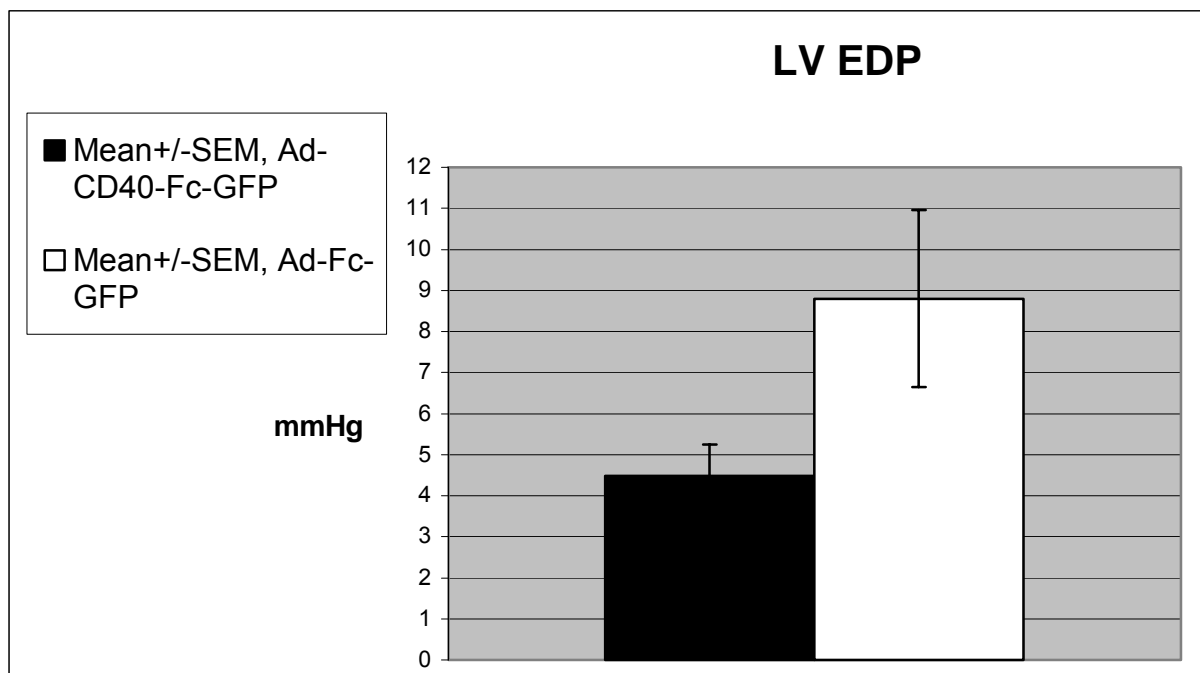


Abbildung 33 Linksventrikulärer Druck in der enddiastolen Phase (LV EDP)

Mean \pm SEM = Mittelwert \pm Standardfehler, LV EDP = Linksventrikulärer Druck in der Enddiastole, Ad-CD40-Fc-GFP = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe, Ad-Fc-GFP = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe

Tabelle 12 Linksventrikulärer Druck in der enddiastolen Phase (LV EDP)

LV EDP mmHg	n	basal	GzsM
Tiergruppe			
Ad-CD40-Fc-GFP, MW \pm SEM	11	4,48 \pm 0,77	s
Ad-Fc-GFP, MW \pm SEM	7	8,8 \pm 2,15	s

Mean \pm SEM = Mittelwert \pm Standardfehler, LV EDP = Linksventrikulärer Druck in der Enddiastole, Ad-CD40-Fc-GFP = Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe ($4,48 \pm 0,77$ mmHg), Ad-Fc-GFP = Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe ($8,8 \pm 2,15$ mmHg); GzsM = Gruppenvergleich zum selben Messzeitpunkt, s = signifikant

3.4.7 Serumuntersuchungen

Blutproben werden zu verschiedenen Zeitpunkten während des Untersuchungszeitraumes (Tag 0, 14 und 21) entnommen, um die Expression des Transgens zu überprüfen und inflammatorische Parameter zu bestimmen (siehe *Abbildung 34*). CD40-Fc der Ad-CD40-Fc-GFP-Gruppe steigt von 5 auf mehr als 30000 ng/ml am 14. Beobachtungstag an, um dann auf 100 ng/ml abzufallen.

CD40-Fc der Kontrollgruppe steigt auf mehr als 250000 ng/ml am Tag 14 an und fällt auf 60000 ng/ml am 21. Beobachtungstag. Im Gegensatz zur CD40-Expression erreicht CD40L zwei Wochen nach Gentransfer, am 21. Tag, seine höchste Konzentration in der Ad-CD40-Fc-GFP-Gruppe mit 584 pg/ml (337 pg/ml am Tag 7), in der Kontrollgruppe mit 129 pg/ml (67 pg/ml am Tag 14) (siehe *Abbildung 21B*).

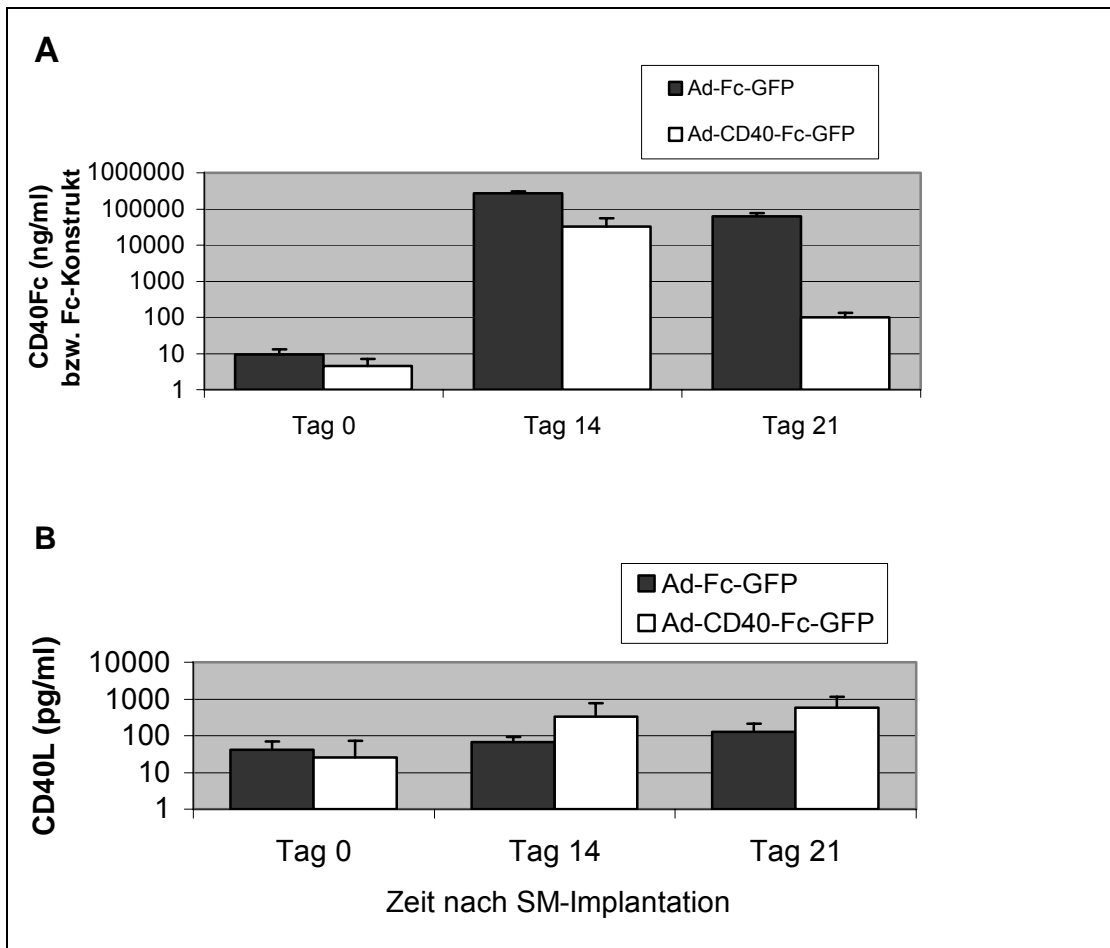


Abbildung 34 Darstellung der Entwicklung der CD40-Fc- und CD40L-Titer im Serum von Fc- und CD40-Fc exprimierenden Tieren. *Abbildung (A)* zeigt die CD40-Fc-Konzentration in ng/ml, der Mittelwert und Standardfehler wurde aus sieben bzw. elf Tieren ermittelt. *Abbildung (B)* zeigt die CD40L-Konzentration in pg/ml. Der Mittelwert und Standardfehler wurden hierfür aus Messungen von sieben bzw. zehn Tieren ermittelt

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

4.1.1 Herzinsuffizienz durch Dilatative Kardiomyopathie im Tachykardie-Modell

Für die Übertragbarkeit der Ergebnisse, die im Tierexperiment gewonnen werden auf den Menschen, ist die jeweilige Fragestellung und die Eignung des gewählten Tiermodelles zu überprüfen. Das Kaninchen wie auch das Schwein, stellen in der Kardiologie eine geeignete Spezies zur Erzeugung der Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz (HI) dar. Für die Wahl des Kaninchens als Versuchstier in der vorliegenden Studie sprechen weitgehende pathophysiologische Übereinstimmungen in der Progression der Herzinsuffizienz bei Kaninchen und Mensch (EZZAHER et al. 1992). Zusätzlich sind die ökonomisch günstigen Haltungsbedingungen und das einfache Handling bei mittlerer Körpergröße von Vorteil.

