Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinbeck

Myokardialer Gentransfer mittels Adenoassoziierter Viraler Vektoren

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

vorgelegt von

Sebastian Delker
aus Mainz

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Peter Boekstegers
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Gunnar Schotta
	Prof. Dr. med. Bernhard Kuch
Mitbetreuung durch den Promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Philip Raake
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2012

Für Ruth, Eva und meine Eltern

Gliederung

I. Einleitung *S. 7*

I.1. Kardiale und Kardiovaskuläre Erkrankungen *S. 7*
I.2. Ansatzpunkte der kardialen Gentherapie *S. 7*
I.3. Limitationen der kardialen Gentherapie *S. 9*
I.4. Myokardialer Gentransfer Adenoassoziierter Viraler Vektoren über die selektive druckkontrollierte Retroinfusion *S. 10*
I.5. Fragestellungen *S. 11*

II. Material und Methoden *S. 13*

II.1. Studienprotokoll *S. 13*
II.2. Gewinnung der Adenoassoziierten Viralen Vektoren *S. 14*
II.3. Versuchstag 0: Gentransfer *S. 15*

II.3.1. Vorbereitung, Narkose und Überwachung *S. 15*
II.3.2. Arterielle und venöse Gefäßzugänge *S. 16*
II.3.3. Katheterisierung des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie *S. 17*
II.3.4. Katheterisierung der anterioren interventrikulären Vene durch den Sinus Coronarius *S. 17*
II.3.5. Vektorapplikation mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion *S. 18*

II.3.5.1. Das Prinzip der selektiven druckregulierten Retroinfusion *S. 18*
II.3.5.2. Retrograde Applikation der Adenoassoziierten Viralen Vektoren in die Koronar-vene *S. 20*

II.3.6. Narkoseausleitung und postoperative Überwachung *S. 24*

II.4. Versuchstag 28: Gewebegewinnung *S. 24*

II.4.1. Vorbereitung, Narkose und Überwachung *S. 24*
II.4.2. Gefäßzugänge *S. 25*
II.4.3. Katheterisierung des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie *S. 25*
II.4.4. Herzexplantation, Euthanasie *S. 25*
II.4.5. Unterteilung des explantierten Herzens in mehrere Gewebeproben *S. 26*
II.4.6. Entnahme peripherer Gewebeproben *S. 27*
II.4.7. Lagerung der Gewebeproben *S. 27*

II.5. Datengewinnung *S. 28*

II.5.1. Histologie *S. 28*
II.5.2. Polymerasekettenreaktion *S. 28*
II.5.3. Luciferaseprobe *S. 30*

II.6. Statistische Datenanalyse *S. 32*

III. Ergebnisse *S. 33*

III.1. Ausgangssituation *S. 33*
III.2. Transduktionseffizienz im Zielgebiet *S. 34*
III.3. Verteilungsmuster im Zielgebiet *S. 35*
III.4. Zytopathischer Effekt *S. 37*
III.5. Transduktion von Extrakardialen Organen *S. 38*

IV. Diskussion *S. 40*

IV.1. Durchführung der Studie *S. 40*

IV.1.1. Die selektive druckregulierte Retroinfusion (SSRI) *S. 40*
IV.1.2. Adenoassoziierte Virale Vektoren (AAV) *S. 41*
IV.1.3. AAV Serotypen 2 und 6 *S. 43*
IV.1.4. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) *S. 43*

IV.2. Diskussion der Studienergebnisse *S. 44*

IV.2.1. AAV Serotyp 6 zeigt eine höhere Transduktions-effizienz *S. 44*
IV.2.2. Simultane VEGF-Applikation erhöht die Transduktions-effizienz *S. 46*
IV.2.3. Verteilungsmuster der transgenen Expression im Zielgebiet *S. 47*
IV.2.4. Nachweis von Vektorgenom in Lunge und Leber *S. 49*
IV.2.5. Lunge und Leber zeigen keine transgene Expression *S. 49*

IV.3. Limitationen und Übertragbarkeit *S. 50*

V. Zusammenfassung *S. 52*

VI. Literaturverzeichnis *S. 54*

VII. Abkürzungen *S. 68*

VIII. Danksagung *S. 73*

IX. Lebenslauf *S. 75*

I.1. KARDIALE UND KARDIOVASKULÄRE ERKRANKUNGEN

Nach wie vor gehören Erkrankungen des Herzens trotz intensiver Forschung und konsequenter Behandlung zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen[7;90;91;146]. Neben der hohen Mortalität bedingen sie bei höchster Morbidität enorme ökonomische Kosten[28;67;86].

Die therapeutischen Optionen basieren auf den drei Säulen der interventionell-kardiologischen und operativen Verfahren, sowie der medikamentösen Therapie[94] beispielsweise einer Kardiomyopathie durch Betablocker, ACE-Hemmer und Nitrate mit der Aussicht auf Lebenszeitverlängerung und/oder Lebensqualitätverbesserung.

Eine weiterführende innovative Option zur Behandlung von kardialen und kardiovaskulären Erkrankungen ist der Einsatz der Gentherapie. Gentherapie wird definiert als der Transfer von neuem genetischem Material in Zellen eines Patienten mit daraus resultierendem therapeutischem Benefit für denselben[105]. Eine weitere Quelle definiert Gentherapie als medizinische Intervention, um das genetische Programm von Zellen für therapeutische Zwecke zu nutzen[1]. Ziel einer kardialen Gentherapie ist es somit, durch den Transfer von Nukleinsäuren in Zellen des Herzens oder herznaher Strukturen die Expression des genetischen Materials so zu steuern, dass transient oder permanent kardial nützliche Effekte erzielt werden können.

I.2. ANSATZPUNKTE DER KARDIALEN GENTHERAPIE

Die Ansatzpunkte einer kardialen Gentherapie sind vielfältig: Zur Behandlung der Kardiomyopathie[26;85;99;101;135;136;139], der Reduktion des Ischaemie-

Reperfusionsschadens[45;69;70;81;88;129], zur Therapie einer Koronaren Herzerkrankung durch Induktion einer therapeutischen Arterio- und Angiogenese[2;3;41;93;104;122;143] an den Koronarien, zur Behandlung von Herzrhythusstörungen[32;118] oder im Bereich der Herzchirurgie zur Prophylaxe und Therapie von Transplantatabstoßungen[23;25;119], Transplantatvaskulopathien[64;65;74;132;137] und zur Prophylaxe der neointimalen Hyperplasie von venösen koronaren Bypassgefäßen[4;8;98] existieren tierexperimentelle gentherapeutische Studien, die einen Benefit propagieren.

Eine Verbesserung der Linksventrikulären Funktion zur Behandlung einer Kardiomyopathie kann beispielsweise durch die Transfektion von Sarkoplasmatischer-Retikulum-Calcium-ATPase (SERCA)[26] oder durch die adenoviral vermittelte gentherapeutische Überexpression von Beta(2)-Adrenergen Rezeptoren[85;135;136] im Kleintiermodell erreicht werden.

Der Ischaemie-Reperfusionsschaden konnte durch Transfektion von Fibroblast Growth Factor 5 (FGF-5)[45] reduziert werden, Heat Schock Protein 70 (hsp70) transfizierte Herzen zeigten eine raschere Erholung der postischaemischen Linksventrikulären Funktion mit erniedrigter Creatinkinase (CK) – Freisetzung[69] und nach Transfektion des Superoxiddismutase (SOD) - Gens zeigten Rattenherzen eine signifikant bessere Erholung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) und des koronaren Flusses[129].

Auch das arterio- und angiogenetische Potential der Wachstumsfaktoren Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2)[33;114;133;152], Hypoxia Inducible Factor 1α (HIF 1α)[27;71;150] und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)[17;21;37;42;108;109;152] konnte experimentell gezeigt werden und möglicherweise die Therapie der Koronaren Herzerkrankung revolutionieren.

Dennoch brachten mehrere optimistisch initiierte placebokontrollierte humane klinische Studien noch keine eindeutig positiven Ergebnisse[51;52;59-62;76;138;155]. Ursachen hierfür sind in den erheblichen Limitationen der kardialen Gentherapie zu suchen.

I.3. LIMITATIONEN DER KARDIALEN GENTHERAPIE

Da die Effektivität der Einschleusung von nackter DNA in die Zellen gering ist, werden Transportvehikel, sogenannte Vektoren, zur Effektivitätssteigerung benötigt[44]. Für die kardiale Gentherapie existieren mit Liposomen[65;100;140], Liposomen-Sendai-Virus-Kombinationen (Liposomen mit Hemagglutinating Virus of Japan, HVJ)[64;72;129;158], Rezeptoragonisten (v.a. Transferrinrezeptormediierter Gentransfer)[159], Adenoviren[10;18;30;31;40;85] und Retroviren[46;126;160;161] zahlreiche gut experimentell untersuchte Vektorsysteme. Ein idealer Vektor konnte jedoch noch nicht gefunden werden[101] – entweder ist die absolute Genexpression zu gering ausgeprägt, der Langzeiteffekt der Expression zu kurz, das Infektionspotential, bzw. die Immunogenität des viralen Vektors zu groß, oder es besteht ein nicht vertretbares Risiko einer insertionellen Mutagenese.

Auch das beste Applikationssystem für Vektoren am Herzen ist noch nicht gesichert[73;106]: Systemische intravenöse Injektionen, Injektionen über die Aortenwurzel, kathetergestützte intrakoronare Injektionen, die intraperikardiale Applikation oder die direkte intramyokardiale Gabe bleiben Gegenstand der Untersuchungen. Verfahrensabhängig war entweder die Transduktionseffizienz zu gering, die Verteilung der Expression des transgenen Produkts zu inhomogen oder die systemischen Nebeneffekte durch Dissemination des Vektors in den Kreislauf zu ausgeprägt.

Weiterhin bleibt limitierend festzustellen, dass die überwiegende Zahl der bisherigen Untersuchungen an Nagern und anderen Kleintieren durchgeführt wurden. Um ein klinikrelevantes Tiermodell zu erstellen, erscheinen jedoch Großtierversuche unumgänglich[29].

Somit sind als Prämissen für einen Erfolgsversprechenden klinischen Gentransfer folgende Bedingungen zu fordern:

Studien sollten am Großtiermodell durchgeführt werden[29]. Eine effiziente langzeitige Genexpression könnte von entscheidender Bedeutung für die Induktion einer suffizienten Gentherapie am Herzen sein[123]. Eine Voraussetzung für einen klinisch anwendbaren Gentransfer ist die kardioselektive Expression des therapeutischen Gens, welche systemische Nebenwirkungen minimiert. Ein selektiver myokardialer Gentransfer kann an verschiedenen Stufen ansetzen, beispielsweise durch ein spezifisches Applikationssystem, die Verwendung eines Vektors, der in der Lage ist, Myokard effizient zu transduzieren und ein transkriptionelles Targeting durch die Verwendung eines kardioselektiven Promotors. Es wird ein Applikationssystem benötigt, welches eine selektive und homogene Genverteilung in das Zielgebiet gewährleistet.

I.4. MYOKARDIALER GENTRANSFER ADENOASSOZIIERTER VIRALER VEKTOREN ÜBER DIE SELEKTIVE DRUCKKONTROLLIERTE RETROINFUSION

Die selektive druckkontrollierte Retroinfusion (SSRI) von kardialen Venen ist ein katheterbasiertes Applikationssystem, welches bewiesenermaßen für den Einsatz am Menschen sicher ist [9;117]. Es ermöglicht sowohl am ischaemischen, wie auch am nicht-ischaemischen Myokard einen effizienten Gentransfer, was anhand eines cDNA-Transfers von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Heat Shock Protein 90 (hsp90) in einem chronischen Ischaemie/Reperfusionsmodell am Schwein dargestellt wurde[81;82]. Die selektive druckregulierte Retroinfusion zeigte bei einem Adenoviralen Gentransfer ihre Überlegenheit gegenüber einer antegraden intrakoronaren Vektorapplikation[10]. Zudem erweist sich der Gentransfer mittels Retroinfusion als effizienter und zeigt ein deutlich homogeneres Verteilungsverhalten als intramyokardiale Injektionen auf perkutanem oder direktem chirurgischen Weg[120]. Neben einem effektiven regionalen Applikationssystem ist ein Vektor unabdingbar, der über eine anhaltende Expression seines Genproduktes einen suffizienten myokardialen Langzeit-Gentransfer ermöglicht. Auf dem Adenoassoziierten Virus (AAV) basierende virale Vektoren bieten in Kleintierversuchen die einzigartige Möglichkeit, ein persistierend hohes Expressionsniveau im Herzen aufrechtzuerhalten,

ohne Anzeichen einer Immun- oder Entzündungsreaktion aufzuweisen[19;149]. Neun verschiedene AAV Serotypen mit heterogenem Organtropismus wurden bis zum Beginn unserer Studie bezüglich ihrer myokardialen Transduktionsfähigkeit ausschließlich an Nagern untersucht und verglichen[47;63;107;110;112;142;162]. Allerdings existieren signifikante speziesabhängige Unterschiede in den Transduktionscharakteristika[22], so dass Versuche am Großtiermodell von entscheidender Notwendigkeit für die präklinische Evaluation von Adenoassoziierten Viralen Vektoren sind.

I.5. FRAGESTELLUNGEN

In dieser Studie sollte in einem kliniknahen Tierexperimentellen Modell untersucht werden, ob mit der selektiven druckregulierten Retroinfusion, als neuem Applikationsverfahren für Adenoassoziierte Virale Vektoren (AAV) am Herzen, ein effektiver myokardialer Langzeitgentransfer erzielt werden kann. Die Transduktionseffizienz von Heparinbindungsstellen-gelöschtem-AAV-Serotyp 2 und pseudotypisiertem AAV Serotyp 6, die beide nach systemischer Applikation Mäusemyokard effektiv transduzieren[47;107], sollte miteinander verglichen werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob durch die simultane Anwendung von rekombinantem humanen Vascular Endothelial Growth Factor (rhVEGF) während der Retroinfusionsbehandlung eine Steigerung der myokardialen Transduktionseffizienz erzielt werden kann. Für ein transkriptionelles Targeting verwendeten wir den Myosin leichte Kette (MLC) 2v-Promotor, fusioniert mit dem Cytomegalievirus (CMV) immediate early (IE-) Enhancer, welcher nach systemischer Vektorapplikation im Mäusemyokard eine prädominante Expression ermöglichte[107].