Das Krankheitsbild der HI in Form einer Dilatativen Kardiomyopathie (DCM) in enger Analogie zum Menschen, kann durch 12-tägiges ventrikuläres Pacing durch einen Herzschrittmacher mit 320 bis 360 Schlägen pro Minute induziert werden. In diesem Modell kommt es dann zur Entwicklung der charakteristischen hämodynamischen und pathologisch-anatomischen Veränderungen der Herzinsuffizienz. Dies wurde bereits in Arbeiten von MASAKI et al. (1993 und 1994), SPINALE et al. (1994), KNOBLOCH (2001), BAUMGARTNER (2002) und FALTERMEIER (2002) gezeigt. Durch die im ventrikulären Pacingmodell entwickelte Tachykardie und Veränderungen der Reizleitung kommt es zum Fehlen einer Vorhofkontraktion, was zu einer Verminderung der aktiven Ventrikelfüllungsphase und folglich zur Reduktion des Herzzeitvolumens führt (BAUMGARTNER 2002). Weiter induziert die hohe Herzfrequenz eine Verschiebung des zeitlichen Systole-Diastole-Verhältnisses, wodurch die Durchblutung des Myokards vermindert wird. Diese fortwährende Überbelastung (Tachykardie) des Herzens bei verminderter Durchblutung führt letzten Endes zur sicheren Entwicklung der HI in Form einer DCM.

IANNINI und SPINALE (1996) zeigen, dass in Tiermodellen mit chronischer Druck- und Volumenüberlastung sowie erhöhter Herzschlagfrequenz (rapid pacing) wichtige Informationen über die Entwicklung und Pathophysiologie des myokardialen Umbaus (Remodeling) des linken Ventrikels mit Dysfunktion und nachfolgender Herzinsuffizienz gewonnen werden können.

Es ist jedoch schwierig den Krankheitszustand experimentell zuverlässig konstant zu halten. So verursacht die Dislokation der Herzschrittmachersonde, die bei zwei Tieren im Versuchszeitraum aufgetreten ist, eine ausbleibende oder fehlerhafte Impulsübertragung, die zur Induktion einer myokardialen Hypertrophie hätte führen sollen (HONGO et al. 1996).

Zusätzlich handelt es sich bei dem Kaninchen um einen sensiblen Narkosepatienten, da bei dieser Spezies das Stadium der chirurgischen Toleranz sowie das der Atemlähmung dicht beieinander liegen (ERHARDT 1992, HENKE und HABERSTROH 2004). Alle durchzuführenden Manipulationen, von der Intubation bis zum operativen Eingriff am Herzen, weisen ein nicht unerhebliches Risiko bezüglich des Herzkreislaufversagens auf. Um ein möglichst geringes Risiko einzugehen, erfolgt während des Eingriffs die Beatmung nach Intubation mit 100 % Sauerstoff. Nach Erfahrungen von SEDWICK et al. (1996) wurde eine gut steuerbare Injektionsnarkose mit Fentanyl und Propofol eingesetzt, wodurch in dieser Studie 59 von 60 Operationen komplikationslos verliefen.

4.1.2 Eignung der Vektoren und Genexpression

In der vorliegenden Studie wurden als Vektorsystem replikationsdefiziente Adenoviren des Serotyps 5 aufgrund der bis zu vier Wochen währenden stabilen Expressionsdauer und des arbeitstechnisch sicheren Handlings verwendet (KASS-EISSLER et al. 1993, GUZMAN et al. 1993, DONAHUE et al. 1998). Weitere positive Eigenschaften sind die Transfektion von nicht mehr teilungsfähigen Zellen wie den Herzmuskelzellen, die praktikable Herstellung dieser Vektoren und die Induktion einer hohen Expression der kodierten Gene in den Kardiomyozyten (BAUMGARTNER 2002). Des Weiteren besitzt der Vektor die Fähigkeit, vergleichsweise große Fremd-DNA-Fragmente aufzunehmen (HE et al. 1998, HAJJAR et al. 2000, NABEL und DZAU 2001).

Für die Transfektion der Kardiomyozyten mit Hilfe des adenoviralen Gentransfers sind verschiedene Applikationsarten beschrieben. Die Direktinjektion in den Herzmuskel bietet den Vorteil einer signifikanten Transfektion (2/3 des Myokards des linken Ventrikel DONAHUE et al. 1998, LOGEART et al. 2001), allerdings sind die Nachteile wie das Auftreten fokaler Genexpression nahe der Applikationsstelle und das Zustandekommen von lokalen Gewebsschädigungen, verbunden mit Blutungen oder gar inflammatorischen Folgen wie Myo- oder Epikarditis nicht unerheblich.

In dieser Studie wurde die Cross-Clamping-Methode gewählt, um über eine verlängerte Kontaktzeit eine möglichst hohe und gleichmäßige Expression im ganzen Myokard zu erzielen (DONAHUE et al. 1997 und 1998, HAJJAR et al. 2000). Mögliche Fehlerquellen in Form von unzureichender Virusherstellung (wie zu niedrige Virustiter) und fehlerhafter Konservierung (Unterbrechung der Kühlkette), die die Transfektionsfähigkeit verschlechtern, gilt es zu unterbinden. Auch ist ein besonderes Augenmerk auf die korrekte Applikation zu richten; unvollständiges Abklemmen der Aorta und/oder der A. pulmonalis oder falsche Positionierung des Katheters sollten vermieden werden. Bezüglich der Anwendung beim Menschen ist von der Methode des Cross-Clamping aufgrund der hohen Invasivität einer Thorakotomie und dem risikobehafteten gleichzeitigen Verschluss der Aorta und A. pulmonalis allerdings abzusehen. Hier gilt es weitere Applikationstechniken, wie beispielsweise den Einsatz eines geeigneten Ballonkatheters weiterzuentwickeln, um die Risiken, die mit der jeweiligen Applikationstechnik verbunden sind, beim operativen Eingriff am Patienten zu minimieren.

In Bezug auf die TIP-Manometrische Untersuchung hat sich das in aufsteigender Konzentration verwendete Isoprenalin als sicher dosierbar und wirksam erwiesen. Durch die selektive β -Rezeptor-agonistische Wirkung des Isoprenalins erfolgt physiologischerweise ein damit verbundener positiv-inotroper sowie positiv-chronotroper Effekt, der sich in der Steigerung der Kontraktionskraft, des Minutenvolumens und der Herzfrequenz (UNGEMACH 1999) niederschlägt. Im insuffizienten Herzen kann sich unter dieser Belastung jedoch ein positiver Einfluss der CD40-Fc-Überexpression verstärkt manifestieren, da die kontraktile Reserve des insuffizienten Myokards bei hoher Isoprenalinkonzentration vermindert ist.

4.2 Diskussion der In-vitro-Voruntersuchungen

Für die erfolgreiche Blockade von CD40L durch Ad-CD40-Fc in vivo ist die ausreichende Bindungsaffinität von Ligand und adenoviralem Genprodukt essentiell. Die In-vitro-Voruntersuchungen, die zur Klärung dieser Fragestellung durchgeführt wurden, zeigen, dass diese Affinität zwischen dem Ad-CD40-GFP-Fc-Konstrukt und dem CD40-Liganden gegeben ist.

DISKUSSION

Zunächst konnte *in vitro* gezeigt werden, dass humaner CD40L dosisabhängig immobilisiertes CD40-Fc bindet. Dieser Effekt ist spezifisch, da das Fc-Kontrollfragment selbst bei der maximalen CD40L-Konzentration von 50 nM dieses nicht bindet (siehe *Abbildung 21*).

Von entscheidender Bedeutung für die Verwendung des Ad-CD40-GFP-Fc-Konstruktes im Kaninchenmodell *in vivo* ist, dass sich diese Bindung auch bei Inkubation mit Thrombin-aktivierten Kaninchen-Thrombozyten nachweisen lässt (siehe *Abbildung 22*). Bei hoher CD40L-Expression der Thrombozyten (250 nM Thrombin) konnte eine signifikante Bindung von Fluoreszenz-markierten CD40-Fc nachgewiesen werden. Die tendenziell erhöhte Bindung von Fc-FITC in der Kontrollfärbung wird dabei nicht durch CD40L vermittelt, sondern lässt sich vielmehr durch die beschriebene Expression von Fc-Rezeptoren auf aktivierten Thrombozyten zurückführen (CALVEREY et al. 2003).

Auch auf funktioneller Ebene ist CD40-Fc in der Lage, die Wirkung von CD40L kompetitiv zu hemmen (siehe *Abbildung 23*). Zwar ist die CD40L-vermittelte ICAM-Expression nach CD40-Inkubation im Vergleich zur alleinigen CD40L-Stimulation nicht vollständig unterbunden, in Bezug auf die CD40L und Fc-behandelte Zelllinie jedoch deutlich reduziert.

Interessanterweise scheint Fc folglich selbst einen aktivierenden Einfluss auf die Endothelzellen auszuüben (siehe *Abbildung 23*). Dies kann auch den verbleibenden geringen Effekt von CD40L auf die ICAM-Expression bei CD40-Fc-Koinkubation im Vergleich zur unbehandelten Zelllinie erklären. Fc-Rezeptoren lassen sich auf humanen Endothelzellen nachweisen (GAVENCU et al. 2003), so dass eine Fc-vermittelte ICAM-1-Expression der *humanen* HUVEC-Endothelzelllinie möglich ist. In Thrombozyten kann die Aktivierung durch Fc-Rezeptoren sogar die Freisetzung von CD40L auslösen (CABEZA et al. 2004). Da CD40L unter bestimmten Bedingungen auch von Endothelzellen gebildet werden kann (DANESE et al. 2004), ist eine Fc-vermittelte autokrine CD40L-Sekretion der HUVECs nicht auszuschließen.

Zusammenfassend zeigen diese *In-vitro*-Daten eine spezifische, dosisabhängige und funktionell relevante Inhibition von CD40L durch rekombinantes CD40-Fc und erlauben damit den Einsatz des Konstrukts im Tiermodell.

4.3 Diskussion der in vivo erhobenen Ergebnisse

4.3.1 Allgemeines

Wie im Schrifttum aufgezeigt, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit den Einfluss einer CD40L-Blockade durch myokardiale CD40-Rezeptor-Überexpression (STUMPF et al. 2003, VISHNEVETSKY et al. 2004) auf die Entstehung und Progression der HI in vivo zu untersuchen. Das Tachykardie-induzierte Herzinsuffizienzmodell im Kaninchen erlaubt nach optimiertem Gentransfer (Cross-Clamping), den Einfluss des eingebrachten Ad-CD40-GFP-Fc-Konstrukts in Bezug auf die Entwicklung der HI zu untersuchen. Dabei werden neben der klinischen Untersuchung etablierte Verfahren der kardiologischen Diagnostik eingesetzt, insbesondere die sonographische Erfassung der morphologischen Parameter sowie die Verkürzungsfraction und über invasive TIP-Manometrie die Messung der funktionellen Korrelate der Herzinsuffizienz.