Somit lauten die konkreten Fragestellungen für die vorliegende Studie:

- Kann durch selektive druckregulierte Retroinfusion eines Adenoassoziierten Viralen Vektors eine effektive Transduktion des myokardialen Zielareals im kliniknahen Grosstiermodell erreicht werden?

- Welcher der untersuchten AAV Serotypen (Heparinbindungsstellen-gelöschter-Serotyp 2 oder pseudotypisierter Serotyp 6) zeigt die höhere Transduktionseffizienz im myokardialen Zielgebiet?

- Führt die Zunahme der vaskulären Permeabilität durch simultane Applikation von rekombinantem humanen Vascular Endothelial Growth Factor (rhVEGF) zu einer Steigerung der Transduktionseffizienz im Zielgewebe?

Die vorliegende Studie wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes genehmigt (Aktenzeichen 209.1/211-2531-15/05) und entsprechend der Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes von 1986 durchgeführt.

II.1. STUDIENPROTOKOLL

Der Gentransfer mittels Adenoassoziierter Viraler Vektoren (AAV) wurde an insgesamt 15 Versuchstieren der Rasse Deutsches Landschwein untersucht. Im Rahmen der Untersuchung wurden die Tiere in drei Gruppen (jeweils n=5) unterteilt, die am Versuchstag 0

a) AAV Serotyp 2 – Vektoren (Heparinbindungsstelle gelöscht),
b) AAV Serotyp 2 – Vektoren (Heparinbindungsstelle gelöscht)
+ Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), oder
c) AAV Serotyp 6 – Vektoren

mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion transduziert bekamen. An Versuchstag 28 wurden die Tiere euthanasiert und Gewebeproben entnommen. Daten zur Untersuchung der Effektivität des Gentransfers wurden histologisch, sowie mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Luciferaseprobe gewonnen und statistisch analysiert.

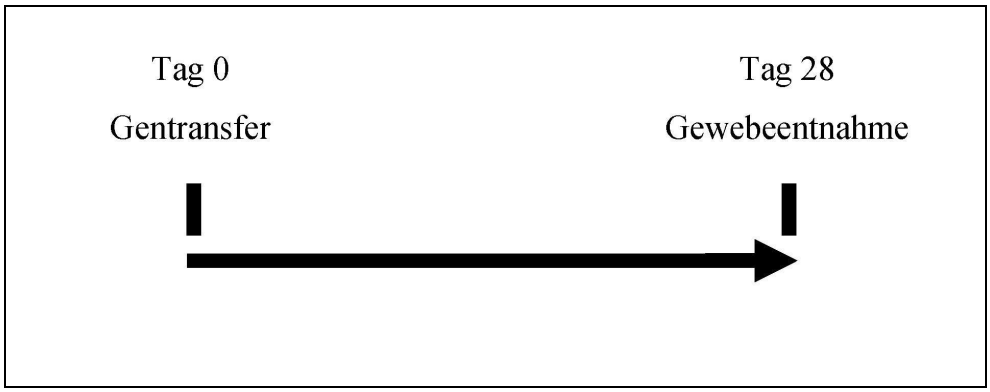

Abbildung 1: Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Versuchsprotokolls

II.2. GEWINNUNG VON ADENOASSOZIIERTEN VIRALEN VEKTOREN (AAV)

Die AAV – Vektoren wurden uns zur Verfügung gestellt von den Herren Robert Kreuzpointner, Hugo A. Katus und Oliver J. Müller von der Universitätsklinik Heidelberg.

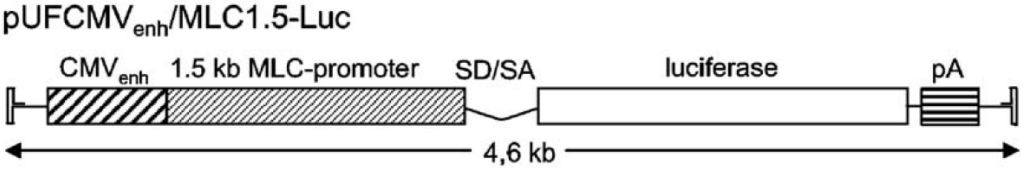

Abbildung 2: Rekombinantes AAV Vektor Plasmid
(aus Müller, „Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors" [107])

Die Produktion aller Vektoren für diese Studie erfolgte durch die Heidelberger Arbeitsgruppe unter Verwendung eines Zwei-Plasmid-Systems[49;75]. Das Genomenthaltende Plasmid mit einer Gesamtlänge von 4,6kB besteht aus einem Photinus Pyralis Luciferasereportergen unter der Kontrolle einer CMV-verstärkten Myosin leichte Kette 5`-Regulator Sequenz (CMV$_{enh}$-MLC1.5-Luc), verbunden mit einem Splice-Donor/Acceptor-Signal, beendet durch einen poly(A)-Schwanz und flankiert durch die AAV invertierten terminal repeats (ITRs) (siehe Abbildung 2)[107]. Zur

Produktion von Kapsiden ohne Bindungsaffinität an den primären Zelloberflächenrezeptor Heparan-Sulfat-Proteoglykan von AAV Serotyp 2 wurde der Helfervektor pDG(R484E; R585E) eingesetzt, der Mutationen zweier für das Heparinbindungsverhalten entscheidender Aminosäuren enthält[75]. Das Crosspackaging von AAV-6 pseudotypisierten Vektoren wurde mittels Helfervektor pDP6 vollendet[49]. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet und die Purifikation der Viren erfolgte durch Iodixanol Gradienten[58]. Die Gradientenfraktionen wurden durch Vivaspin Säulen (VIVASPIN Columns, Sartorius, Göttingen, Deutschland) konzentriert, wobei Iodixanol gegen PBS-Puffer ausgetauscht wurde. Die Anzahl der AAV Kapside und der effektive Replikationstiter wurden mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers A20, der selektiv an AAV-2 Kapside bindet, bestimmt[50].

II.3. VERSUCHSTAG 0: GENTRANSFER

Die Tiere wurden narkotisiert und nach einem chirurgischen Eingriff am seitlichen Halsdreieck wurden arterielle und venöse Gefäßzugänge geschaffen. Mittels Herzkathetergestützter Verfahren erfolgte die Virenapplikation durch selektive druckregulierte Retroinfusion. Nach erfolgter Transduktion wurden die OP-Wunden verschlossen und die Tiere über einen Aufwachraum zurück in den Stall befördert.

II.3.1. VORBEREITUNG, NARKOSE UND ÜBERWACHUNG

Zur Überprüfung der Narkotikaverträglichkeit wurden 52 Versuchstiere der Rasse Deutsches Landschwein einer Halothan-Vortestung unterzogen (Tierversuchsanstalt der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Unterschleißheim, Deutschland).

Das mittlere Körpergewicht der 15 Versuchstiere betrug 22±3 kg. Die Narkoseeinleitung erfolgte mittels intramuskulärer Bolusinjektion von 20 mg/kg KG

Ketamin (Ketamin 50 Curamed, CuraMED Pharma, Karlsruhe, Deutschland), 10 mg/kg KG Azaperone (Stresnil, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) und 0,5 mg Atropinsulfat (Atropinsulfat Braun, B. Braun, Melsungen, Deutschland). Nach Erreichen einer ausreichenden Analgosedierung wurde den Tieren ein intravenöser Zugang über eine Ohrvene gelegt und die Narkose mittels intravenöser Gabe von 15 mg Midazolam (Dormicum, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Schweiz) und 15 mg Piritramid (Dipidolor, Janssen, Neuss, Deutschland) vertieft. Die Tiere wurden endotracheal intubiert (Tracheal Tube, Mallinckrodt, Hazelwood, Missouri, USA) und zur Narkoseaufrechterhaltung mit Sauerstoff, Lachgas (Stickoxydul pro narcosi, Widmann Gase, Elchingen, Deutschland) und unter Zumischung von 0,5 – 2 Vol% Enflurane (Ethrane, Abbott, Illinois, USA) beatmet (Ventilog, Dräger, Lübeck, Deutschland). Die Beatmungsparameter wurden anhand regelmäßiger arterieller Blutgasanalysen (ABL 300, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) angepasst. Angestrebte Zielgrößen waren: p_aO_2 100-180 mmHg, p_aCO_2 35-45 mmHg und pH 7,3-7,5. Die Tiere wurden in waagerechter Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert. Die Überwachung der Vitalparameter erfolgte fortlaufend mittels EKG-Monitoring (Siemens Sirecust 341, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Deutschland), Pulsoxymetrie (Nellcor N550, Nellcor, Boulder, USA) und nach Einführung einer 7F Katheterschleuse (Cordis, Reading, Miami, USA) in die rechte, bzw. linke Arteria Carotis erfolgte eine kontinuierliche invasive Blutdruckmessung über einen Druckabnehmer (Stetham Transducer, Hellige-Monitor, Freiburg, Deutschland).

II.3.2. ARTERIELLE UND VENÖSE GEFÄßZUGÄNGE

Das laterale Halsdreieck wurde unter Narkose mit einem Longitudinalschnitt eröffnet und die Gefäßsituation dargestellt, sowie die Vagina Carotica freigelegt und eröffnet. Am Versuchstag 0 erfolgte die Einlage einer 7F Schleuse in die rechte A. Carotis (Cordis, Reading, Miami, USA) zur invasiven Blutdruckmessung und zur Durchführung einer Angiographie des Ramus interventricularis anterior (= Left anterior descending, LAD). In die rechte Vena jugularis externa wurde eine 11F Schleuse (Cordis, Reading, Miami, USA) eingeführt um einen Zugang für die selektive druckkontrollierte Retroinfusion zu schaffen. Nach erfolgtem Gentransfer wurden die Schleusen entfernt,

die Gefäße ligiert und das Operationsgebiet chirurgisch verschlossen. Die Versuchstiere zeigten trotz Ligatur der rechten A. carotis keine Zeichen zerebraler Ischämie. An Versuchstag 28 wurde die linke A. carotis zur Blutdruckmessung, sowie zur erneuten Angiographie des Ramus interventricularis anterior mit einer 7F Schleuse (Cordis, Reading, Miami) versehen.

II.3.3. KATHETERISIERUNG DES RAMUS INTERVENTRICULARIS ANTERIOR DER LINKEN KORONARARTERIE

Nach dem Einführen der Schleusen wurde eine Antikoagulation mit einem Bolus von 10.000 IE Heparin (Heparin, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) i.v. durchgeführt, gefolgt von einer kontinuierlichen intravenösen Applikation von 5.000 IE / Stunde. Ein 7F Judkins Rechts Führungskatheter (Cordis, Reading, Miami, USA) wurde über die arterielle Strombahn vor dem Koronarienostium plaziert, die linken Koronararterie mittels Kontrastmittelgabe (Solutrast, Byk-Gulden, Deutschland) aufgesucht und dargestellt. Unter Röntgendurchleuchtung wurde ein 0,014 Inch Führungsdraht (Road Runner Extra Support, Cook, Bjaeverskov, Dänemark) in den Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD) eingeführt. Über den mit der Spitze im distalen Teil der LAD liegenden Draht wurde ein abhängig vom Verlauf der LAD in der Regel 3,0 mm dicker und 20 mm langer PTCA-Ballon (AMG, Raesfeld-Erle, Deutschland) in der LAD gezielt distal des ersten Diagonalastes plaziert und zunächst noch nicht mittels In-/Deflator (Road Runner Extra Support, Cook, Bjaeverskov, Dänemark) inflatiert, so dass der arterielle Blutfluss über die LAD zunächst nicht unterbrochen wurde.

II.3.4. KATHETERISIERUNG DER ANTERIOREN INTERVENTRIKULÄREN VENE DURCH DEN SINUS CORONARIUS

Über die in der rechten Vena jugularis externa liegende 11F Schleuse (Cordis, Reading, Miami, USA) wurde zunächst ein 6F Cournand-Katheter (Cordis, Reading, Miami, USA) unter Röntgenkontrolle über den rechten Vorhof und den Sinus

coronarius in der Vena cordis magna vorgeschoben. Nun schob der Untersucher einen 0,018 Inch Führungsdraht (Road Runner Extra Support, Cook, Bjaeverskov, Dänemark) in die anteriore Herzvene (anterior interventricular vein, AIV), welche parallel zur LAD verläuft, vor. Der Führungskatheter wurde anschließend durch den 7,8F Retroinfusionskatheter (SSR-Katheter) (MPK 002, PTC Pro-Med Technology Consult GmbH, Mödling, Österreich) ersetzt. Der inflatierbare Ballon an der Spitze des SSR-Katheters wurde dabei stets in Höhe des in der LAD liegenden PTCA-Ballons positioniert.

II.3.5. VEKTORAPPLIKATION MITTELS SELEKTIVER DRUCKREGULIERTER RETROINFUSION

II.3.5.1. DAS PRINZIP DER SELEKTIVEN DRUCKREGULIERTEN RETROINFUSION

Entwickelt wurde die selektive druckregulierte Retroinfusion um akute Ischämieschäden im Rahmen einer Hochrisiko-PTCA zu verhindern, indem das infolge der Koronararterienstenose ischämische Myokard für die Dauer des Eingriffs retrograd gezielt mit arteriellem Blut über die Koronarvene versorgt werden kann[9]. Somit erfordert das Funktionsprinzip zum einen die Möglichkeit der Absaugung von arteriellem Blut aus einer Arterie, zum anderen die kontrollierte Abgabe des Blutes in das koronarvenöse System unter Überwachung des auftretenden hohen Druckes in der Koronarvene. Aufgebaut ist das System aus einem kleinen Extrakorporalkreislauf, dem SSR-Katheter (MPK 002, PTC Pro-Med Technology Consult GmbH, Mödling, Österreich) und einer Absaugeinheit. Weitere Bestandteile des Gerätes sind eine Rollerpumpe, ein Hochdruckreservoir, ein Exzenter-Ventil mit einer Schrittmotorsteuerung, ein Druckaufnehmer für die Überwachung des auftretenden hohen Druckes in der anterioren Herzvene und einer anhand des Koronarvenendruckes automatisch regulierten Volumenabgabe (Fuzzy-Logic) mittels einer Ballonpumpe. Zusätzlich verfügt das Gerät über eine EKG-Triggerung und eine Absaugeinheit (siehe Abbildung). Das sauerstoffreiche Blut wird dem System über die Rollerpumpe aus einer in einer Arterie liegenden Schleuse zugeführt. Die Rollerpumpe wird über den frei wählbaren Druck im Hochdruckreservoir gesteuert.

Aus dem Hochdruckreservoir wird das arterielle Blut über den SSR-Katheter in die anteriore Herzvene (AIV) abgegeben. Hierdurch wird der Blutfluss im koronarvenösen System umgekehrt und das Herz retrograd mit arteriellem Blut versorgt. Das System enthält aus Sicherheitsgründen eine Druckregulierung (gemessen wird der Druck in der AIV), die den Blutfluss in die anteriore Herzvene (AIV) mit Hilfe der Exzenterklappe steuert, um zu hohe, und damit schädliche Spitzendrücke in den Koronarvenen zu vermeiden. Die Messung des Flusses im patientenzuführenden Teil des Systems erfolgt mit einer Transsonic Flow-Probe (Transonic© Flowprobe, Transonic Systems, Ithaca, USA), die vor der Exzenterklappe an der Retroinfusionsleitung montiert ist.

Die Steuerung des Systems erfolgt über ein an der Körperoberfläche abgeleitetes EKG-Signal. Das System lässt sich EKG-getriggert betreiben, wobei das Verhältnis von SSR-Pumpaktion zu Systole von 1:1 bis 1:8 wählbar ist. Auch die Latenzzeit zwischen R-Zacke und SSR-Pumpaktion ist frei wählbar, was die Möglichkeit bietet, die Retroinfusion auf die Dauer der Diastole zu beschränken.

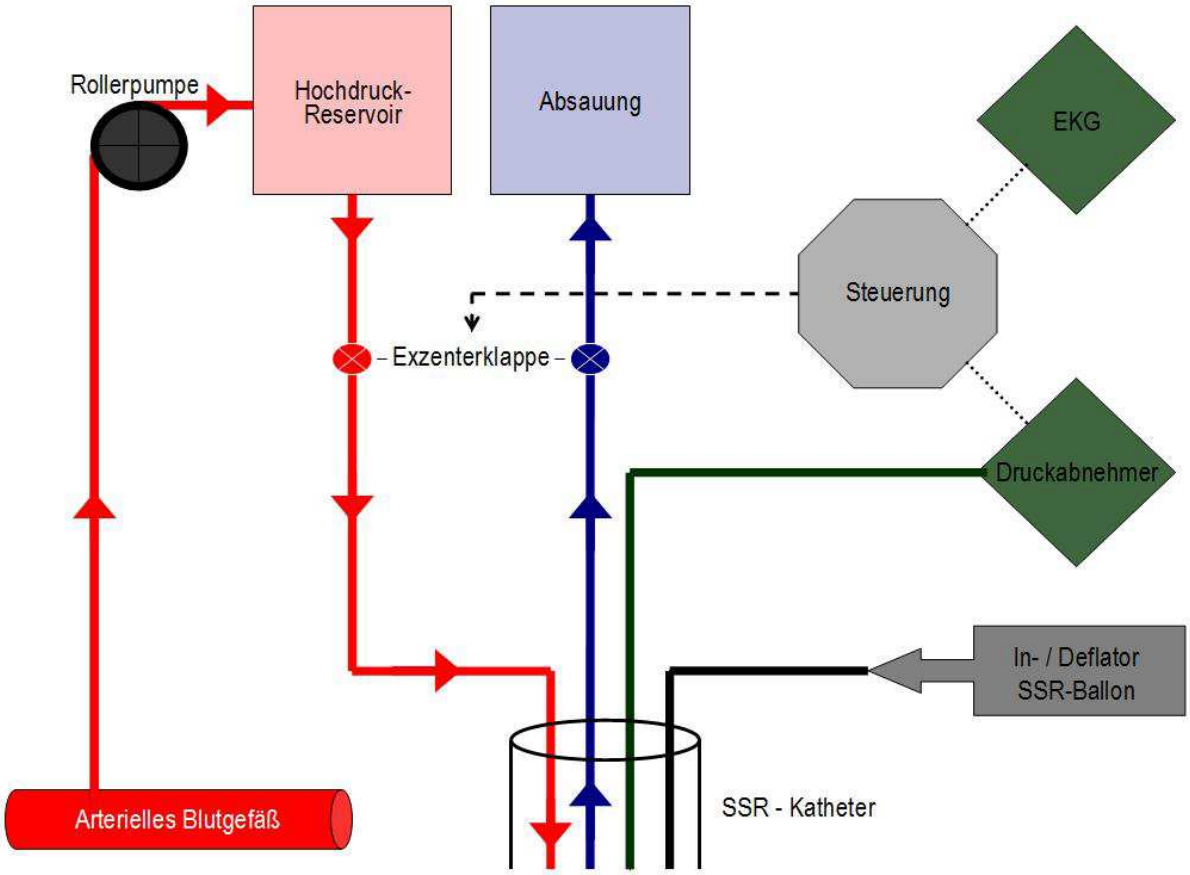

Abbildung 3: Schematischer Aufbau der selektiven druckregulierten Retroinfusion

II.3.5.2. RETROGRADE APPLIKATION DER ADENOASSOZIIERTEN VIRALEN VEKTOREN IN DIE KORONARVENE

In der vorliegenden Studie wurde auf das Prinzip der selektiven druckregulierten Retroinfusion zurückgegriffen. Für die Applikation der Viralen Vektoren wurde die Funktionsweise der Retroinfusion leicht modifiziert (siehe Abbildung 4):
Es erfolgte keine Absaugung von arteriellem Blut aus einer (peripheren) Arterie, somit auch keine retrograde Applikation von sauerstoffreichem Blut in die Koronarvene. Das Hochdruckreservoir wurde mit auf 37°C erwärmter Natriumchloridlösung 0,9% (Braun, Melsungen, Deutschland) gefüllt, und ein Vordruck von 2500mbar gewählt. Die Absaugeinheit des Systems wurde deaktiviert. Drei der vier Lumina des in der anterioren Herzvene (AIV) liegenden SSR-Katheters wurden an das Retroinfusionssystem angeschlossen: Zum einen das Lumen zur Inflation des Ballons an der SSR-Katheter-Spitze, ferner die über einen Drei-Wege-Hahn (Discofix, Braun, Melsungen, Deutschland) führende Verbindung zwischen Katheter und Hochdruckreservoir und das Lumen des Druckabnehmers, um die Überwachung des AIV-Druckes zu gewährleisten. Das üblicherweise mit der Absaugeinheit zu verbindende Lumen des SSR-Katheters blieb in der aktuellen Untersuchung verschlossen. Die zu applizierenden Adenoassoziierten Viralen Vektoren ($3,5 \times 10^{10}$) wurden in 20ml Natriumchloridlösung 0,9% (Braun, Melsungen, Deutschland) verdünnt, in einen Perfusor (Braun Secura Perfusor F, Braun, Melsungen, Deutschland) eingespannt und der Perfusor über den Drei-Wege-Hahn zwischen Hochdruckreservoir des Systems und Lumen des SSR-Katheters zwischengeschaltet (siehe Abbildung).

In Versuchsgruppe 2 erfolgte die zusätzliche Gabe von 100µg Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) über einen zweiten Perfusor (Braun Secura Perfusor F, Braun, Melsungen, Deutschland), der über einen Drei-Wege-Hahn neben dem Perfusor mit den viralen Vektoren und zwischen Hochdruckreservoir des Retroinfusionssystems und Lumen des SSR-Katheters zwischengeschaltet wurde (siehe Abbildung). Die 100µg VEGF wurden analog zu den viralen Vektoren ebenfalls in 20ml Natriumchloridlösung 0,9% (Braun, Melsungen, Deutschland) verdünnt.

Vor der Gabe der Vektoren wurde zunächst der Retroinfusionsdruck auf 20mmHg oberhalb des systolischen Venenverschlußdruckes (VVD) in der anterioren Herzvene (AIV) eingestellt. Zur VVD-Bestimmung wurde der Ballon des SSR-Katheters inflatiert, somit die AIV bei noch bestehendem Zufluss über das arterielle System okkludiert, und der resultierende AIV-Druck über den Druckabnehmer gemessen. Der eingestellte Druck von 20mmHg oberhalb des systolischen Venenverschlußdruckes gewährleistet optimale Retroinfusionsbedingungen[9]. Nach Gabe von Röntgenkontrastmittel (Solutrast, Byk-Gulden, Deutschland) über das SSR-Katheterlumen wurde bei geblocktem SSR-Ballon die koronarvenöse Stauung und das Ausbreitungsgebiet des Kontrastmittels als Angiographievideosequenz (Exposcop 8000, Ziehm Imaging, Nürnberg, Deutschland) gespeichert. Die EKG-Triggerung wurde auf ein Intervall von 1:4 bei einer Latenz von 10ms auf die R-Zacke eingestellt, woraus eine weitgehend intradiastolische SSR-Pumpaktion resultiert.

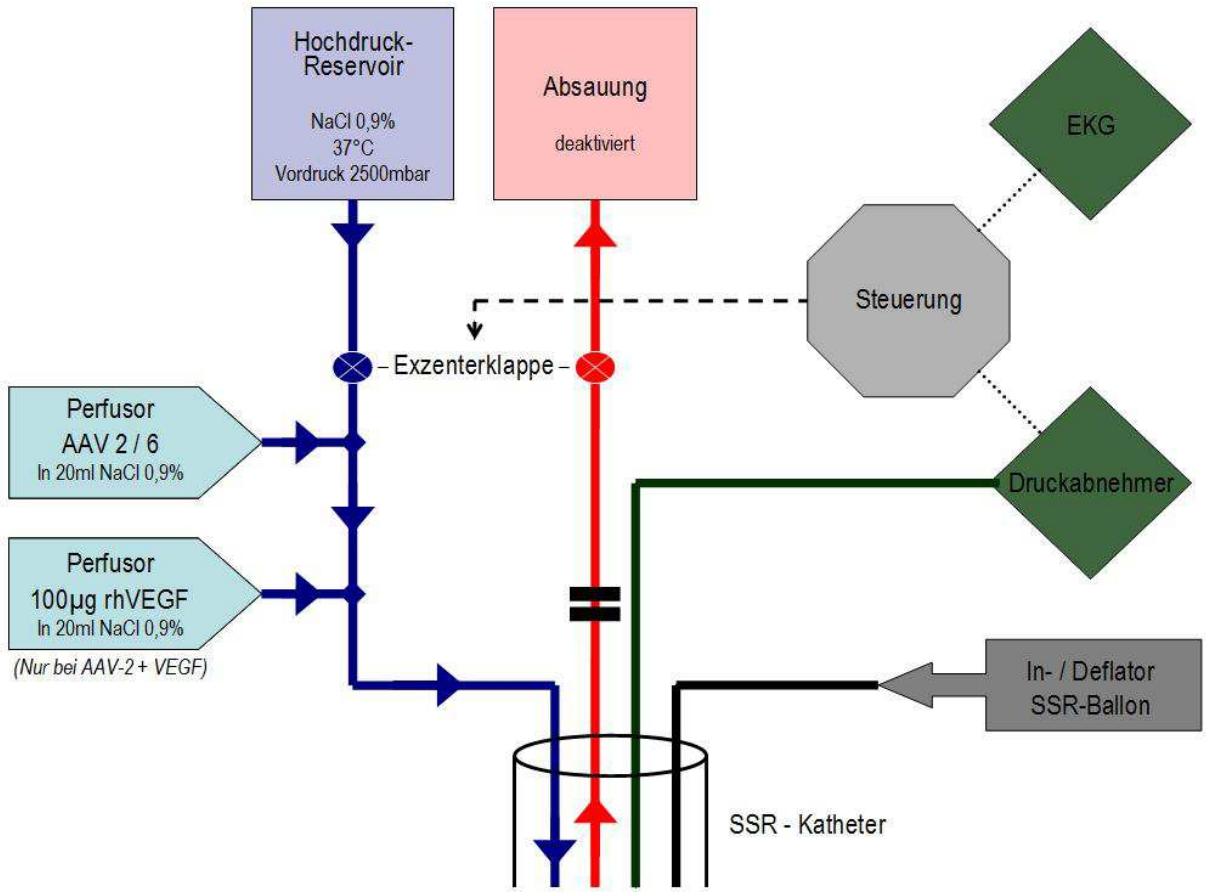

Abbildung 4: Versuchsaufbau der selektiven druckregulierten Retroinfusion zum myokardialen Gentransfer mittels Adenoassoziierter Viraler Vektoren

Zu Beginn der Transduktion wurden der SSR-Ballon mit einem Druck von 150mmHg und der PTCA-Ballon in der LAD mit einem Druck von 2-3atm inflatiert. Retroinfusionsgerät und der Perfusor mit den viralen Vektoren (in Versuchsgruppe 2 auch der Perfusor mit VEGF) wurden gestartet. Die Infusion erfolgte in zwei Zyklen à 10 Minuten. Nach den ersten 10 Minuten wurde die Retroinfusion für 5 Minuten unterbrochen, Retroinfusionsgerät und Perfusor(en) pausiert und sowohl PTCA- als auch SSR-Ballon deflatiert, um ischämiebedingte Myokardschäden zu vermeiden. Nach Ablauf der fünfminütigen Pause wurden erneut in beschriebener Weise PTCA- und SSR-Ballon inflatiert und die Retroinfusion fortgesetzt, die Pause von SSR-Gerät und Perfusor(en) beendet. Während der gesamten Transduktion wurden der auftretende Druck in der anterioren Herzvene (AIV), der maximale Retroinfusatfluss und die Vitalparameter des Versuchstieres überwacht.