4.3.2 Überlebensrate

4 der 22 eingesetzten Versuchstiere erreichen im Wesentlichen durch technische bzw. operative Komplikationen wie beispielsweise der Narkoseeinleitung (Ad-Fc-GFP) das Versuchsende nicht. Auch aufgrund einer Sondendislokation (Ad-CD40-GFP-Fc und Ad-GFP-Fc-Gruppe) werden die Tiere vorzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen.

Der Atemstillstand, der bei einem Tier während der Narkoseeinleitung mit Propofol eintrat und letztlich zum Tod führte, kann folgendermaßen begründet werden:

Die individuelle Reaktion von Kaninchen auf die gleiche Menge eines Anästhetikums ist sehr unterschiedlich (ERHARDT 1992), des Weiteren ruft Propofol eine initiale Atemdepression hervor (PADDLEFORD und ERHARDT 1992). Schon eine geringe Überdosierung des Propofol oder eine zu rasche Applikation können eine ausgeprägte Atemdepression hervorrufen, die ohne rechtzeitige Intubation und Beatmung zum Exitus letalis führen kann.

Zusätzlich besteht bei einem unvorsichtigen Intubationsversuch bei Kaninchen die Gefahr, durch den engen Oropharynxbereich wie auch den geringen Durchmesser der Larynxöffnung, einen Laryngospasmus oder eine Vagusreizung zu provozieren, die ebenfalls für einen Atemstillstand verantwortlich gemacht werden kann.

Die Ruhedyspnoe bei schlechtem Allgemeinbefinden kann durch das fortgeschrittene Stadium der DCM mit deutlichen Zeichen einer HI begründet werden. Tiere mit Zeichen einer schweren HI reagieren auf jegliche Formen von Belastung, wie beispielsweise das alleinige Handling oder die Narkose äußerst empfindlich. Solche Tiere werden vorzeitig aus dem Versuch genommen.

4.3.3 Myokardiale GFP-Expression ex vivo

Die Verwendung des GFP-Markers im Genvektor erlaubt, die myokardiale Expression des CD40-Fc-Konstruktes auf einfache Weise zu überprüfen.

In der Fluoreszenzmikroskopie gelingt es, GFP im Myokard deutlich nachzuweisen (siehe *Abbildung 19*), allerdings ist eine homogene Expression mit dem Mikroskop nicht sicher zu erfassen. Aus diesem Grund wurde eine immunzytochemische Kontrollfärbung durchgeführt. In dieser Färbung (siehe *Abbildung 20*) kann man das Verteilungsmuster der GFP-Expression erkennen, so dass die vollständige Exposition des Myokards durch den CD40-GFP-Fc-Genstransfer gewährleistet ist.

4.3.4 Beeinflussung der klinischen Symptomatik der Herzinsuffizienz durch CD40-Überexpression

Neben dem Überleben wurde als Kriterium das Ausgangsgewicht der Versuchstiere erfasst und dessen Veränderungen im Verlauf der Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienz protokolliert. Hierbei zeigt sich in der Kontrollgruppe eine mit der fortschreitenden Insuffizienz korrelierte Gewichtszunahme, während die CD40-Fc-behandelten Tiere zunächst einen starken Gewichtsverlust erleiden, der sich aber zu Ende des Behandlungszeitraums wieder etwa dem Ausgangsgewicht angleicht. Die Futteraufnahme erfolgte bei allen Tieren regelmäßig und gleichmäßig. In früheren Arbeiten im Tachykardiemodell wurden Gewichtszunahmen durch Flüssigkeitsansammlungen wie Pleuraergüsse und Aszites beobachtet (BAUMGARTNER 2002). Damit kann die Gewichtszunahme prinzipiell als direkte Folge der Herzinsuffizienz gewertet werden. Die geringere Gewichtszunahme der CD40-behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe kann dagegen als Hinweis für einen klinischen Effekt der Therapie interpretiert werden. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die transiente Gewichtsabnahme auf eine beispielsweise höhere Virulenz des rekombinanten CD40-Fc-Adenovirus hindeutet.

4.3.5 Beeinflussung der echokardiographischen Parameter nach myokardialer CD40-Fc-Überexpression

Um die anatomischen Unterschiede durch Messung des enddiastolischen und endsystolischen Diameters des Herzens und der Kontraktilität (linksventrikuläre Verkürzungsfraction, FS) als Parameter der Herzkontraktilität des linken Ventrikels im Verlauf der DCM in vivo zu erfassen, werden die Tiere innerhalb des Untersuchungszeitraumes dreimal vergleichend unter standardisierten Bedingungen sonographisch untersucht. Zur Beurteilung der Ventrikeldilatation steht hierbei mit der echokardiographischen Messung eine effiziente Nachweismethode zur Verfügung.

Mit zunehmender Herzinsuffizienz erweitert sich der linke Ventrikel, so dass in der Kontrollgruppe der Diameter in der Systole im Verlauf signifikant um bis zu 50 % zunimmt. In der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe erweitert sich der linke Ventrikel ebenfalls signifikant, dessen Diameterzunahme fällt jedoch im Vergleich zur Ad-GFP-Fc-Gruppe am Tag 21, sowohl in der Diastole mit 20 % als auch in der Systole mit 35 % geringer aus. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist in der Systole signifikant und kann auf eine positive Beeinflussung des pathologischen Umbaus der Herzwand nach CD40L-Blockade in der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe hindeuten. Bei der Messung der interventrikulären-bzw. linksventrikulären lateralen Wanddicke konnte zwischen den Gruppen jedoch kein Unterschied konstatiert werden.

Bei Betrachtung der Fractional Shortening, zur Bestimmung der Kontraktilität des Herzens, bestätigt sich der positive Effekt der CD40L-Blockade. So zeigt die linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS) nach zweiwöchigem Pacing eine signifikante Verbesserung im Vergleich zur Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe (siehe *Abbildung 25*).

Zusammenfassend lassen die Erhebungen der sonographischen Parameter im Verlauf der Herzinsuffizienz in den Kaninchen bezüglich der anatomischen Parameter eine deutliche, aber nicht signifikante Verminderung der Ventrikeldilatation zeigen. Bezüglich des funktionellen Parameters (FS) konnte allerdings eine signifikante Verbesserung der Funktionalität konstatiert werden.

4.3.6 Beeinflussung der TIP-Manometrischen Herzparameter durch CD40L-Blockade

Für die Erhebung und Auswertung hämodynamischer Funktionsparameter nach 14-tägigem Pacing und der daraus resultierenden Entwicklung einer DCM wird eine invasive TIP-Katheter-Messung durchgeführt. Als basaler Wert hat sich eine Herzfrequenz von 200 ± 10 bpm als geeignet erwiesen. Die Herzfrequenz lässt sich durch Narkose mit Hilfe dosierter Propofolgaben gut auf die gewünschte Frequenz einstellen.

Durch die Gabe des positiv-inotrop wirkenden Isoprenalins in festgelegten Konzentrationen kann die kontraktile Reserve des Herzens durch TIP-Kathetermessungen bestimmt werden. Die Erhebung des maximalen systolischen Druckes im linken Ventrikel unter aufsteigenden Isoprenalinkonzentrationen ergab aber keine verbesserten hämodynamischen Werte der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe im Vergleich zur Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe. Daraus lässt sich schließen, dass sich die beobachteten sonographischen Strukturveränderungen des Herzens nach Tachykardiebelastung nur beschränkt hämodynamisch niederschlagen, weshalb bei diesen Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen konstatiert werden können. Bei der maximalen Druckerhöhungsgeschwindigkeit und der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit in Korrelation zur Herzfrequenz findet sich ebenfalls keine Verbesserung in der Ad-CD40-GFP-Fc-Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe *Abbildung 30, 31 und 32*). Diese Beobachtungen stehen auf den ersten Blick mit der in der Literatur aufgezeigten deutlichen Erhöhung von CD40L bei herzinsuffizienten Tieren (VAN KOOTEN und BANCHEREAU 2001, FREEDMAN 2003) im Widerspruch, da eine funktionelle kardiale Veränderung in der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe im Vergleich zur Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe ausbleibt.

Dennoch ist eine hämodynamische Relevanz des CD40L aufgrund der kurzen Versuchsdauer nicht generell auszuschließen. Nach der Literatur ist vielmehr zu erwarten, dass die Blockade von CD40L erst bei voller Ausprägung des myokardialen Remodeling substantiell in Erscheinung tritt (BAUMGARTEN et al. 2000, DAMAS et al. 2001, SPINALE et al. 1999 und 2002, JANICKI et al. 2004).

Da der Remodelingprozess im Herzen chronisch verläuft und sich somit erst zu einem späteren Versuchszeitpunkt gänzlich manifestieren würde, können sich demnach noch keine deutlichen Auswirkungen bezüglich der Funktion des Herzens zeigen.

Bei herzinsuffizienten Kaninchen ist der enddiastolische Druck (LV EDP) als Ausdruck der vermehrten Vorlast allgemein erhöht, was wiederum die physiologische Kompensation der initial verminderten Kontraktilität repräsentiert (ROSKAMM und REINDELL 1989).

Der LV EDP weist bei einem niedrigen Druck einen sehr geringen Referenzbereich auf (Referenzbereich gesunder Tiere: $3,5 \pm 0,4$ mmHg; $MW \pm SEM$) und ist zudem frequenzabhängig (LAUGWITZ et al. 2001). Somit stellt der LV EDP einen sehr sensiblen Parameter dar. Daher konnte auf Stimulation mit Isoprenalin verzichtet werden, die bei den resultierenden hohen Herzfrequenzen aus mechanischen Gründen (u.a. Anliegen des Katheters an die Herzwand) mit einer zu hohen Fehlerrate behaftet ist.