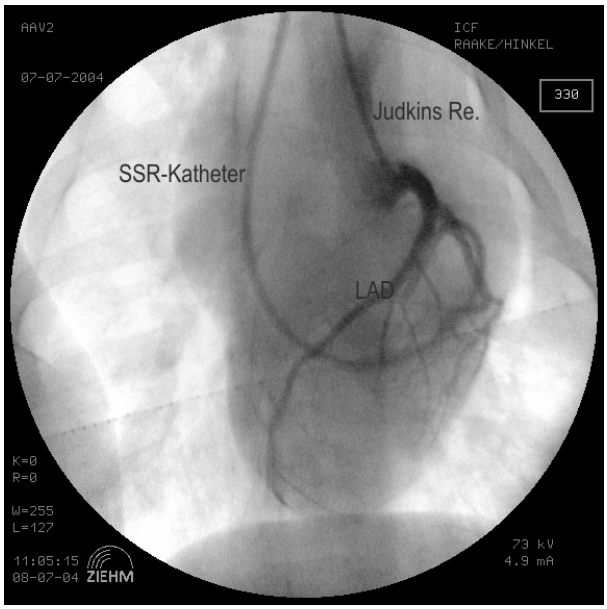

Abbildung 5.1:
Durchgängigkeitsprüfung der LAD

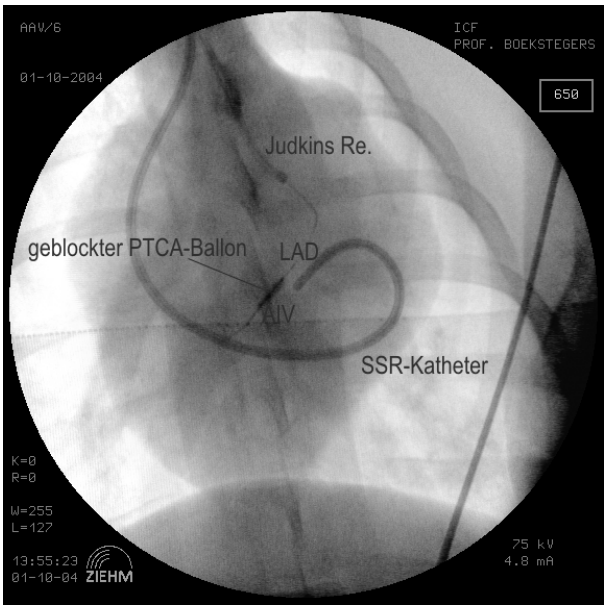

Abbildung 5.2:
Ausgangssituation unmittelbar vor Beginn der Retroinfusion

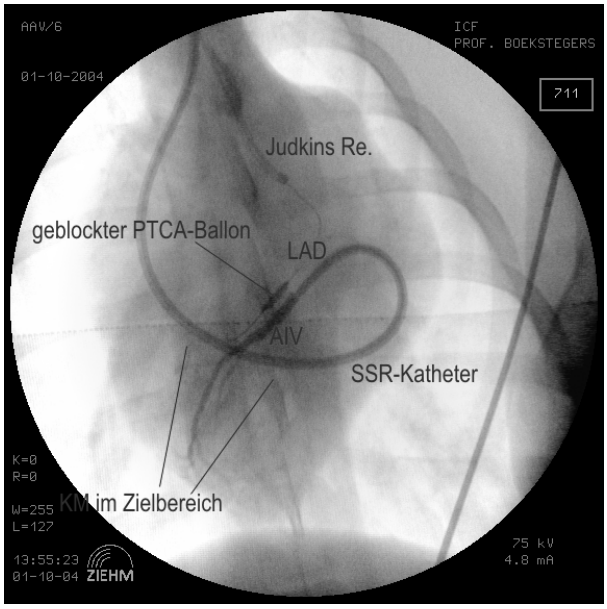

Abbildung 5.3:
Situation eine Sekunde nach Beginn der Retroinfusion; Das Kontrastmittel (KM) zeigt die Verteilung des Retroinfusats im Zielbereich

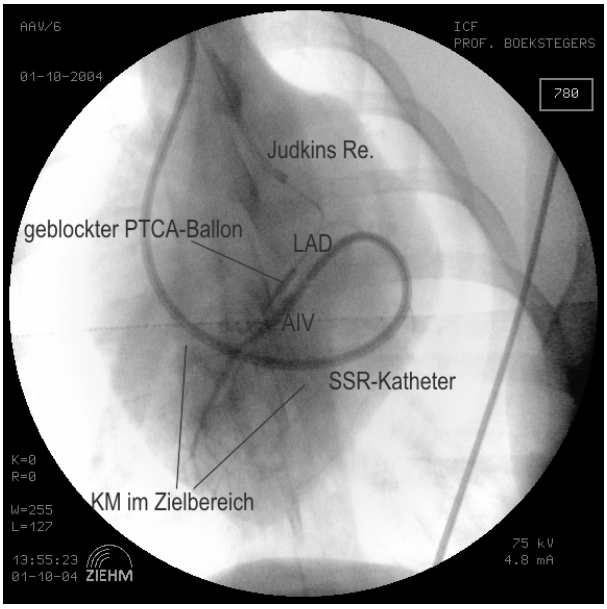

Abbildung 5.4:
Situation 12 Sekunden nach Abbildung 5.3; Das Kontrastmittel (KM) befindet sich immer noch im Zielbereich. Dies verdeutlicht die lange Kontaktzeit des Retroinfusats

Mit Beendigung des zweiten Retroinfusionszyklus waren die gesamten zu transduzierenden Adenoassoziierten Viralen Vektoren (3,5 x 10^{10}) und in

Versuchsgruppe 2 die 100µg Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) vollständig infundiert. Retroinfusionsgerät und Perfusoren wurden abgeschaltet, PTCA- und SSR-Ballon deflatiert und alle Katheter und Führungsdrähte zurückgezogen und entfernt.

II.3.6. NARKOSEAUSLEITUNG UND POSTOPERATIVE ÜBERWACHUNG

Arterielle und venöse Schleuse in der A. carotis und V. jugularis externa wurden gezogen und die Gefäße ligiert. Nach Ausschluss einer noch bestehenden Blutungsquelle im Operationsgebiet wurde das laterale Halsdreieck mit subkutanen und kutanen Nähten verschlossen und ein Verband angelegt. Die Narkose wurde unter Beatmung mit reinem Sauerstoff ausgeleitet. Bei ausreichender Spontanatmung und Wiederkehr der Schutzreflexe wurden die Tiere extubiert, der peripher-venöse Zugang in der Ohrvene wurde entfernt, die Wunde verbunden und die Tiere über einen Aufwachraum in den Stall zurückverlegt. Alle Versuchstiere erhielten eine perioperative Antibiose mit 1500mg Cefuroxim i.v. (Cefuroxim Sandoz parenteral, Sandoz pharmaceuticals, Holzkirchen, Deutschland).

II.4. GEWEBEGEWINNUNG

An Versuchstag 28 wurden die Tiere erneut narkotisiert, über einen arteriellen Gefäßzugang wurde der Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD) dargestellt, die Versuchstiere wurden euthanasiert, das Herz entnommen und in verschiedene Schichten geschnitten, sowie periphere Gewebe entnommen.

II.4.1. VORBEREITUNG, NARKOSE UND ÜBERWACHUNG

Narkoseeinleitung, Aufrechterhaltung, Beatmung und Überwachung fanden analog zum Versuchstag 0 statt.

II.4.2. GEFÄßZUGÄNGE

Das linke laterale Halsdreieck wurde unter Narkose mit einem Longitudinalschnitt eröffnet, die linke A. Carotis dargestellt und eine 7F Schleuse (Cordis, Reading, Miami, USA) zur invasiven Blutdruckmessung und zur Durchführung einer Angiographie des Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD) eingeführt.

II.4.3. KATHETERISIERUNG DES RAMUS INTERVENTRICULARIS ANTERIOR DER LINKEN KORONARARTERIE

Nach dem Einführen der arteriellen Schleuse wurde die Antikoagulation und die Darstellung des Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD) der linken Koronararterie analog zu Versuchstag 0 durchgeführt. Die LAD Darstellung diente lediglich der Durchgängigkeitsprüfung des Gefäßes, es wurde kein Führungsdraht eingelegt. Die mit Röntgenkontrastmittel durchgeführte Angiographievideosequenz (Exposcop 8000, Ziehm Imaging, Nürnberg, Deutschland) wurde archiviert.

II.4.4. HERZEXPLANTATION, EUTHANASIE

Zur Herzexplantation wurde eine mediane Thorakotomie angewendet. Zunächst wurde ein medianer Longitudinalschnitt der Haut von der Incisura jugularis bis ca. 3cm unterhalb des Processus xiphoideus durchgeführt. Subkutanes Fettgewebe und thorakale Muskulatur wurden mittels Elektrokauter durchtrennt. Das Sternum wurde mit einer kräftigen Schere beginnend vom Processus xiphoideus durch eine mediane Längssternotomie gespalten, mit Hilfe eines Thoraxspreizers wurden die Hälften voneinander getrennt und das Perikard eröffnet. Unter tiefer Narkose wurde durch intrakardiale Injektion einer letalen Kaliumdosis (Kaliumchlorid, Deltaselect, Dreieich, Deutschland) eine Asystolie induziert und das Herz abschließend entnommen. Des

Weiteren wurden Gewebeproben von Lunge, thorakaler Aorta, Leber, Milz, Niere, Duodenum und Interkostalmuskulatur entnommen.

II.4.5. UNTERTEILUNG DES EXPLANTIERTEN HERZENS IN MEHRERE GEWEBEPROBEN

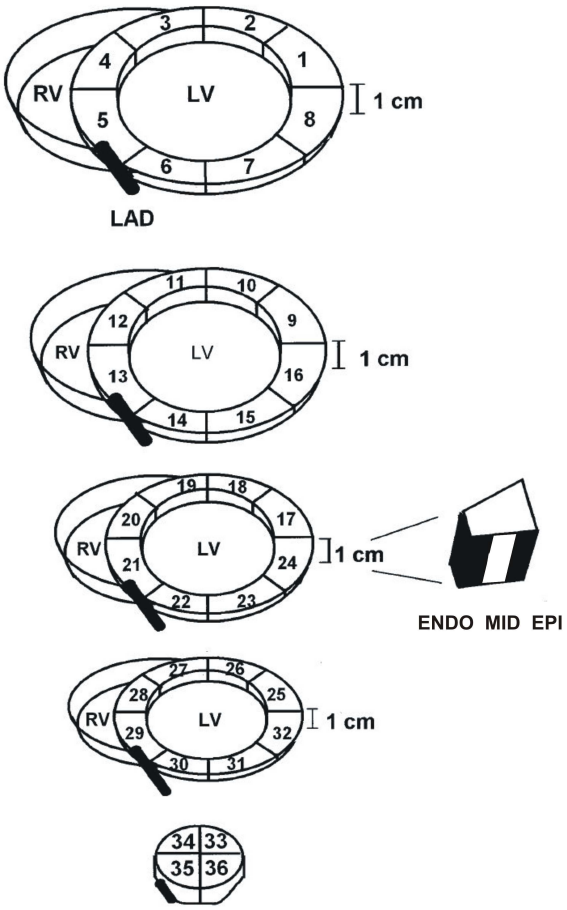

Abbildung 6:
Schneiden des Herzens in 108 definierte Segmente (aus Raake, „Myocardial gene transfer by selective pressure regulated retroinfusion of coronary veins"[120])

Unmittelbar nach Herzexplantation wurde der linke Ventrikel nach einem definierten Protokoll[120] in insgesamt 108 Einzelproben verschnitten (siehe Abbildung 6): Zunächst wurde das Herz senkrecht zur kürzesten Verbindung zwischen Apex und Basis in fünf Schichten von jeweils 1cm Dicke geschnitten. Jede Schicht wurde in mehrere Segmente gleicher Größe unterteilt. Alle Schichten wurden hierbei in 8 Segmente von etwa 45 Winkelgrad unterteilt, mit Ausnahme der distalen Apexschicht, die aufgrund ihrer geringeren Größe nur in 4 Segmente à 90 Winkelgrad gegliedert wurde. Die Nummerierung der Segmente erfolgte nach einem logischen System: Die erste basisnahe Schicht enthält die Segmente 1 bis 8, wobei unter Aufsicht auf die Schnittfläche Segment Nr. 1 bei 0 Winkelgrad (3 Uhr) beginnt und die Nummerierung entgegen des Uhrzeigersinns

erfolgt. Der Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD) kommt bei ca. 225 Winkelgrad zu liegen und markiert somit im Bereich der ersten basisnahen Schicht den Übergang von Segment 5 zu Segment 6. Analog enthält die zweite Schicht die Segmente 9 bis 16, die dritte Schicht die Segmente 17 bis 24 und die vierte Schicht die Segmente 25 bis 32. Die fünfte, am weitesten distal gelegene Schicht an der Apex enthält nur die vier Segmente 33 bis 36, wobei Segment 33 bei 0 Winkelgrad (3 Uhr) beginnt und hier die Nummerierung in Segmente von je 90 Winkelgrad ebenfalls entgegen des Uhrzeigersinns erfolgt. Jedes der 36 Segmente wurde nun in eine epikardiale (EPI), eine midmyokardiale (MID) und eine subendokardiale (ENDO) Probe geschnitten, so dass insgesamt 108 in ihrer Position klar definierte Gewebeproben des linken Ventrikels gewonnen werden konnten[120].

II.4.6. ENTNAHME PERIPHERER GEWEBEPROBEN

Neben den kardialen Gewebeproben wurden ca. 1cm^3 große Gewebeproben aus Lunge, thorakaler Aorta, Leber, Milz, Niere, Duodenum und Interkostalmuskulatur entnommen.

II.4.7. LAGERUNG DER GEWEBEPROBEN

Alle kardialen und peripheren Gewebeproben wurden sofort nach dem Schneiden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in beschrifteten Behältern bis zur endgültigen Weiterverarbeitung zur Datenauswertung bei -80°C gelagert.

II.5. DATENGEWINNUNG

II.5.1. HISTOLOGIE

Zur Histologischen Aufarbeitung erfolgte eine HE-Färbung der Gewebeproben aus dem Bereich des Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD). Nach Entnahme der Proben aus dem -80°C Kühlschrank wurden diese mittels Kryostat (Leica CM3050, Leica, Bensheim, Deutschland) auf eine Dicke von 5µm geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und über 20 Minuten bei 60°C im Brutschrank getrocknet. Die anschließende Färbung erfolgte zunächst für 2 Minuten in Hämalaun-Lösung (Mayer`s Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt, Deutschland). Nach fünfminütigem Bläuen in klarem Leitungswasser wurden die Schnitte für weitere 10 Minuten in Eosin 0,5% (Eosin G-Lösung 0,5%, Merck, Darmstadt, Deutschland) eingelegt. Die Präparate wurden im Anschluss kurz in destilliertes Wasser getunkt, gefolgt von der aufsteigenden Alkoholreihe: dreimaliges kurzes Eintauchen in Ethanol 70%, dann fünfminütiges Baden in Ethanol 80%, gefolgt von einem 10minütigen Bad in absolutem Ethanol. Nach fünfzehnminütiger Einwirkzeit eines Lösungsmittels (Roticlear, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Schnitte mit Hilfe des Roti-Histokitts (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingeschlossen. Die Betrachtung erfolgte bei 20facher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

II.5.2. POLYMERASEKETTENREAKTION

Es erfolgte eine Polymerasekettenreaktion zur Detektion von Vektor-DNA aus myokardialen Gewebeproben aus dem Zielbereich des Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD), dem Kontrollbereich des Ramus circumflexus (RCX) und aus ausgewählten systemischen Organen (thorakale Aorta, Lunge, Leber, Interkostalmuskulatur).

Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland): Zunächst wurden die Gewebeproben aus dem -80°C Kühlschrank entnommen, in Hammer- und Meißeltechnik mehrere Fragmente von einem Gesamtgewicht von bis zu 25mg abgespalten und über eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut. Im Anschluss wurden die Fragmente mit 180µl ATL-Puffer (aus DNeasy Tissue Kit) in einem 1,5ml Mikrozentrifugencup vermischt, es wurden 20µl Proteinase K (aus DNeasy Tissue Kit) zupipettiert, die Lösung mittels Vortex (Fisher Vortex Genie 2, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gemischt und über Nacht für mindestens 12 Stunden im 55°C Schüttelwasserbad (SW21, Julabo, Schilbach, Deutschland) lysiert. Während aller folgenden Arbeitsschritte wurde die Lösung nach Zugabe einer Substanz durch 15sekündiges Vortexen vermischt: Durch Injektion von 4µl RNAse A (aus DNeasy Tissue Kit) und zweiminütger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der insbesondere in Leber und Niere hohe RNA-Gehalt eliminiert. Nach der Zugabe von 200µl AL-Puffer (aus DNeasy Tissue Kit) und einer 10minütigen Inkubation im 70°C Wasserbad wurden 200µl absoluten Ethanols addiert. Diese Lösung wurde in die DNeasy Mini Spin Column (aus DNeasy Tissue Kit) eingesetzt, bei 8000rpm für eine Minute zentrifugiert (Zentrifuge Eppendorf 5414C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und der Durchfluss verworfen. Nach Zusatz von 500µl AW1-Puffer (aus DNeasy Tissue Kit) wurde dieser Vorgang wiederholt. Nach dem Zupipettieren von 500µl AW2-Puffer (aus DNeasy Tissue Kit) erfolgte der Arbeitsschritt erneut, diesmal mit dreiminütiger Zentrifugation bei 14000rpm. Abschließend wurde die DNA durch direktes pipettieren von 100µl AE-Puffer (aus DNeasy Tissue Kit) auf die Membran des DNeasy Mini Spin Columns, einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und einminütiger Zentrifugation bei 8000rpm eluiert. Dieser Eluierungsschritt wurde zweimal pro Gewebeprobe durchgeführt.

800ng genomische DNA wurden zur PCR-Amplifikation (40 Zyklen) eines 677bp Fragments des Luciferasegens mit den Primern 5`-GACGCCAAAAACATAAAGAAAG-3` und 5`-CCAAAAATAGGATCTCTGGC-3` verwendet. Zur Durchführung der PCR wurden jeweils 800ng der eluierten DNA einem PCR-Reaktionsansatz von je 25µl (bestehend aus 2,5µl Taq-Puffer, 2,5µl Desoxynukleotide (dNTP, 2mM), je 0,5µl der o.g. Primer, 0,1µl Taq-Polymerase, 2,0µl $MgCl_2$ (2,0mM) und 16,9µl deionisiertes H_2O) zugegeben. Der so erhaltene PCR-Reaktionsansatz wurde unter Verwendung eines Thermocyclers (Mastercycler Pro, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zur

Vervielfältigung der Vektor-DNA in 40 Zyklen bearbeitet. Jeder Zyklus bestand aus: Denaturierung des DNA-Doppelstrangs über 30 Sekunden bei 94°C, Primerannealing über 30 Sekunden bei 60°C und DNA-Elongation über 30 Sekunden bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese (1,5%; w/v, Agarosegel Elektrophorese Kammern, Biorad, München, Deutschland) analysiert: Hierzu wurden 40ml Agarose 1,5% (Gibco BRL, Paisley, Scotland) aufgekocht und nach Abkühlung auf 60°C bei Raumtemperatur 4µl Ethidiumbromid (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) dazugegeben. Nach Entfernung des Kammes wurde das gefestigte Gel in TBE-Puffer (89mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS), 89mM Borat und 2mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ad 1000ml Aqua dest; ph 8,0) gelegt, und 20µl der DNA-Probe, und die DNA-Leiter (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aufgetragen. Bei einer angelegten Spannung von 100V wurden nach einer dreißigminütigen Elektrophoresedauer die Laufweiten auf dem UV-Leuchttisch ausgewertet.

II.5.3. LUCIFERASEPROBE

Die Gewebeproben wurden aus dem -80°C Kühlschrank entnommen und während aller folgenden Arbeitsschritte intermittierend in flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Als erster Schritt erfolgte die Fragmentierung der Gewebeproben. Hierzu wurden in Hammer- und Meißeltechnik Gewebefragmente mit einem Sollgewicht zwischen 100 und 300mg abgesplittert, gewogen, in einem beschrifteten Cup verschlossen und umgehend wieder bei -80°C gelagert. Das Restgewebe wurde für etwaige Nachmessungen ebenfalls in den Tiefkühlschrank zurückgestellt. Im zweiten Schritt wurde das Gewebe lysiert: Die aus dem Kühlschrank entnommene und in flüssigem Stickstoff zwischengelagerte Probe wurde in ein sich in Trockeneis befindliches Tube gesetzt und eine gewichtsadaptierte Menge an Puffer- / Lyselösung (Zusammensetzung: 25mmol/l Trisphosphat (pH7,8), 2mmol/l Dithiothreitol (DTT), 2mmol/l Ethylendiamintetraacetat (EDTA), 10% Glycerol und 1% Octoxynol-9 (Triton X-100)) hinzu pipettiert (Volumen der Puffer- / Lyselösung [µl] = Feuchtgewicht der Gewebeprobe [mg] * 4). Nach einer Einwirkzeit von ca. 30 Sekunden wurde der Tubeinhalt durch ein Ultramesser-Dispergiergerät (Ultra-Turrax® T 65 D, IKA Werke

GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) zerstampft, mit einer Saugpipette in ein Eppendorfcup gegeben und in flüssigen Stickstoff getaucht. Zur Weiterverarbeitung wurde die Probe für drei Minuten im 37°C Wasserbad inkubiert und bei 14000rpm und +4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, aus welchem die Luciferaseprobe gemessen wird, wurde in zwei Eppendorfcups abpipettiert und dabei quantitativ erfasst. 10µl des Überstandes wurden in ein weiteres Eppendorfcup zur Proteinbestimmung gegeben. Die Cups wurden über ein Bad in flüssigem Stickstoff bis zur Messung der Luciferaseaktivität im -80°C Kühlschrank aufbewahrt.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford: Hierzu wurde zunächst der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie®-Brilliant-Blau G-250 (CBBG, Roti®-Quant, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) im Verhältnis von 1:4 mit Aqua dest. verdünnt und durch Cellulosepapier (Whatman® #1 Grad 540, Whatman International Ltd, Kent, England) gefiltert. Anschließend wurden einem Milliliter der gefilterten Farbstofflösung 5µl des Überstandes zur Proteinbestimmung zugegeben, die Probe bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert und die Absorption im Photometer (BioPhotometer plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 595nm abgelesen. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Vergleich mit der Standardkurve (Bovines Serum Albumin (BSA) von 0,625mg/ml bis 10mg/ml bei 595nm) abgelesen.

Die Ermittlung der Luciferaseaktivität jeder Gewebeprobe erfolgte durch Mittelwertbestimmung aus je zwei Messungen. Hierzu wurde die Lichtproduktion von 20µl des Überstandes durch einem Transilluminator (Lumat LB 9501, Berthold, Wildbad, Deutschland) mit 100µl Reaktionsansatz (bestehend aus 20mmol/l N-(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycine (Tricin, pH 7,8), 1,07mmol/l $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2$ x $5H_2O$, 2,67 mmol/l $MgSO_4$, 0,1mmol/l Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 33,3mmol/l Dithiothreitol (DTT), 270µmol/l Coenzym A, 470µmol/l D-Luciferin und 530µmol/l Adenosintriphosphat (ATP)) über 30 Sekunden gemessen. Von den bestimmten Relativen Lichteinheiten (relative light units, RLU) / ml wurden die Hintergrundwerte durch Messung der Cups, gefüllt mit phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS bestehend aus 8,0g/l NaCl, 0,2g/l KCl, 1,44g/l Na_2HPO_4, 0.24g/l KH_2PO_4), welche äquivalent zum Hintergrundwert des Lysereagenzes ist[10], subtrahiert. Abschließend wurde die Angabe der Luciferase Aktivität von RLU / ml aus

dem Lysereagenz mit Hilfe der Proteinkonzentrationsbestimmungen der Proben in RLU/mg Protein umgerechnet.

II.6. STATISTISCHE DATENANALYSE

Die Daten wurden mit Microsoft Office Excel 2003 Professional (Microsoft Corporation, Seattle, USA) und SPSS (SPSS 11.0.1., SPSS Incorporated, Chicago, USA) analysiert. Alle Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Messungen der Luciferaseexpression wurden durch den verteilungsfreien (nicht-parametrischen) Kruskal-Wallis-Test analysiert. Bei Erreichen eines signifikanten Effekts wurden mittels Mann-Whitney U-Test (Mann-Whitney-Wilcoxon-Test) zahlreiche Vergleichtests zwischen den Versuchsgruppen durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

15 Tiere der Rasse Deutsches Landschwein wurden in drei Versuchsgruppen unterteilt (n=5) und mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion einem kardialen Gentransfer unterzogen. Transduziert wurden Adenoassoziierte Virale Vektoren ($3{,}5x10^{10}$ virale Genome pro Tier) verschiedenen Serotyps mit Photinus Pyralis Luciferase als Reportergen unter der Kontrolle eines kardiospezifischen CMV-MLC2v - Promotors. Verglichen wurde die Transduktionseffizienz im kardialen Zielgebiet von Heparinbindungsstellen-gelöschtem AAV Serotyp 2 mit pseudotypisiertem AAV Serotyp 6. Ferner wurde untersucht, ob die Gabe von rekombinantem humanen Vascular Endothelial Growth Factor (rhVEGF) die Transduktionseffizienz von AAV Serotyp 2 steigern kann.

Der Gentransfer erfolgte an Versuchstag 0, die Probengewinnung und Analyse der Transduktionseffizienz an Versuchstag 28.

III.1. AUSGANGSSITUATION

Die Ausgangssituation war sowohl an Versuchstag 0, als auch an Versuchstag 28 in Hinblick auf Körpergewicht, Hämodynamik und Durchgängigkeit des Ramus interventricularis anterior (LAD / RIVA) in allen Gruppen vergleichbar (Tabelle 1).

	d_0	d_{28}
Körpergewicht	22 ± 3 kg	38,8 ± 3,6 kg
Hämodynamik	HF 79 ± 8 min^{-1}	HF 73 ± 10 min^{-1}
	RR_{syst} 98 ± 12 mmHg	RR_{syst} 102 ± 11 mmHg
LAD-Koronarangiographie	Unbeeinträchtigter Fluss	Unbeeinträchtigter Fluss

Tabelle 1: Vergleich von Körpergewicht, Hämodynamik und Blutfluss im Ramus interventricularis anterior an Versuchstag 0 (Baseline) und Versuchstag 28

III.2. TRANSDUKTIONSEFFIZIENZ IM ZIELGEBIET

Die Untersuchung der Transduktionseffizienz basierte auf zwei Säulen: Zum einen der Nachweis von viralem Genom der Adenoassoziierten Viralen Vektoren in den Kardiomyozyten des Zielgebiets mittels Polymerasekettenreaktion. Zum zweiten die quantitative Messung der Expression des Genprodukts Luciferase im Zielgebiet durch die Luciferaseprobe.

Als Beweis für das Vorhandensein von Vektor-DNA in den Zielzellen vier Wochen nach Transduktion wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt, die in allen Versuchsgruppen serotypunabhängig eindeutig Vektor-Genom im Zielbereich des Ramus interventricularis anterior (LAD / RIVA), insbesondere im proximalen und medialen Abschnitt, nachweisen konnte. Im Bereich des Ramus circumflexus der linken Koronararterie (Kontrollregion) konnten in den Versuchsgruppen lediglich diskrete, schwache Banden als Beweis für Vektor-DNA nachgewiesen werden, was die weitgehende Selektivität der druckregulierten Retroinfusion in das kardiale Zielgebiet untermauert.

Die durchschnittliche Luciferaseaktivität im Zielgebiet zeigte signifikante Unterschiede in der Transduktionseffizienz von Heparinbindungsstellen-gelöschtem Serotyp 2 und Serotyp 6: In beiden Gruppen wurden insgesamt $3{,}5 \times 10^{10}$ virale Genome unter gleichen Bedingungen und bei vergleichbarer Ausgangssituation in die anteriore Herzvene retroinfundiert. Der AAV Serotyp 2 zeigte eine moderate transgene Expression im Zielgebiet (durchschnittliche Luciferaseaktivität im Zielgebiet: 1365 ± 707 RLU / mg Protein). AAV Serotyp 6 induzierte eine bedeutend höhere mittlere Luciferaseexpression im Zielgebiet (65943 ± 31122 RLU / mg Protein) und war im Vergleich zu AAV Serotyp 2 signifikant effektiver ($p=0{,}05$). Ferner wurde untersucht, ob die zusätzliche Gabe von rekombinantem humanen Vascular Endothelial Growth Factor (rhVEGF) den Gentransfer mit AAV Serotyp 2 erleichtert: Die Coapplikation von rhVEGF erhöhte die durchschnittliche transgene Expression im Zielgebiet des Ramus interventricularis anterior (LAD / RIVA) signifikant (1365 ± 707 ohne Coapplikation von rhVEGF versus 38760 ± 2448 mit Coapplikation von rhVEGF, $p=0{,}001$). Durch die zusätzliche Gabe von rhVEGF konnte der AAV Serotyp 2

annähernd die durchschnittlichen Luciferasewerte erreichen, die nach Behandlung mit AAV Serotyp 6 erzielt werden konnten (38760 ± 2448 RLU / mg Protein bei Coapplikation von rhVEGF bei AAV Serotyp 2 versus 65943 ± 31122 RLU / mg Protein bei AAV Serotyp 6, keine Signifikanz).