Interessanterweise findet sich bei den Ad-CD40-GFP-Fc-behandelten Tieren ein kaum erhöhter enddiastolischer Druck und somit keine erhöhte Vorlast, während sich bei den Ad-GFP-Fc-behandelten Kontrolltieren ein zweifach höherer LV EDP findet und die induzierte Herzinsuffizienz widerspiegelt. Die Einschränkung der Kontraktilität nach CD40-Rezeptor-Überexpression fällt im Vergleich zur Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe signifikant geringer aus.

Dies ist in Korrelation zu den sonographischen Parametern ein weiteres Indiz dafür, dass CD40L auch funktionell für die Pathogenese bedeutsam ist und lässt weitere Untersuchungen mit längerer Beobachtungszeit sinnvoll erscheinen.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend kann in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass mit Hilfe der CD40L-Blockade durch die myokardiale CD40-Fc-Überexpression auf die Entwicklung einer DCM im Tiermodell Einfluss genommen werden kann. Die HI wird hierbei erfolgreich und sicher durch das schon von MASAKI et al. (1993) beschriebene Tachykardiemodell induziert. Durch den adenoviralen Gentransfer gelingt es, CD40L-bindendes, rekombinantes CD40-Fc temporär zu exprimieren. Sowohl der Nachweis von CD40-Fc im Serum als auch die fluoreszenzmikroskopisch detektierte homogene Expression des rekombinanten CD40-GFP-Fc-Vektors im Myokard weisen darauf hin, dass der CD40-Ligand während der Entstehung der Myokardinsuffizienz ausreichend blockiert werden kann. Die angewandte Methode der Cross-Clamping-Technik (DONAHUE et al. 1998) ist hierbei durch die homogene Transfektion im gesamten Myokard geeignet. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass im Verlauf eine kompensatorische Hochregulation von CD40L – wie durch steigende Serumkonzentrationen in der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe angedeutet (siehe *Abbildung 35*) – einer vollständigen Inhibition entgegenwirkt. Dies kann zumindest partiell erklären, warum eine Reduktion der Symptome der Herzinsuffizienz nur tendenziell erkennbar ist. Dennoch zeigt sich in einigen gemessenen Parametern wie der linksventrikulären Verkürzungsfraktion

(FS) und dem enddiastolischen Druck eine signifikante Verbesserung der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe im Vergleich zur Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe. Diese Daten reflektieren auf funktioneller Ebene eine reelle Kontraktilitätsverbesserung nach CD40-Fc-Überexpression.

Darüber hinaus muss, den theoretischen Vorüberlegungen folgend (siehe Kapitel 2.2), berücksichtigt werden, dass die Effekte einer CD40L-Blockade sich wohl noch wesentlich deutlicher in Langzeituntersuchungen manifestieren würden, weil erst dann die positiven Effekte auf die chronischen Umbauvorgänge des insuffizienten Herzens (kardiales Remodeling) vollständig zum tragen kommen und die gewünschten Ergebnisse bringen können.

Langzeiteffekte und genaue Auswirkungen auf den Remodelingprozess wie auch Langzeitfolgen der Virusapplikation können in dieser Studie aufgrund der Versuchsdauer von 21 Tagen nicht ausreichend geklärt werden und sollten in Folgeprojekten untersucht werden. Ebenfalls sollte überprüft werden, für welche Dauer CD40L durch Gabe von CD40-Fc im Herzen komplett neutralisiert werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren wurde die intrakardiale Inflammation als ein wichtiger pathophysiologischer Faktor bei der Entstehung der Herzinsuffizienz diskutiert. Inflammatorische Zytokine wie beispielsweise Matrix-Metalloproteinasen konnten als Trigger des chronischen Myokard-Umbaus (Remodeling) im insuffizienten Herzen identifiziert werden. Als ein weiterer wichtiger Parameter kann der CD40-Ligand im Serum von herzinsuffizienten Patienten erhöht nachgewiesen werden und ist mit der Schwere der Erkrankung positiv korreliert. Nach Aktivierung seines Rezeptors CD40 können über dessen Signalkaskade weitere Entzündungsmediatoren rekrutiert werden.

Die Auswirkung einer therapeutischen Blockade der CD40-Entzündungskaskade auf die Entwicklung der Herzinsuffizienz ist bisher noch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Untersuchung wurde daher der Einfluss der CD40L-Blockade durch CD40-Rezeptor-Überexpression auf die Entwicklung einer dilatativen Herzinsuffizienz im Tiermodell studiert. Die Herzinsuffizienz wird in einem etablierten Kaninchenmodell durch eine mehrtägige Tachykardie mit Hilfe eines Herzschrittmachers, der auf Herzfrequenzen von 320 bis 360 bpm eingestellt ist, zuverlässig induziert. Durch den adenoviralen Gentransfer gelingt es, ein CD40L-bindendes rekombinantes CD40-Fc-Molekül temporär zu exprimieren. Unter Verwendung der Cross-Clamping-Methode wird die Transfektionseffizienz im Herzen erhöht. Sowohl der Nachweis von CD40-Fc im Serum als auch die fluoreszenzmikroskopisch detektierte homogene Expression des rekombinanten CD40-GFP-Fc-Vektors im Myokard weisen auf eine ausreichende Blockade von CD40L im Herzen hin.

Bei Messung der linksventrikulären Verkürzungsfraktion (FS) ergibt sich 14 Tage nach Gentransfer eine signifikante Verbesserung der Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe im Vergleich zur Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe. Der signifikant erhöhte linksventrikuläre enddiastolische Druck der Ad-GFP-Fc-Kontrollgruppe im Vergleich zur Ad-CD40-GFP-Fc-Gruppe bestätigt schließlich auf funktioneller Ebene, dass die sonographischen Daten eine reelle Kontraktilitätsverbesserung nach CD40-Fc-Gabe reflektieren.

Unter Einbeziehung der weiteren Parameter LVDD, LVDs, laterale Wanddicke, Dicke des interventrikulären Septums, LVsys, dp/dt max, dp/dt min und der Herzfrequenz ist eine vollständige Reduktion der Symptome einer Herzinsuffizienz im gewählten Versuchszeitraum aber noch nicht erreicht worden.

ZUSAMMENFASSUNG

Da zu erwarten ist, dass sich die Effekte einer CD40L-Blockade bei Fortschreiten des kardialen Remodeling deutlicher manifestieren, sollte in Langzeitstudien dessen Rolle während der Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz weiter untersucht werden.

6 SUMMARY

Influence of myocardial CD40 ligand blockade to cardiac contractibility and remodelling in the failing rabbit heart via adenoviral gene transfer of CD40-Fc

During the past years cardiac inflammation has been discussed as an important pathophysiological factor at the origin of heart failure.

Inflammatory cytokines such as matrix metalloproteinases could be identified as triggers of chronic myocardial remodelling in the failing heart. The CD40 ligand can be verified in the serum of heart failure patients as another important parameter and has a positive correlation with the severity of the disease. After activation of its receptor CD40, further inflammatory mediators can be recruited via its signalling cascade.

The impact of a therapeutic blockade of the CD40 inflammatory cascade on the development of heart failure has not been analysed yet. Therefore, the influence of CD40L blockade through CD40 receptor overexpression on the development of a dilatative heart failure, has been studied in animal schemes. Heart failure has been steadily induced in an established experimental rabbit model through tachycardia, lasting several days, by using a pacemaker adjusted to the desired heart rate (320-360 bpm). Via adenoviral gene transfer a CD40L binding recombinant molecule is expressed temporarily. Transfection efficiency in the heart has been raised by using the cross-clamping method. Both the evidence of CD40-Fc in the serum and fluorescence microscopy detected homogeneous expression of the recombinant CD40-GFP-Fc vector in the myocardium, refer to an adequate blockade of CD40L in the heart.

Measuring the left ventricular fractional shortening (FS) 14 days after gene transfer, it shows a significant improvement of the Ad-CD40-GFP-Fc-group compared to the Ad-GFP-Fc-control group. The significantly higher left ventricular end diastolic pressure of the Ad-GFP-Fc-control group compared to the Ad-CD40-GFP-Fc-group confirms, after all, on functional level, that the ultrasonographic data reflect a real contractibility enhancement after adding CD40-Fc.

By comprehension of the following parameters, LVDd, LVDs, lateral wall thickness of the interventricular septum, LVsys, dp/dt max, dp/dt min and the heart rate, an improvement of the heart failure could not be reproduced during the chosen experimental period.

SUMMARY

Expecting manifestation of the effects of a CD40L blockade in the progression of the cardiac remodelling more clearly, its role during the emergence of a chronic heart failure should be examined in long-term studies.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AKTHER SA, SKAER C, KYPSON AP, MCDONALD PH, PEPPEL KC, GLOWER DD, LEFKOWITZ RJ, KOCH WJ (1997)

Restoration of β -adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 12100-12105

AMERICAN HEART ASSOCIATION (2004)

2004 Heart and Stroke Statistical Update.

American Heart Association, Dallas, Texas

ANAND SX, VILES-GONZALES JF, BADIMON JJ, CAVUSOGLU E, MARMUR JD (2003)

Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease.

Thrombosis and Haemostasis, 90: 377-384

ANDRE P, NANNIZZI-ALAIMO L, PRASAD SK, PHILLIPS DR (2002)

Platelet-derived CD40L.

Circulation, 106: 896-899

AUKRUST P, UELAND T, MULLER F, ANDREASSEN AK, NORDOY I, AAS H, KJEKSHUS J, SIMONSEN S, FROLAND SS, GULLESTAD L (1998)

Elevated circulating levels of C-Chemokines in patients with congestive heart failure.

Circulation, 97: 1136-1143

BARONE R, PAVAUX C, BLIN PC, CUQ P (1973)

Cor.

In: Barone R, Pavaux C, Blin PC, Cuq P (Hrsg.): Atlas d'anatomie du Lapin, Boulevard Saint-Germain, Paris, 115-118

BAUMGARTNER C (2002)

Myokardiale Apoptosehemmung durch adenoviralen Gentransfer von p35 zur Steigerung der kardialen Kontraktionskraft im insuffizienten Kaninchenherz.

Vet Med Diss, München

BAUMGARTEN G, KNUEFERMANN P, DOUGLAS LM (2000)

Cytokines as emerging targets in the treatment of heart failure.