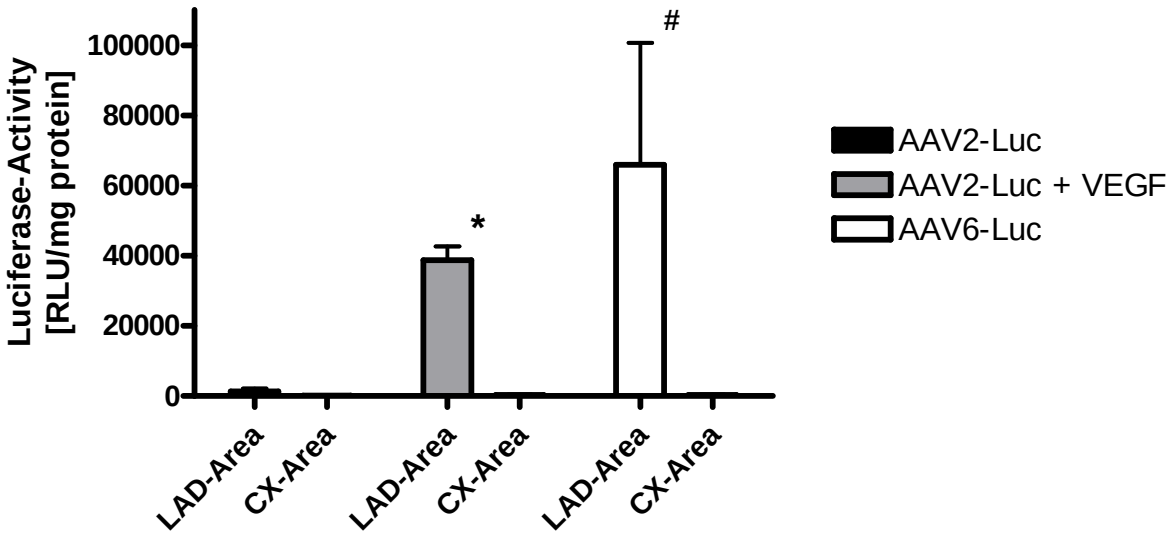

Abbildung 7: Luciferaseaktivität in Ziel- (LAD)- und Kontroll- (CX) -gebiet

III.3. VERTEILUNGSMUSTER IM ZIELGEBIET

Die Verprobung des linken Ventrikels in insgesamt 108 in ihrer Position klar definierte Segmente[120] ermöglicht eine detaillierte Darstellung, in welchen Bereichen des Zielgebiets die transgene Expression besonders hoch ist. Die durchschnittliche Luciferaseaktivität wurde in allen Segmenten gemessen und das Verteilungsmuster der transgenen Expression im Zielgebiet bestimmt. Unabhängig von transduziertem AAV Serotyp und unabhängig von der zusätzlichen Gabe von rhVEGF zeigten sich Expressionsgradienten von epimyokardialen zu endomyokardialen Proben und von Gewebeproben im Bereich des proximalen zum distalen Ramus interventricularis anterior (LAD / RIVA). Der Gradient zeigt ein Gefälle von epimyokardial nach endomyokardial und von proximal nach distal.

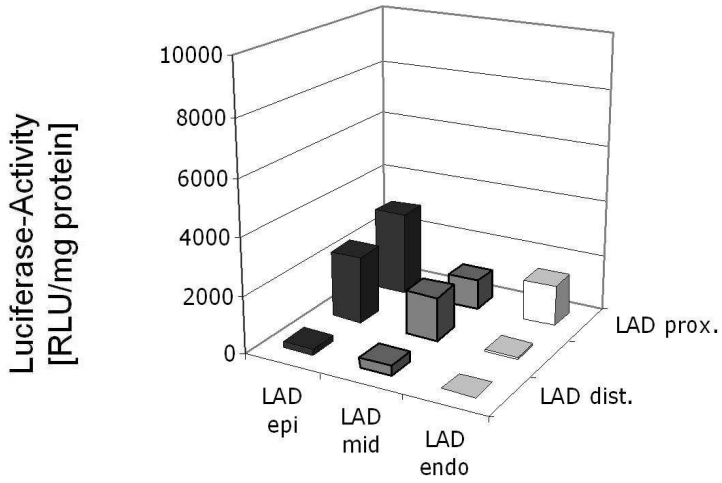

Abbildung 8.1:

Luciferaseaktivität im Zielgebiet 28 Tage nach Retroinfusion von AAV-2 Vektoren

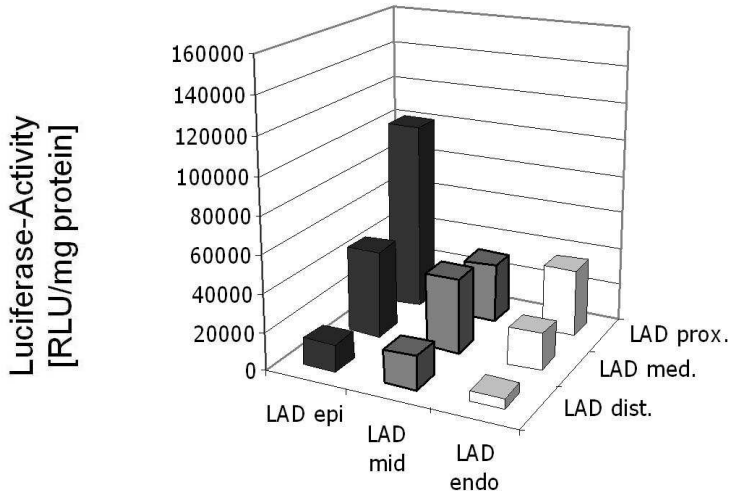

Abbildung 8.2:

Luciferaseaktivität im Zielgebiet 28 Tage nach Retroinfusion von AAV-2 Vektoren + 100µg VEGF

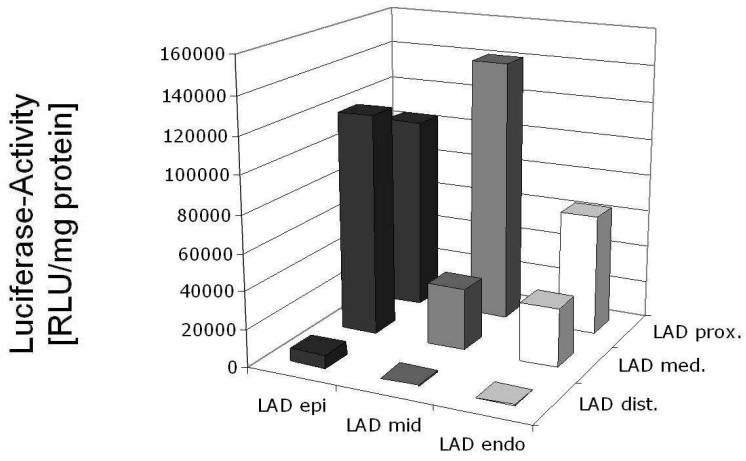

Abbildung 8.3:

Luciferaseaktivität im Zielgebiet 28 Tage nach Retroinfusion von AAV-6 Vektoren

III.4. ZYTOPATHISCHER EFFEKT

Eine der Anforderungen an einen therapeutischen myokardialen Gentransfer ist, dass der Vektor möglichst keinen oder einen zu vernachlässigenden zytopathischen und damit immunogenen Effekt aufweist. Zur Detektierung schädlicher Effekte wurden deshalb die Kardiomyozyten der Proben im Zielbereich mit besonders hohen transgenen Expressionen histologisch untersucht. Die HE-Färbungen zeigten an Versuchstag 28 intaktes Myokard ohne Zeichen einer Leukozyteninfiltration. Während der Beobachtungsphase zwischen Versuchstag 0 und 28 konnten ferner augenscheinlich anhand des Verhaltens der Tiere keine Beeinträchtigung der Hämodynamik und keine Infektionszeichen beobachtet werden.

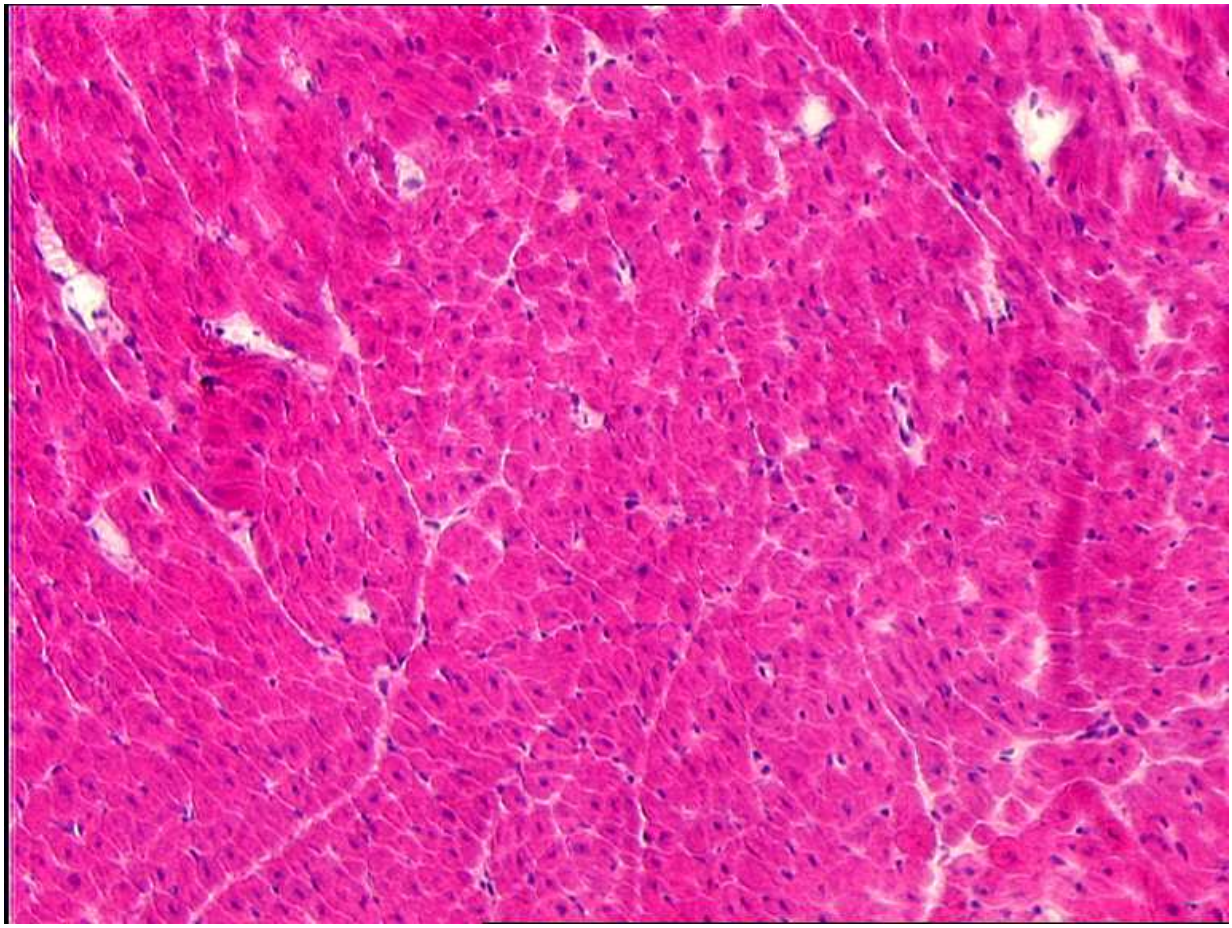

Abbildung 9: HE Färbung des Myokards im Zielbereich zeigt 28 Tage nach Retroinfusion intaktes Myokard ohne Zeichen einer Leukozyteninfiltration

III.5. TRANSDUKTION VON EXTRAKARDIALEN ORGANEN

Transduktion von nichtkardialen Geweben wurde mittels Polymerasekettenreaktion 28 Tage nach erfolgtem Gentransfer untersucht. Hierzu wurden Gewebeproben aus Leber, Lunge, thorakaler Aorta und Interkostalmuskulatur auf das Vorhandensein von Vektor-DNA untersucht. In Aorta und Skelettmuskel konnte unabhängig vom transduzierten Serotyp und unabhängig von der Coapplikation von rhVEGF keine Virus-DNA gefunden werden. In der mit AAV Serotyp 6 transduzierten Versuchsgruppe wurden signifikante Mengen von viralen Genomen in Leber und Lunge detektiert. Trotz dieser mittels Polymerasekettenreaktion nachgewiesener Vektor-DNA konnte durch die Luciferaseprobe keine transgene Expression in Lunge und Leber nachgewiesen werden. Unabhängig von AAV Serotyp und der zusätzlichen Gabe von rhVEGF konnte in keinem der untersuchten nichtkardialen Gewebe (thorakale Aorta, Lunge, Duodenum, Leber, Milz, Niere, Interkostalmuskulatur) eine Reportergen Expression gefunden werden. Dieser Effekt ist am ehesten durch die Kardioselektivität des angewendeten CMV-MLC2v – Promotors bedingt.

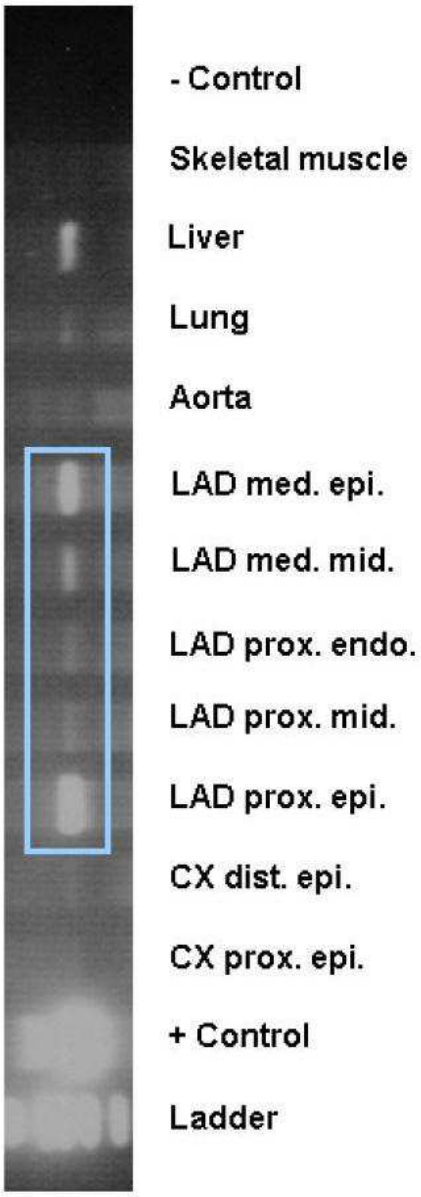

Abbildung 10:
Detektion von AAV-6-Vektorgenom im Zielgebiet (blauer Kasten) und Kontrollgebiet, sowie in Extrakardialen Organen

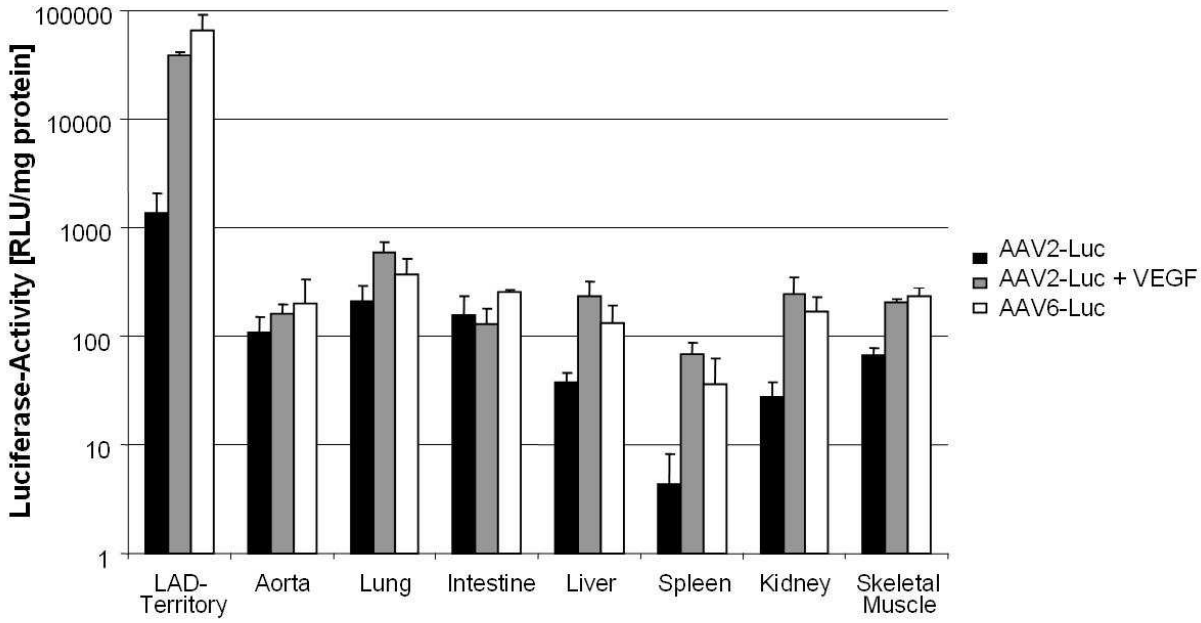

Abbildung 11: Luciferaseaktivität im Myokardialen Zielgebiet und in ausgewählten systemischen Organen

Ziel dieser Studie war es, in einem kliniknahen tierexperimentellen Modell zu untersuchen, ob mit der selektiven druckregulierten Retroinfusion, als neuem Applikationsverfahren für Adenoassoziierte Virale Vektoren (AAV) am Herzen, ein effektiver myokardialer Langzeitgentransfer erzielt werden kann. Die Transduktionseffizienz der von Heparinbindungsstellen-gelöschtem AAV Serotyp 2 und pseudotypisiertem AAV Serotyp 6 wurde miteinander verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, ob die simultane Anwendung von rekombinantem humanen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) während der Retroinfusionsbehandlung zu einer Steigerung der myokardialen Transduktionseffizienz führt.

IV.1. DURCHFÜHRUNG DER STUDIE

IV.1.1. DIE SELEKTIVE DRUCKREGULIERTE RETROINFUSION (SSRI)

Die selektive druckregulierte Retroinfusion ist ein seit 1998 klinisch etabliertes Herzkatheterverfahren[9], dessen Sicherheit und Effektivität an über 300 Patienten nachgewiesen werden konnte[9;117]. Während die antegrade Applikation von Therapeutika in die koronararterielle Strombahn krankheitsbedingt oft behindert sein kann, so bietet die Retroinfusion in die anteriore Herzvene den Vorteil, dass das koronarvenöse System nicht von artherosklerotischen Prozessen betroffen ist, und selbst bei fortgeschrittener Grunderkrankung stets als Zugangsweg offen steht[9;151]. Entwickelt wurde die selektive druckregulierte Retroinfusion um akute Ischämieschäden im Rahmen einer Hochrisiko-PTCA zu verhindern, indem das infolge der Koronararterienstenose ischämische Myokard retrograd gezielt mit arteriellem Blut über die Koronarvene versorgt werden kann. Die retrograde Applikation von Therapeutika erlaubt durch die im Vergleich zur antegraden Gabe deutlich längere Kontaktzeit mit dem Zielgebiet eine effektivere regionale Myokardbehandlung[120] und durch die Möglichkeit zur Absaugung des therapeutischen

Agens eine deutlich verringerte systemische Dissemination[10]. Die verlängerte Kontaktzeit und damit verbundene verbesserte Effizienz konnte in verschiedenen Studienprotokollen anhand des Wirkspektrums von Dobutamin[151] und Metoprolol[125] nachgewiesen werden. Als Applikationsverfahren für Vektorsysteme konnte sich die SSRI anhand eines effizienten myokardialen adenoviralen Gentransfers beweisen[10].

Wir wählten die selektive druckregulierte Retroinfusion als Applikationsverfahren, da wir hiermit die effektivste Transduktion im Zielareal erwarteten und uns Vorteile gegenüber der antegraden Gabe über die Koronararterie, oder der intramyokardialen Injektion erwarteten. Die Überlegenheit der Transduktionseffizienz der SSRI konnte insbesondere bei Adenoviralen Vektoren bewiesen werden: Sie zeigte eine höhere Effizienz als die antegrade Gabe über die Koronararterie[10] und eine homogenere Verteilung des Gentransfers als bei myokardialen Injektionen[120]. Eine Hauptlimitation der intrakoronaren Infusion ist die kurze Kontaktzeit des Vektors mit dem Koronarendothel. Somit wird der intrakoronar applizierte Vektor schnell in die systemische Zirkulation ausgeschwemmt. Variablen, die die Effizienz eines viralen Gentransfers über die Koronarzirkulation bestimmen können, sind der koronare Fluss, die Vektorkonzentraktion und die Endothelpermeabilität, was systemisch in isolierten Herzen analysiert werden konnte[30;31]. Durch die SSRI kann gezielt der koronare Fluss im Zielgebiet herabgesetzt werden[10;120], was zum einen zu einer verlängerten Kontaktzeit des Vektors mit dem Koronarendothel führt, und zum anderen zur Aufrechterhaltung einer hohen Vektorkonzentration durch eine geringere Ausschwemmung in die systemische Zirkulation – zwei wesentliche Bedingungen für einen viralen Gentransfer von hoher Effizienz.

IV.1.2. ADENOASSOZIIERTE VIRALE VEKTOREN (AAV)

Adenoassoziierte Viren werden in Gruppe zwei der Baltimoreklassifikation eingestuft. Sie gehören zur Gattung der Dependoviren, welche zur Familie der Parvoviridae zählen[15;163]. Es handelt sich um kleine 20nm große, einsträngige, replikationsdefekte DNA Viren mit einem Genom von 4,7 kB und palindromisch invertierten terminal repeats (ITR)[6;16;116]. Zum Auslösen einer produktiven Infektion ist ein Helfervirus

(insbesondere Adenovirus oder Herpes simplex Virus) nötig[12;68]. In Abwesenheit einer Coinfektion durch ein geeignetes Helfervirus bleibt das Adenoassoziierte Virus nonpathogen, jedoch integriert sich das AAV-Genom über seine invertierten terminal repeats (ITR) in die zelluläre Wirts-DNA sowohl von sich teilenden, wie auch sich nicht teilenden Zellen[116]. Der AAV-Wildtyp integriert sich zudem ortsspezifisch in den q-Arm des humanen Chromosoms 19[79;80;127], was das Virus als Vektor für einen humanen Gentransfer interessant macht, da das Risiko einer insertionellen Mutagenese und die Variabilität der transgenen Expression gering sind.
Bis Mai 2008 konnten insgesamt vierzehn AAV-Serotypen identifiziert werden[15], die aufgrund ihrer verschiedenen Capsideigenschaften über zelluläre Rezeptoren verschiedene Gewebearten infizieren können.

Wir entschieden uns für Adenoassoziierte Virale Vektoren, da wir zum einen eine effektive Transduktion der Kardiomyozyten, kombiniert mit einer Langzeitexpression des Zielgens erreichen, zum anderen jede Form von Immun- und damit Entzündungsreaktion vermeiden wollten. In Kleintierversuchen konnten myokardiale Gentransfers erfolgreich unter Bestätigung dieser Prämissen durchgeführt werden[19;149]. Die stabile Integration in die Wirts-DNA ist der entscheidende Faktor für die Langzeitexpression des Genprodukts, welches über die Adenoassoziierten Viren übermittelt wird. Dies konnte sowohl in vitro[6], wie auch in vivo[5] für sich teilende, wie auch sich nicht teilende Zellen nachgewiesen werden. Die Dauer der Genexpression am Mäusemyokard ist hierbei für mindestens ein Jahr nachweisbar[77], das Ausmaß der transgenen Expression zeigt keinen Unterschied zwischen den Zeitpunkten 4 Wochen und 3 Monate nach Transduktion[19;56]. Zudem konnte bis dato zumindest in Nagetieren gezeigt werden, dass bestimmte AAV-Serotypen in der Lage sind, die Blutgefäßbarriere effizient zu durchdringen, so dass geeignete pseudotypisierte AAV-Vektoren für einen Gentrasfer erfolgreich transvaskulär gegeben werden können: Die pseudotypisierten AAV-6, -8, und -9 Vektoren zeigten bei systemischer Applikation in erwachsenen Mäusen einen ausgeprägten und einheitlichen Transfer eines lacZ Reportergens[47;63;110;112]. Die intravenöse Injektion von AAV-8 Vektoren ermöglichte die Wiederherstellung von Delta-Sarkoglykan in Delta-Sarkoglykan-defizienten TO-2 Hamstern[162] und verlängerte deren Lebensspanne durch Vermeiden des Herzversagens in diesem Tiermodell der dilatativen Kardiomyopathie.

IV.1.3. AAV SEROTYPEN 2 UND 6

Für die vorliegende Studie mussten wir Vektoren wählen, die aufgrund ihrer pseudotypisierten Eigenschaften sowohl in der Lage sind, Kardiomyozyten zu infizieren, wie auch nach der transvaskulären Gabe die Gefäßwand effizient zu durchdringen. AAV Serotyp 2 war der erste und ist der mit Abstand am besten untersuchte AAV-Vektor zur Durchführung eines Gentransfers[15;43;78]. AAV Serotyp 6 zeigt einen ausgeprägten Herz- und Lungentropismus, weshalb in dieser Studie untersucht werden sollte, ob es im myokardialen Zielgewebe einen Unterschied in der Transduktionseffizienz von AAV Serotyp 6 und dem bereits weitgehend erforschten AAV-Serotyp 2 gibt. Beide Vektoren sind in der Lage, Mäusemyokard nach systemischer Vektorapplikation effektiv zu transduzieren[47;107].

In unserem Studienprotokoll, das den Einsatz der selektiven druckregulierten Retroinfusion als Applikationsverfahren vorsieht, ist es aus technischen Gründen notwendig, die Versuchstiere systemisch zu heparinisieren, um einen koagulationsbedingten Verschluss der Katheter zu vermeiden. Heparan-Sulfat-Proteoglykan (HSPG) ist ein primärer Zelloberflächenrezeptor für AAV-Serotyp 2[111;121;141] und AAV Serotyp 3[121]. Damit die Gabe der AAV-2 Viren über die transvaskuläre Route in Frage kommt, haben wir einen Heparinbindungsstellen-gelöschten AAV-2 Vektor (R484E, R585E)[75] verwendet, da die AAV-2 Vektoren mit intakter Heparinbindungsstelle sonst noch intravaskulär inaktiviert würden. Der Bindungsverlust der AAV-2 Vektoren an Heparan-Sulfat-Proteoglykan wird hierbei durch die Inaktivierung von zwei Heparinbindungsmotiven an den Positionen 484 und 585 ermöglicht[75]. AAV Serotyp 6 weist keine Heparinbindung auf[134].

IV.1.4. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gehört zur Subfamilie der Wachstumsfaktoren und ist ein bedeutendes Signalprotein sowohl zur Vaskulo- wie auch zur Angiogenese. Es sind sechs verschiedene VEGF-Formen bekannt[144], wobei

VEGF-A der am besten erforschte und wohl wichtigste Vertreter ist[156]. Durch Migration und gesteigerte Mitoseraten von Endothelzellen fördert VEGF-A die Angiogenese[36;83;87;108;144;145], es fördert die Bildung von Gefäßlumina und deren Größenwachstum[20;87;108;130;144;145], es erzeugt Fensterungen in der Endothelschicht[97;103;124;157], bildet einen chemotaktischen Reiz für Granulozyten und Makrophagen[97;103;144] und führt über Stickstoffmonoxid (NO) – Freisetzung indirekt zur Vasodilatation[38;66;92;102;147;154].

In der vorliegenden Studie wollten wir keine Angiogenetischen Effekte durch VEGF erzielen, sondern untersuchen, ob die simultane kurzzeitige Applikation von rekombinantem humanem Vascular Endothelial Growth Factor (rhVEGF) zusammen mit den AAV-Vektoren über eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität zu einer verbesserten Überwindung der Gefäßbarriere und damit zu einer Steigerung der Transduktionseffizienz führt.