Trends in Cardiovascular Medicine, 10: 216-223

BEHR TM, WANG X, AIYAR N, COATNEY RW, LI X, KOSTER P, ANGERMANN CE, OHLSTEIN E, FEUERSTEIN GZ, WINAVER J (2000)

Monocyte chemoattractant protein-1 is upregulated in rats with volume-overload congestive heart failure.

Circulation, 102: 1315-1322

- BETT AJ, PREVEC L, GRAHAM FL (1993)
Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors.
Journal of Virology, 67: 5911-5921
- BOEKSTEGERS P, VON DEGENFELD G, GIEHRL W, HEINRICH D, HULLIN R,
KUPATT C, STEINBECK G, BARETTON G, MIDDELER G, KATUS H, FRANZ WM
(2000)
Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins.
Gene Therapy, 7: 232-240
- BÖHM M (2002)
Pathophysiologie der Herzinsuffizienz heute.
Herz 27, 2: 75-91
- BONNEFONT-ROUSSELOT D, MAHMOUDI A, MOUGENOT N, VAROQUAUX O, LE
NAHOUR G, FOURET P, LECHAT P (2002)
Catecholamine effects on cardiac remodelling, oxidative stress and fibrosis in experimental
heart failure.
Redox Report, 7(3): 145-51
- BRAUNWALD E (1998)
Heart failure.
In: Harrison's (Hrsg.): Principles of Internal Medicine, 14. Auflage, McGraw-Hill Verlag,
Ney York, USA, 233: 1287-1281
- BRAUNWALD E (1998)
Normal and abnormal myocardial function.
In: Harrison's (Hrsg.): Principles of Internal Medicine, 14. Auflage, McGraw-Hill Verlag,
New York, USA, 232: 1278-1298
- BRAUNWALD E, BRISTOW MR (2000)
Congestive Heart Failure: Fifty years of progress.
Circulation, 102: IV-14-IV23
- BRISTOW MR (1997)
Mechanism of action of beta-blocking agents in heart failure.
American Journal of Cardiology, 80: 26-40
- BRISTOW MR (2001)
Management of heart failure.
In: Braunwald E, Zipes DZ, Libby P (Hrsg.): Heart disease, 6. Aufl., W.B. Saunders
Company, Philadelphia, 1: 335-652
- BRODY SL, CRYSTAL RG (1994)
Adenovirus-mediated in vivo gene transfer.
Annals of the New York Academy of Science, 716: 90-101

CABEZA N, LI Z, SCHULZ C, KREMMER E, MASSBERG S, BULTMANN A, GAWAZ M (2004)

Surface expression of collagen receptor FC receptor-gamma/glycoprotein VI is enhanced on platelets in type 2 diabetes and mediates release of CD40 ligand and activation of endothelial cells.

Diabetes, 53: 2117-2121

CALVERLEY DC, HACKER MR, LODA KA, BRASS E, BUCHANAN TA, TSAO-WEI DD, GROSHEN S (2003)

Increased platelet Fc receptor expression as a potential contributing cause of platelet hypersensitivity to collagen in diabetes mellitus.

British Journal of Haematology, 121: 139-142

CHAMORRO A (2004)

Role of inflammation in stroke and atherothrombosis.

Cerebrovascular Research, 17: 1-5

CHANCEY AL, BROWER GL, PETERSON JT, JANICKI JS (2002)

Effects of metalloproteinase inhibition on ventricular remodeling due to volume overload.

Circulation, 105: 1983-1988

CICHON G, SCHMIDT HH, BENHIDJEB T, LOSER P, ZIEMER S, HAAS R, GREWE N, SCHNIEDERS F, HEEREN J, MANNS MP, SCHLAG PM, STRAUSS M (1999)

Intravenous administration of recombinant adenoviruses causes thrombocytopenia, anemia and erythroblastosis in rabbits.

Journal of Gene Medicine, 1: 360-371

COLUCCI WS (1996)

Apoptosis in the heart.

The New England Journal of Medicine, 335: 1224-1226

COLUCCI WS (1997)

Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure.

American Journal of Cardiology, 80: 15-25

COLUCCI WS, BRAUNWALD E (2001)

Pathophysiology of heart failure.

In: Braunwald E, Zipes DZ, Libby P (Hrsg.): Heart disease, 6. Aufl., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1: 503-533

DAMAS JK, GULLESTAD L, AUKRUST P (2001)

Cytokines as a new treatment targets in chronic heart failure.

Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine, 2: 271-277

DANESE S, SANS M, FIOCCHI C (2004)

The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease.

Gut, 53: 1035-1043

DANESE S, SCALDAFERRI F, PAPA A, POLA R, GASBARRINI A, SGAMBATO A, CITTADIU A (2004)

CD40L-positive platelets induce CD40L expression de novo in endothelial cells: adding a loop to microvascular inflammation.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 24: 162

DONAHUE JK, KIKKAWA K, JOHNS DC, MARBAN E, LAWRENCE JH (1997)

Ultrarapid, highly efficient viral gene transfer to the heart.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 464-4668

DONAHUE JK, KIKKAWA K, THOMAS AD, MARBAN E, LAWRENCE LH (1998)

Acceleration of widespread adenoviral gene transfer to intact rabbit hearts by coronary perfusion with low calcium and serotonin.

Gene Therapy, 5: 630-634

DOUGLAS JT (2004)

Adenovirus-mediated gene delivery: an overview.

Methods in Molecular Biology, 246: 3-14

ECK SL, WILSON J (1996)

Gene-based therapy.

In: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P (Hrsg.): The pharmacological basis of Therapeutics, 9. Aufl., McGraw-Hill, Inc.; New York, 77-101

EICHHORN EJ, BRISTOW MR (1996)

Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure.

Circulation, 94: 2285-2296

ERHARDT W (1992)

Anästhesie beim Tier.

In: Kronberger L (Hrsg.): Experimentelle Chirurgie, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart: 53-76

EZZAHER A, BOUANINI N, CROZATIER B (1992)

Force-frequency relations and response to ryanodine in failing rabbit hearts.

American Journal of Physiology, 263: H1710-H1715

FALTERMAIER C (2002)

Untersuchung der myokardialen Kontraktionskraft während der Applikation des Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1-Hemmers Etomoxir im Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienzmodell am Kaninchen.

Vet Med Diss, München

FELDMAN LJ, STEG G (1997)

Optimal techniques for arterial gene transfer.

Cardiovascular Research, 3: 391-404

- FRANCIS GS, GASSLER JP, SONNENBLICK EH (2001)
Pathophysiology and diagnosis of heart failure.
In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA (Hrsg.): Hurst's The Heart, 10. Aufl.; McGraw-Hill, New York, USA, 1:655-668
- FREEDMAN JE (2003)
CD40 Ligand – assessing risk of damage?
New England Journal of Medicine, 348: 1163-1165
- FREEDMAN JE (2003)
CD40-CD40L and platelet function. Beyond hemostasis.
Circulation Research, 92: 944-946
- FROMES Y, SALMON A, WANG X, COLLIN H, ROUCH A, HAGEGE A, SCHWARTZ K, FISZMAN MY (1999)
Gene delivery to the myocardium by intrapericardial injection.
Gene Therapy, 6:683-688
- GALIS ZS, KHATRI JJ (2002)
Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly.
Circulation Research, 90: 251-262
- GAFENCU A, HELTIANU C, BURLACU A, HUNZIKER W, SIMIONESCU M (2003)
Investigation of IgG receptor expressed on the surface of human placental endothelial cells.
Placenta, 24: 664-676
- GEISEL O (1976)
Anleitung zur Sektion von Haussäugetieren und zur Anfertigung von Sektionsprotokollen.
Institut für Tierpathologie der Universität München
- GRAHAM FL, PREVEC L (1991)
Manipulation of adenovirus vectors.
In: Murray EJ (Hrsg.): Methods in Molecular Biology, Aufl. 7, The Humana Press Inc.; New York, 109-128
- GRAHAM FL, PREVEC L (1995)
Methods for construction of adenovirus vectors.
Molecular Biotechnology, 3: 207-220
- GUZMAN RJ, LEMARCHAND P, CRYSTAL RG, EPSTEIN SE, FINKEL T (1993)
Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors.
Circulation Research, 73: 1202-1207
- HAJJAR RJ, DELMONTE F, MATSUI T, ROSENZWEIG A (2000)
Prospects for gene therapy for heart failure.
Circulation Research, 86: 616-621

- HAJJAR RJ, SCHMIDT U, MATSUI T, GUERRERO JL, LEE K-H, GWATHMEY JK, DEC GW, SEMIGRAN MJ (1998)
Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 5251-5256
- HARDING SA, SARMA J, JOSEPHS DH, CRUDEN NL, DIN JN, TWOMEY PJ, FOX KAA, NEWBY DE (2004)
Upregulation of the CD40/CD40 Ligand Dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers.
Circulation, 109: 1926-1929
- HASENFUSS G (1998)
Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy.
Cardiovascular Research, 39: 60-76
- HAUNSTETTER A, IZUMO S (2000)
Toward antiapoptosis as a new treatment modality.
Circulation Research, 86: 371
- HE T-C, ZHOU S, DACOSTA LT, YU J, KINZLER KW, VOGELSTEIN B (1998)
A simplified system for generating recombinant adenoviruses.
Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 95: 2509-2514
- HENKE J, HABERSTROH J (2004)
Kaninchen.
In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J (Hrsg.): Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier sowie bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen, Schattauer Verlag; Stuttgart, New York: 629
- HENN V, SLUPSKY JR, GRÄFE M, ANAGNOSTOPOULOS I, FÖRSTER R, MÜLLER-BERGHAUS G, KROCZEK R (1998)
CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells.
Nature, 391: 591-594
- HENN V, STEINBACH S, BÜCHNER K, PRESEK P, KROCZEK RA (2001)
The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40.
Blood, 98: 1047-1054
- HEROLD G (2002)
Herzinsuffizienz.
Innere Medizin
168-171
- HEESCHEN C, DIMMELER S, HAMM CW, VAN DEN BRAND MJ, BOERSMA E, ZEIHNER AM, SIMOONS ML (2003)
Soluble CD40 Ligand in acute coronary syndromes.
The New England Journal of Medicine, 348: 1104-1111

HILLYER EV, QUESENBERRY KE (1997)

Cardiovascular System.

In: Hillyer EV, Quesenberry KE (Hrsg.): Ferrets, Rabbits and Rodents, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 148-153

HONGO M, RYOKE T, ROSS J (1997)

Animal models in heart failure.

Trends in Cardiovascular Medicine, 7: 161-167

HORTON DB, LIBBY P, SCHÖNBECK U (2001)

Ligation of CD40 on vascular smooth muscle cells mediates loss of interstitial collagen via matrix metalloproteinases activity.

The Annals of the New York Academy of Sciences, 947: 329-336

IANNINI JP, SPINALE FG (1996)

The identification of contributory mechanisms for the development and progression of congestive heart failure in animal models.

Journal of Heart. Lung. Transplant, 15: 1138-1150

IKEDA U, SHIMADA K (2003)

Matrix metalloproteinases and coronary artery disease.

Clinical Cardiology, 26: 55-59

INWALD DP, MCDOWALL A, PETERS M, CALLARD RE, KLEIN NJ (2003)

CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation.

Circulation Research, 92: 1041-1055

THE INTERNATIONAL SMALL ANIMAL CARDIAC HEALTH COUNCIL (ISACHC):

Recommendations for the diagnosis of heart disease and the treatment of heart failure in small animals.

Academy of Veterinary Cardiology 1994.

ISNER JM (2002)

Myocardial gene therapy.

Nature, 415: 234-239

ISNER JM, PIECZEK A, SCHAINFELD R, BLAIR R, HALEY L, ASAHARA T,

ROSENFELD K, RAZVI S, WALSH K, SYMES JF (1996)

Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of ph VEGF 165 in patients with ischaemic limb.

Lancet, 348: 370-374

JAMES TN, SHERF L (1968)

Ultrastructure of myocardial cells.

The American Journal of Cardiology, 22:389-416

LITERATURVERZEICHNIS

JANICKI JS, BROWER GL, GARDNER JD, CHANCEY AL, STEWARD JA (2004)
The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling.

Heart Failure Reviews, 9: 33-42

JESSUP M, BROZENA S (2003)

Heart failure.

The New England Journal of Medicine, 348: 2007-2018

KASS-EISLER A, FALCK-PEDERSEN E, ALVIRA M, RIVERA J, BUTTRICK PM, WITTENBERG BA, CIPRIANI L, LEINWAND LA (1993)

Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90: 11498-11502

KERN A (1927)

Das Kaninchenherz.

Morphologisches Jahrbuch, 58: 125-152

KHAN A, MOE GW, NILI N, REZAEI E, ESKANDARIAN M, BUTANY J, STRAUSS BH (2004)

The cardiac atria are chambers of active remodeling and dynamic collagen turnover during involving heart failure.

Journal of American College of Cardiology, 43: 68-76

KHOYNEZHAD A, JALALI Z, TOTOLANI AJ (2004)

Apoptosis: Pathophysiology and therapeutic implications for cardiac surgeons.

Annals of Thoracic Surgery, 78: 1109-1118

KIRSHENBAUM LA, MACLELLAN WR, MAZUR W, FRENCH BA, SCHNEIDER MD (1993)

Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus.

Journal of Clinical Investigation, 92: 831-837

KNOBLOCH A (2001)

Etablierung eines Tachykardie-induzierten Herzinsuffizienzmodells am Kaninchen zur Anwendung von adenoviralem Gentransfer am Myokard.

Vet Med Diss, München

KOMAMURA K, SHANNON RP, PASIPOULARIDES A (1992)

Alteration in left ventricular diastolic function in conscious dogs with pacing-induced heart failure.

Journal of Clinical Investigation, 89: 1825-1838

KRAUSE W (1884)

Herz.

In: Krause W (Hrsg.): Anatomie des Kaninchens, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, 244-248

- KUMAR D, LOU H, SINGAL PK (2002)
Oxidativer Stress und Apoptose bei kardialer Dysfunktion.
Herz 27, 7: 662-668
- LAUGWITZ KL, MORETTI A, WEIG HJ, GILLITZER A, PINKERNELL K, OTT T, PRAGST I, STÄDELE C, SEYFARTH M, SCHOMIG A, UNGERER M (2001)
Blocking caspase-activated apoptosis improves contractility in failing myocardium.
Human Gene Therapy, 12: 2051-2063
- LI H, SIMON H, BOCAN TM, PETERSON JT (2000)
MMP/TIMP expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: the effect of ACE- and MMP-inhibition.
Cardiovascular Research, 46: 289-306
- LIU Y, CIGOLA E, CHENG W, KAJSTURA J, OLIVETTI G, HINTZE TH, ANVERSA P (1995)
Myocyte nuclear mitotic division and programmed cell death characterize the cardiac myopathy induced by rapid ventricular pacing in dogs.
Laboratory Investigation, 6: 771-787
- LOGEART D, HATEN SN, HEIMBURGER M, LE ROUX A, MICHEL J-B, MERCADIER J-J (2001)
How to optimize in vivo gene transfer of cardiac myocytes: mechanical or pharmacological procedures?
Human Gene Therapy, 12: 1601-1610
- MACH F, SCHÖNBECK U, FABUNMI RP, MURPHY C, ATKINSON E, BONNEFOY J-Y, GRABNER P, LIBBY P (1999)
T Lymphocytes induce endothelial cell matrix metalloproteinase expression by CD40L-dependent mechanism. Implications for tubule formation.
American Journal of Pathology, 154: 229-238
- MACH F, SCHÖNBECK U, SUKHOVA GK, ATKINSON E, LIBBY P (1998)
Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling.
Nature, 394: 200-203
- MACLELLAN WR, SCHNEIDER MD (1997)
Death by design, programmed cell death in cardiovascular biology and disease.
Circulation Research, 81: 137-144
- MAISCH B (1995)
Extrazelluläre Matrix und Interstitium des Herzens: "Restriktion" ist häufiger als gedacht.
Herz 20, 75-80
- MASAKI H, IMAIZUMI T, ANDO S, HIROOKA Y, HARADA S, MOMOHARA M, NAGANO M, TAKESHITA A (1993)
Production of chronic congestive heart failure by rapid ventricular pacing in the rabbit.
Cardiovascular Research, 27: 828-831

- MASAKI HIMAIZUMI T, HARASAWA Y, TAKESHITA A (1994)
Dynamic arterial baroreflex in rabbit with heart failure induced by rapid pacing.
American Journal of Physiology, 267: 92-99
- MAURICE JP, HATA JA, SHAH AS, WHITE DC, MCDONALD PH, DOLBER PC, WILSON KH, LEFKOWITZ RJ, GLOWER DD, KOCH WJ (1999)
Enhancement of cardiac function after adenoviral-mediated in vivo intracoronary β_2 -adrenergic receptor gene delivery.
Journal of Clinical Investigations, 104: 21-29
- MAY AE, KÄLSCH T, MASSBERG S, HEROUY Y, SCHMIDT R, GAWAZ M (2003)
Engagement of glycoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells.
Circulation, 106: 2111-2117
- MCDONNELL S, MORGAN M, LYNCH C (1999)
Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes.
Biochemical Society Transactions, 27: 734-740
- MORGAN AR, ZHANG B, TAPPER W, COLLINS A, YE S (2003)
Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease.
Journal of Molecular Medicine, 81: 321-326
- MÜHLHAUSER J, JONES M, YAMADA I, CIRIELLI C, LEMARCHAND P, GLOE TR, BEWIG B, SIGNORETTI S, CRYSTAL RG, CAPOGROSSI MC (1996)
Safety and efficacy of in vivo gene transfer into the porcine heart with recombination-deficient, recombinant adenovirus vectors.
Gene Therapy, 3: 145-153
- MULLIGAN RC (1993)
The basic science of gene therapy.
Science, 260: 926-932
- NABEL EG, DZAU VJ (2001)
Cardiovascular tissue odification by genetic approaches.
In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA (Hrsg.): *Hurst's The Heart*, 10. Aufl., Mc Graw-Hill, New York, USA, 157
- NARULA J, HAIDER N, VIRMANI R, DISALVO TG, KOLODGIE FD, HAJJAR RJ, SCHMIDT U, SEMIGRAN MJ, DEC GW, KHAB B-A (1996)
Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure.
The New England Journal of Medicine, 335: 1182-1189
- NARULA J, KHARBANDA S, KHAW B-A (1997)
Apoptosis and the heart.
Chest, 112: 1358-1362

- OLIVETTI G, ABBI R, QUAINI F, KAJSTURA J, CHENG W, NITAHARA JA, QUAINI E, LORETO C, BELTRAMI CA, KRAJEWSKI S, REED JC, ANVERSA P (1997)
Apoptosis in the failing human heart.
New England Journal of Medicine, 336: 1131-1141
- PADDLEFORD RR, ERHARDT W (1992)
Allgemeinanästhesie.
Paddleford RR, Erhardt W (Hrsg.): Anästhesie beim Kleintier,
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 37-87
- PAUSCHINGER M, CHANDDRASEKHARAN K, LI J, SCHWIMMBECK PL,
NOUTSIAS M, SCHULTHEISS HP (2002)
Remodeling der extrazellulären Matrix bei dilatativer Kardiomyopathie.
Herz 27, 7: 677-682
- PENG D-Q, ZHAO S-P, LI Y-F, LI J, ZHOU H-N (2002)
Elevated soluble CD40 ligand is related to the endothelial adhesion molecules in patients with
acute coronary syndrome.
Clinica Chimica Acta, 319: 19-26
- PETERSON JT, HALLAK H, JOHNSON L, LI H, O'BRIEN PM, SLISKOVIC DR,
BOCAN TM, COKER ML, ETOH T, SPINALE FG (2001)
Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in
a rat model of progressive heart failure.
Circulation, 103: 2303-2309
- PETROFSKI JA, KOCH WJ (2003)
The beta-adrenergic receptor kinase in heart failure.
Journal of Molecular Cellular Cardiology, 35: 1167-1174
- PIESKE B, HASENFUSS G (2000)
Pathophysiologische Grundlagen der Herzinsuffizienz.
Therapeutische Umschau, 5:284-292
- ROBERT KOCH INSTITUT (1999)
Allgemeine Stellungnahme der ZKBS zu häufig durchgeführten gentechnischen Arbeiten mit
den zugrunde liegenden Kriterien der Vergleichbarkeit: Gentransfer mit Hilfe von
rekombinantem Adenovirus Typ 5.
Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS), 1-13
- ROSKAMM H, REINDELL H (1989)
Definition der Herzinsuffizienz.
In: Roskamm H, Reindell H (Hrsg.): Herzkrankheiten, 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin,
444-445
- RYU K-H, TANAKA N, DALTON N, MAO L, ROCKMAN H, MILANO C, ROSS J (1997)
Force-frequency relations in the failing rabbit heart and responses to adrenergic stimulation.
Journal of Cardiac Failure, 3: 27-39

SABBAH HN, SHAROV VG (1998)

Apoptosis in heart failure.

Progression in Cardiovascular Diseases, 40: 549-562

SABRI A, FARHADIAN F, CONTARD F, SAMUEL JL, RAPPAPORT L (1995)

Fibronectinexpression im kardiovaskulären System.

Herz 20, 118-126

SCHÖNBECK U, LIBBY P (2001)

CD40 signaling and plaque instability.

Circulation Research, 89: 1092-1103

SCHÖNBECK U, LIBBY P (2001)

The CD40/CD154 receptor/ligand dyad.

Cellular and Molecular Life Science, 58: 4-43

SCHÖNBECK U, MACH F, BONNEFOY J-Y, LOPPNOW H, FLAD H-D, LIBBY P (1997)

Ligation of CD40 activates Interleucin 1 β -converting enzyme (Caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active Interleucin 1 β .

The Journal of Biological Chemistry, 31: 19569-19574

SCHÖNBECK U, MACH F, LIBBY P (2000)

Molecules in focus CD154 (ligand).

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 32: 687-693

SCHÖNBECK U, MACH F, SUKHOVA GK, MURPHY C, BONNEFOY JY, FABUNMI RP, LIBBY P (1997)

Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T-lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture.

Circulation Research, 81: 448-454

SCHÖNBECK U, SUKHOVA GK, SHIMIZU K, MACH F, LIBBY P (2000)

Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97: 6930-6932

SCHRIER RW, ABRAHAM WT (1999)

Hormones and haemodynamics in heart failure.

The New England Journal of Medicine, 8: 577-585

SHAROV VG, SABBAH HN, ALI AS, SHIMOYAMA H, LESCH M, GOLDSTEIN S (1997)

Abnormalities of cardiocytes in regions bordering fibrous scars of dog with heart failure.

International Journal of Cardiology, 60: 273-279

SHAROV VG, SABBAH HN, SHIMOYAMA H, GOUSSEV AV, LESCH M, GOLDSTEIN S (1996)

Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure.

American Journal of Pathology, 148: 141-149

SEDWICK CJ, ERHARDT W, KORBEL R, LENDL C (1992)

Anästhesie beim Kaninchen.

In: Paddleford RR, Erhardt W: Anästhesie der Kleintiere, Schattauer Verlag, Stuttgart, 371-374

SIWIK DA, COLUCCI WS (2004)

Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium.

Heart Failure Reviews, 9: 43-51

SPINALE FG, COKER ML, KROMBACH SR, MUKHERJEE R, HALLAK H, HOUCK WV, CLAIR MJ, KRIBBS SB, JOHNSON LL, PETERSON JT, ZILE MR (1999)

Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure: effects on left ventricular dimensions and function.

Circulation research, 85: 364-376

SPINALE FG (2002)

Matrix metalloproteinases regulation and dysregulation in the failing heart.

Circulation Research, 90: 520-530

SPINALE FG, EBLE DM, MUKHERJEE R, JOHNSON WS, WLAKER (1994)

Left ventricular and myocyte structure and function following chronic ventricular tachycardia in rabbits.

Basic Research of Cardiology, 89: 456-467

SPINALE FG, FULBRIGHT M, MUKHERJEE R, TANAKA R, HU J, CRAWFORD FA, ZILE MR (1992)

Relation between ventricular and myocyte function with tachycardia-induced cardiomyopathy.

Circulation Research, 71: 174-187

SPINALE FG, HENDRICK DA, CRAWFORD FA, SMITH AC, HAMADA Y, CARABELLO BA (1990)

Chronic supraventricular dysfunction and subendocardial injury in swine.

American Journal of Physiology, 259: 218-229

SPINALE FG, MYTSI LC, CHADWICK VT, WALKER JD, MUKHERJEE R, HEBBAR L (1998)

Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure. Relation to ventricular and myocyte function.

Circulation Research, 82: 482-495

SPINALE FG, PETERSON JT (2004)

Introduction to special issue on the matrix metalloproteinases: New insights into myocardial remodeling.

Heart Failure Reviews, 9: 5-6

SPINALE FG, TANAKA R, CRAWFORD FA, ZILE MR (1992)

Changes in myocardial blood flow during development of recovery from tachycardia-induced cardiomyopathy.

Circulation, 85: 717-729

STÄDELE C (2001)

Intrakoronarer adenoviraler Gentransfer zur Erhöhung der myokardialen Kontraktionskraft beim Kaninchen.

Vet Med Diss, München

STEPHAN DJ, YANG ZY, SAN H, SIMARI RD, WHEELER CJ, FELGNER PL, GORDON D, NABEL GJ, NABEL EG (1996)

A new cationic liposome DANN complex enhances the efficiency of arterial gene transfer in vivo.

Human Gene Therapy, 7: 1803-1812

STUMPF C, LEHNER C, ESKAFI S, RAAZ D, YILMAZ A, ROPERS S, SCHMEISSER A, LUDWIG J, DANIEL WG, GARLICH S CD (2003)

Enhanced levels of CD 154 (CD40 ligand) on platelets in patients with chronic heart failure.

European Journal of Heart Failure, 5: 629-637

SUTTON MGSJ, SHARPE N (2000)

Left ventricular remodeling after myocardial infarction, pathophysiology and therapy.

Circulation, 101: 2981-2988

SZMITKO PE, WANG C-H, WEISEL RD, DE ALMEIDA JR, ANDERSON TJ, VERMA S (2003)

New markers of inflammation and endothelial cell activation. Part I.

Circulation, 108: 1917-1923

SZMITKO PE, WANG C-H, WEISEL RD, JEFFRIES GA, ANDERSON TJ, VERMA S (2003)

Biomarkers of vascular disease linking inflammation to endothelial activation. Part II.

Circulation, 108: 2041-2048

TIERSCHUTZGESETZ VOM 25. MAI 1998

BGBl, 1998: 1105

TRIPATHY SK, BLACK HB, GOLDWASSER E, LEIDEN JM

Immune response to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors.

Nature Medicine, 2: 545-550

TYAGI SC (1998)

Extracellular matrix dynamics in heart failure: A prospect for gene therapy.

Journal of Cellular Biochemistry, 68: 403-410

UNGEMACH F (1999)

Herzwirksame Pharmaka.

In: Löscher w, Ungemach F, Kroker R (Hrsg.), Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. 4. Auflage, Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, 124-140

UNGERER M, BÖHM M, ERDMANN E, LOHSE MJ (1993)

Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β 1-adrenergic receptors in the failing human heart.

Circulation, 87: 454-463

UNGERER M, WEIG H-J, KÜBERT S, OVERBECK M, BENDEL F, SCHÖMIG A, SCHWAIGER M (2000)

Regional pre- and postsynaptic sympathetic system in the failing human heart- regulation of β ARK-1.

European Journal of Heart Failure, 2: 23-31

URBRICH C, DIMMELER S (2004)

CD40 and vascular inflammation.

Canadian Journal of Cardiology, 20: 681-683

VAN KOOTEN C, BANCHEREAU J (2000)

CD40-CD40 ligand.

Journal of Leukocyte Biology, 67: 2-17

VARON N, DE LEMOS JA, LIBBY P, MORROW DA, MURPHY SA, NUZZO R, GIBSON M, CANNON CP, BRAUNWALD E, SCHÖNBECK U (2003)

Risk prediction after acute coronary syndromes.

Circulation, 108: 1049-1052

VISHNEVETSKY D, KIYANISTA VA, GANDHI PJ (2004)

CD40ligand : A novel target in the fight against cardiovascular disease.

The Annals of Pharmacotherapy, 38: 1500-1508

WEBER KT, SUN Y, KATWA LC (1995)

Lokale Regulation der Struktur der extrazellulären Matrix.

Herz 20, 81-88

WEIG HJ, LAUGWITZ KL, MORETTI A, KRONSBELN K STÄDELE C, BRUNING S, SEYFARTH M, BRILL T, SCHOMIG A, UNGERER M (2000)

Enhanced cardiac contractility after gene transfer of V2 vasopressin receptors In vivo by ultrasound-guided injection or transcatheter delivery.

Circulation, 101: 1578-1585

WILKE A, SCHÖNIAN U, HERZUM M, HENGSTENBERG C, HUFNAGEL G, BRILLA CG, MAISCH B (1995)

Extrazelluläre Matrix und Zytoskelett des Myokards bei kardialer Entzündungsreaktion.

Herz 20, 2: 95-108

WILSON JM (1996)

Adenovirus as gene-delivery vehicles.

The New England Journal of Medicine, 334: 1185-1187

WILSON JR, DOUGLAS P, HICKEY WF (1987)

Experimental congestive heart failure produced by rapid ventricular pacing in the dog.

Circulation, 75:857-867

XU Y, SONG G (2004)

The role of CD40-CD154 interaction in cell immunoregulation.

Journal of Biomedical Science, 11:426-438

YAN J, WU Z, KONG X, ZONG R, ZHAN L (2004)

Relation between upregulation of CD40 system and complex stenosis morphology in patients with acute coronary syndrome.

Acta Pharmacologica Sinica, 25: 251-256

YNDESTAD A, DAMAS JK, EIKEN HG, HOLM T, HAUG T, SIMONSEN S, FROLAND SS, GULLESTAD L, AUKRUST P (2002)

Increased gene expression of tumor necrosis factor superfamily ligands in peripheral blood mononuclear cells during chronic heart failure.

Cardiovascular Research, 54: 175-182

ZILLER C, STOECKEL F, BOON L, HAEGEL-KRONRNBERGER H (2002)

Tansient blocking of both B7.1 (CD80) and B7.2 (CD 86) in addition to CD40-CD40L

interaction fully abrogates the immune response following systemic injection of adenovirus vector.

Gene Therapy, 9: 537-546

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Klassifizierung der NYHA im Vergleich zur ISACHC	4
Tabelle 2: Versuchsplan	38
Tabelle 3: Gewichtsentwicklung (KGW, relativ, %) im Versuchszeitraum	66
Tabelle 4: Verkürzungsfraction (Fractional Shortening) der Gruppen in Prozent.....	68
Tabelle 5: Echokardiographische Daten der enddiastolischen und endsystolischen Diameter (LVDD und LVDs) des linken Ventrikels der Versuchsgruppen	70
Tabelle 6: Dicke der lateralen Außenwand des linken Ventrikels	72
Tabelle 7: Dicke des interventrikulären Septums.....	73
Tabelle 8: Entwicklung des maximalen systolischen Druckes im linken Ventrikel (LVsys) in mmHg unter Stimulation mit Isoprenalin ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	76
Tabelle 9: Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit im linken Ventrikel (LV dp/dt max) in mmHg unter Stimulation mit Isoprenalin (in $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$).....	78
Tabelle 10: Maximale Druckabfallgeschwindigkeit im linken Ventrikel (LV dp/dt min) in mmHg unter Stimulation mit Isoprenalin (in $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)	80
Tabelle 11: Entwicklung der Herzfrequenz unter Isoprenalinstimulation	82
Tabelle 12: Linksventrikulärer Druck in der enddiastolischen Phase (LVEDP)	73

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Wichtige pathophysiologische Prozesse bei der Herzinsuffizienz..... 6

Abbildung 2: Apoptose-auslösende Faktoren und deren mögliche Wirkungen auf das Myokard..... 8

Abbildung 3: Überblick über die Mechanismen der myokardialen Umbauprozesse..... 9

Abbildung 4: Troponin-Tropomyosin-Komplex..... 11

Abbildung 5: Mikroskopische Struktur des Herzmuskels..... 13

Abbildung 6: Remodeling des linken Ventrikels bei Herzinsuffizienz mit Hypertrophie und Dilatation 17

Abbildung 7: Aktivierung von MMP-9 durch oxygeniertes LDL, Sauerstoffradikale, TNF- α und IL-1 19

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Struktur des CD40L-Proteins.....20

Abbildung 9: Schematische Darstellung des CD40-Rezeptors.....21

Abbildung 10: Aktivierung des CD40-Liganden 24

Abbildung 11: Anatomie des Kaninchenherzens 26

Abbildung 12: Beispiel der Herstellung rekombinanter replikationsdefekter Ad5..... 31

Abbildung 13: EKG, Kaninchen, Extrasystolen..... 46

Abbildung 14: EKG, Kaninchen Schrittmacherimpulse.....47

Abbildung 15: Röntgenkontrolle Thorax mit Sonde im rechten Ventrikel.....48

Abbildung 16: Röntgenkontrolle beim Cross-Clamping mit Kontrastmittel.....50

Abbildung 17: Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels, B-Mode.....53

Abbildung 18: Echokardiographische Darstellung des linken Ventrikels im M-Mode.....53

Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopischer Antikörpernachweis von GFP im Herzen.....56

Abbildung 20: Immunhistochemischer Nachweis von GFP im Myokard im Vergleich zu einem Kontrollherz eines nativen Tieres.....58

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 21: In-vitro-Charakterisierung von rekombinantem Fc-Fragment und CD40-Fc..	61
Abbildung 22: Bindung von Fc und CD40-Fc an nicht stimulierte und an Thrombin stimulierte Thrombozyten von Kaninchen	62
Abbildung 23: CD40-Fc hemmt CD40L induzierte ICAM-1 Expression auf humanen Endothelzellen von Umbilikalgefäßen (HUVECs)	63
Abbildung 24: Körpergewicht der Versuchstiere.....	65
Abbildung 25: Linksventrikuläre Verkürzungsfraction (FS).....	67
Abbildung 26: Enddiastolischer (A) und endsystolischer (B) Durchmesser des linken Ventrikels	69
Abbildung 27: Sonographische Messung der lateralen Wanddicke des linken Ventrikels in der Diastole	72
Abbildung 28: Sonographische Messung der Dicke des interventrikulären Septums des linken Ventrikels in der Diastole.....	73
Abbildung 29: Entwicklung des maximalen systolischen Druckes im linken Ventrikels unter Isoprenalinstimulation (LVsys).....	75
Abbildung 30: Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel	77
Abbildung 31: Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit im linken Ventrikel	79
Abbildung 32: Entwicklung der Herzfrequenz unter Isoprenalinstimulation	81
Abbildung 33: Linksventrikulärer Druck in der Enddiastole (LV EDP)	83
Abbildung 34: Darstellung der Entwicklung der CD40-Fc- und CD40L-Titer im Serum von CD40-Fc exprimierenden Tieren.....	84

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
pg	Mikrogramm
§	Paragraph
%	Prozent
A.	Arterie
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADP	Adenosin Diphosphat
AST	Aspartat-Amino-Transferase
β	beta
bpm	beats per minute = Schläge pro Minute
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl	Kalziumchlorid
CD40	Differenzierungsantigen40 (engl. cluster of differentiation bzw. cluster determinants)
CD40L	Ligand von CD40
CHF	congestive heart failure = kongestive Herzinsuffizienz
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CrmA	cytokine response modifier A
d	day = Tag
DCM	dilated cardiomyopathy = Dilatative Kardiomyopathie
dex.	dextra/dexter
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
engl.	englisch
et al.	et altera = und Mitarbeiter

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

etc.	et cetera
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
Fa.	Firma
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FLDH	Glutamat-Dehydrogenase
FS	fractional shortening (prozentuale systolische Durchmesserverkürzung)
g	Gramm
g	Faktor für die Erdbeschleunigung
GFP	green fluorescent protein
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen (human embryonal kidney)
HeLa-Zellen	erste maligne humane Zelllinie, die sich in Kultivierung befindet, aus Tumorzellen von Henrietta Lacks gewonnen
HEPES	Puffer: 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HI	Herzinsuffizienz
HF	Herzfrequenz
HIV	human immunodeficiency virus
ICAD	inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
ICAM-1	inter cellular adhesion molecule-1
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
ISACHC	International Small Animal Cardiac Health Council
i.v./IV	intravenös
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton (Masseneinheit)
kg	Kilogramm
KG	Kontrollgruppe
KGW	Körpergewicht
KpnI/NotI	Schnittstelle eines Restriktionsenzym
l	Liter
LVDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVDs	Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

M.	Musculus
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäure
mmol	Millimol (10 ⁻³ mol)
mM	millimol/l
M	Mol/l
MMP	Matrix Metalloproteinase
MW	arithmetisches Mittel
nmol	nanomol
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NIH	National Institutes of Health
NotI/HindIII	Schnittstelle eines Restriktionsenzym
Nr.	Nummer
NYHA	New York Heart Association
ox-LDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
pfu	plaque forming units
PF4	platelet factor 4
pH	pH-Wert = negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Ref.	Referenzbereich
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	„reactive oxygen species“ = reaktive Sauerstoffderivate
S	Signifikanz

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

sec	Sekunde(n)
SD	standard deviation = Standardabweichung
SEM	standard error = Standardfehler
sin.	sinistra/sinister
SM	Herzschrittmacher
sn-RNA	small nuclear RNA
sog.	so genannt
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming Growth Factor- beta 1
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TSP	Thrombospondin
TUNEL	„terminal transferase deoxyuridine nick-end labelling“-Methode
U	Unit, Einheit
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
V.	Vena
v.a.	vor allem
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VG	Versuchsgruppe
vs.	versus, im Gegensatz
vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

11 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. J. Hirschberger danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Herrn PD Dr. med. M. Ungerer und Dr. med. H.-J. Weig danke ich für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Anleitung bei der Anfertigung der vorliegenden Studie.

Der Firma ProCorde AG in Martinsried danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Frau Dr. med. vet. C. Baumgartner für die sehr gute fachliche Betreuung bei der Durchführung des Projektes, die mehrmalige Durchsicht des Manuskriptes, die Motivationshilfen und die jederzeit geduldige und entgegenkommende Unterstützung in dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die Durchsicht des Manuskriptes und die jederzeit gewährte freundliche und hilfreiche Unterstützung.

Von Herzen danken möchte ich Herrn Dr. med. M. Neuenhahn für seine tatkräftige Unterstützung und die Verbesserungsvorschläge für das Manuskript.

Allen Mitarbeitern der Firma ProCorde GmbH und des Instituts für Experimentelle Chirurgie der TU München möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft danken.

Meinen Freunden sei ein herzliches Dankeschön für ihre Geduld und Unterstützung ausgesprochen.

Mein innigster Dank gilt meinen Eltern, die mir die Gelegenheit zu diesem Werdegang gegeben haben und somit auch die vorliegende Arbeit erst ermöglichten.

12 LEBENS LAUF

Name	Patricia Löffler
Geburtsdatum und -ort	13.01.1975 in Göppingen
Vater	Eugen Peter Löffler
Mutter	Eva Maria Löffler
Staatsangehörigkeit	deutsch
Schulische Ausbildung	1981 bis 1985: Blumhardt-Grundschule, Göppingen 1985 bis 1994: Freihof-Gymnasium, Göppingen Allgemeine Hochschulreife: Juni 1994
Berufliche Ausbildung	1994 bis 1995: Pferdeklinik Dr. Witzmann, Kirchheim/Teck 1995 bis 1996: Praxis G. Grün, Göppingen, Tierärzthelferin
Universitätsausbildung	Oktober 1996 bis April 2002 Studium der Tiermedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität-München
Tierärztliche Approbation	30. April 2002
Dissertation	seit 01. Juni 2002 Doktorandin am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
Berufliche Tätigkeit	seit 01. Mai 2003 Anstellung als Tierärztin am Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München