IV.2. DISKUSSION DER STUDIENERGEBNISSE

IV.2.1. AAV SEROTYP 6 ZEIGT EINE HÖHERE TRANSDUKTIONSEFFIZIENZ

Zur Untersuchung der Transduktionseffizienz wurde zum einen der Nachweis von viralem Genom der Adenoassoziierten Viralen Vektoren in den Kardiomyozyten des Zielgebiets mittels Polymerasekettenreaktion erbracht. Zum zweiten erfolgte die quantitative Messung der Expression des Genprodukts Luciferase im Ziel- und Kontrollgebiet.

In allen Versuchsgruppen wurde serotypunabhängig eindeutig mittels PCR Vektor-Genom im Zielbereich des Ramus interventricularis anterior (LAD / RIVA) nachgewiesen.

Die durchschnittliche Luciferaseaktivität im Zielgebiet zeigte hochsignifikante Unterschiede in der Transduktionseffizienz zugunsten des AAV Serotyps 6 verglichen mit AAV Serotyp 2.

Die Überlegenheit der Transduktionseffizienz des AAV Serotyps 6 ist bei gleichen Ausgangsbedingungen in allen Versuchsgruppen im Pseudotyp des Vektors zu suchen. Aufgrund der verschiedenen Beschaffenheit der Viruskapside ist der Gewebetropismus unter den AAV Serotypen weit gefächert[15;163]. Die Zellaufnahme erfolgt hierbei rezeptorvermittelt[15;148;153]. Der Herz- und Lungentropismus von AAV-6 konnte in zahlreichen Studien belegt werden[47;110;112;113;163]. Die Ergebnisse unserer Untersuchung belegen, dass Serotyp 6 intravaskulär über selektive druckregulierte Retroinfusion gegeben, 28 Tage nach Vektorapplikation die höhere Transduktionseffizienz besitzt als AAV Serotyp 2.

AAV Serotypen wurden nach systemischer Vektorapplikation in die Schwanzvene von Mäusen neben ihrem Gewebetropismus auch systematisch hinsichtlich ihres absoluten Expressionsvermögens und der Expressionskinetik ihres transgenen Produktes untersucht[163]. Die Serotypen zeigten in einer Untersuchung über 100 Tage unterschiedliche Expressionsvermögen, wobei AAV Serotyp 2 in die Gruppe mit dem niedrigsten Expressionsvermögen eingestuft wurde – Serotyp 6 zeigte in der moderaten Gruppe ein per se deutlich höheres Expressionsvermögen, konnte jedoch nicht mit den Serotypen 7 und 9 in der Spitzengruppe konkurrieren[163]. Auch hinsichtlich der Expressionskinetik unterscheiden sich die Serotypen: Gehört Serotyp 6 der Gruppe mit dem schnellen Expressionsbeginn an, ist die Kinetik des Expressionsverlaufes bei Serotyp 2 deutlich langsamer[163]. Dies ist sicherlich ein Kritikpunkt an der von uns vorgenommenen Untersuchung, da lediglich eine Luciferaseaktivitätsbestimmung nach 28 Tagen und zu keinem späteren Zeitpunkt erfolgte. Aufgrund der langsameren Expressionskinetik des Serotyps 2 wäre hier zumindest ein moderater weiterer Anstieg der transgenen Expression möglich, bei dem jedoch kein Einfluss auf das Signifikanzniveau zu erwarten wäre. Zwar konnte die Arbeitsgruppe um Palomeque an Mäusekardiomyozyten zeigen, dass während die AAV-Serotypen 1, 6 und 8 einen hohen Tropismus zu den Herzmuskelzellen mit schneller Kinetik und dem Erreichen eines Plateaus der transgenen Expression nach vier Wochen aufweisen[113], der Serotyp 2 einen langsameren Anstieg verzeichnet, aber nach drei Monaten sogar vergleichbare Expressionslevel erreichen kann[113], so ist jedoch die Ursache dieses Untersuchungsergebnisses darin zu suchen, dass in letzterer Arbeitsgruppe die Vektoren nicht intravaskulär appliziert, sondern direkt in die

apikale Vorderwand des Herzens injiziert wurden, sich die Viren konsequent in ständigem Kontakt mit den Zielzellen befanden. Somit ist kein Vergleich gegenüber der intravasalen Applikation möglich, bei der die Kontaktzeit des Virus mit den Zielzellen und das Permeationsvermögen durch die Gefäßwand von entscheidender Bedeutung sind.

Die Transduktionseffizienz des AAV Serotyps 6 ist 28 Tage nach intravaskulärer Gabe mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion deutlich höher als dies beim Serotyp 2 der Fall ist. Die verminderte Transduktionseffizienz von AAV Serotyp 2 scheint dadurch bedingt, dass das Virus zum einen über seine Interaktion mit den Oberflächenrezeptoren des Kardiomyozyten weniger effektiv in die Zielzelle gelangt und es zum anderen die Gefäßbarriere weniger effektiv passieren kann, was dadurch gestützt werden kann, dass eine Änderung der Gefäßpermeabilität durch VEGF die Transduktionseffizienz des Serotyps 2 beeinflusst.

IV.2.2. SIMULTANE VEGF-APPLIKATION ERHÖHT DIE TRANSDUKTIONS-EFFIZIENZ

Die Annahme, dass in wesentlichem Maße Permeationsprobleme durch die Gefäßwand die geringere Transduktionseffizienz von AAV-2 bedingen, wird durch eine Verbesserung der transgenen Expression nach simultaner Zugabe von rekombinanten humanen VEGF untermauert. VEGF erzeugt Fensterungen in der Endothelschicht, was zu einer Zunahme der vaskulären Permeabilität, und damit zu einem verringerten Passagehindernis für die Vektoren führt[97;103;124;157].

Die simultane Coapplikation von rhVEGF, als zusätzliches Retroinfusat über die SSRI, erhöhte die durchschnittliche transgene Expression im Zielgebiet des Ramus interventricularis anterior (LAD / RIVA) signifikant, der AAV Serotyp 2 konnte annähernd die durchschnittlichen Luciferasewerte erreichen, die nach Behandlung mit AAV Serotyp 6 erzielt werden konnten (vgl. Ergebnisse).

Eine Studie, ob auch die Transduktionseffizienz von Serotyp 6 durch zusätzliche rhVEGF-Gabe noch weiter optimierbar gewesen wäre, ist sicherlich ein Kritikpunkt, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit hätte untersucht werden können. Allerdings war die Gabe von AAV Serotyp 6 alleine bereits so effektiv, dass keine weiteren Adjuvantien unbedingt erforderlich waren.

IV.2.3. VERTEILUNGSMUSTER DER TRANSGENEN EXPRESSION IM ZIELGEBIET

Die Verprobung des linken Ventrikels in insgesamt 108 in ihrer Position klar definierte Segmente ermöglicht eine detaillierte Darstellung, in welchen Bereichen des Zielgebiets die transgene Expression besonders hoch ist. Die durchschnittliche Luciferaseaktivität wurde in allen Segmenten gemessen und das Verteilungsmuster der transgenen Expression im Zielgebiet bestimmt. Unabhängig von transduziertem AAV Serotyp und unabhängig von der zusätzlichen Gabe von rhVEGF, stieg die transgene Expression in allen myokardialen Zielsegmenten im Bereich des Ramus interventricularis anterior (LAD / RIVA) an, es zeigten sich Expressionsgradienten von epimyokardialen zu endomyokardialen Proben und von Gewebeproben im Bereich des proximalen zum distalen Ramus interventricularis anterior (LAD / RIVA). Der Gradient zeigt ein Gefälle von epimyokardial nach endomyokardial und von proximal nach distal.

Ein Gefälle der Luciferaseaktivität von Epimyokardial nach Endomyokardial ist nicht verwunderlich, da die Coronargefäße epimyokardial verlaufen. Bei Gabe der viralen Vektoren in diese Gefäße wird sich die höchste Vektorkonzentration um das Ausgangsgefäß, dessen Abzweigungen und Kapillarbetten zunächst epimyokardial ausbreiten. Analog der zu überwindenden Strecke durch das Myokard bis zu den endomyokardialen Schichten wird die Anzahl der viralen Vektoren zunehmend abnehmen, so dass endomyokardial die geringsten Viruskonzentrationen zu erwarten sind. Zudem ist die Wandspannung in den inneren Myokardschichten am höchsten, was druckbedingt zu einem geringeren Fluss des Retroinfusats in diesem Bereich führt. Dieses Verteilungsverhalten zeigte sich bereits in zahlreichen

Voruntersuchungen, sowohl bei Adenoviralen Vektoren[10], wie auch nach Medikamentenapplikation[55;57;125] über die selektive druckregulierte Retroinfusion.

Ein fallender Luciferaseaktivitätsgradient zwischen proximalem und distalem Ramus interventricularis anterior (LAD / RIVA), wurde bei Gabe von adenoviralen Vektoren insbesondere bei der Retroinfusionsbehandlung über einen einmaligen 10minütigen Zyklus beobachtet[10]. In letzterem Versuchsprotokoll konnte ein zugunsten der distalen LAD günstigeres Verteilungsverhalten durch Gabe von zweimaligen 10minütigen Zyklen Retroinfusat, unterbrochen von einer halbstündigen Pause zur Vermeidung von Ischämieschäden, erzielt werden.

In unserer Untersuchung erfolgte ebenfalls die Retroinfusionsbehandlung über zwei 10minütige Zyklen, jedoch mit einer Pause von fünf Minuten. Einzige Unterschiede zu beschriebenem Studienprotokoll bei adenoviraler Retroinfusionstherapie waren die bei uns kürzere Pausenzeit, die bei uns deaktivierte Absaugeinheit und die unterschiedliche Viruszahl und –art (3,5 * 10^{10} pfu AAV vs. 4.0-5.0 * 10^{9} pfu Adenovirus).

Die in unserer Studie höhere Viruszahl lässt ein inhomogeneres Verteilungsmuster nicht erwarten. Die Absaugeinheit der selektiven druckregulierten Retroinfusion, deren Funktion die Verminderung der systemischen Dissemination des Retroinfusates ist und in unserem Versuchsprotokoll deaktiviert wurde, hat ebenfalls keinen zu erwartenden negativen Effekt auf das Verteilungsmuster der Vektoren im Zielbereich. Die Dauer der Pause zwischen den Retroinfusionszyklen dient lediglich der Regeneration des Myokards zur Vermeidung von ischämiebedingten Schäden und erklärt ebenfalls nicht die vorliegende Luciferaseaktivitätsverteilung. Ursächlich zu diskutieren bleiben neben Eigenschaften der Adenoassoziierten Viralen Vektoren per se, anwenderbedingte Unterschiede in beiden Studien, insbesondere bei der Positionierung des SSRI-Katheters in die anteriore interventrikuläre Herzvene (AIV).

IV.2.4. NACHWEIS VON VEKTORGENOM IN LUNGE UND LEBER

Ziel unseres Versuchsprotokoll war es, über die druckregulierte selektive Retroinfusion eine möglichst lange Kontaktzeit der viralen Vektoren im myokardialen Zielgebiet zu erreichen, um einen möglichst effektiven Gentransfer erzielen zu können. Die sekundäre systemische Dissemination, die durch die SSRI mithilfe ihrer Möglichkeit zur Absaugung des therapeutischen Agens minimiert werden kann[10;11], stand in diesem Versuchsvorhaben nicht im Vordergrund. Daher wurde die Absaugeinheit der SSRI deaktiviert. Dies bot zwei Vorteile: Zum einen konnte die Kontaktzeit der Vektoren im Zielbereich maximiert werden. Zum anderen führte dies zu einer Vektordissemination in den Körperkreislauf, wodurch untersucht werden konnte, ob die AAV Serotypen 2 und 6 weitere Gewebe entsprechend ihres unterschiedlichen Gewebetropismus infizieren und ob es in diesen Geweben zur Expression des Genproduktes trotz des kardiospezifischen CMV-MLC2v – Promotors kommt.

Die Transduktion der nichtkardialen Gewebe aus Leber, Lunge, Aorta und Skelettmuskel wurde mittels Polymerasekettenreaktion 28 Tage nach erfolgtem Gentransfer auf das Vorhandensein von Vektor-DNA untersucht. In Aorta und Skelettmuskel konnte unabhängig vom transduzierten Serotyp und unabhängig von der Coapplikation von rhVEGF keine Virus-DNA gefunden werden. In der mit AAV Serotyp 6 transduzierten Versuchsgruppe wurden signifikante Mengen von viralen Genom in Leber und Lunge detektiert, was sich mit den bisherigen Erkenntnissen des Gewebetropismus von AAV Serotyp 6 deckt[22;113;163].

IV.2.5. LUNGE UND LEBER ZEIGEN KEINE TRANSGENE EXPRESSION

Trotz der mittels Polymerasekettenreaktion nachgewiesenen Vektor-DNA des AAV Serotyps 6 in Lunge und Leber, konnte mittels Messung der Luciferaseaktivität keine transgene Expression in genannten Organen nachgewiesen werden. In keinem der sonstigen geprüften nichtkardialen Organe konnte Vektor-DNA gefunden werden.

Die viralen Vektoren haben also aus der Blutbahn heraus hepatische und pulmonale Zellen gemäß ihres Gewebetropismus infiziert und es kam zur Integration viraler DNA in das Wirtsgenom, wo sie sich mittels PCR nachweisen ließ. Jedoch wurde kein transgenes Produkt des Reportergens exprimiert, es erfolgte also keine Transkription aus dem übertragenen genetischen Material. Diese Beobachtung unterstreicht die Spezifität der verwendeten Cytomegalievirus-verstärkten Myosin-Leichte-Ketten-2v-Promotorsequenz (CMV-MLC2v) als kardioselektiven Promotor[39;53].

Es befand sich kein genetisches Material des AAV Serotyps 2 in der Leber, obwohl die Hepatozyten im Tropismusspektrum des nativen Serotyps 2 liegen[34;163]. Dies ist am ehesten dadurch bedingt, dass wir durch die Deletion der Heparinbindungsstellen an den Positionen 484 und 585 einen modifizierten AAV-2 Vektor erzeugten, dessen Tropismus zu Gunsten der Myokard- und zu Ungunsten der Lebertransduktion verschoben wurde[107;115]. Diese Möglichkeit der Modifikation von AAV-Vektoren mit der Folge einer Tropismusverschiebung zugunsten des gewünschten Zielorgans stellt einen herausragenden Vorteil von Adenoassoziierten Viralen Vektoren als Vektoren im Rahmen eines therapeutischen Gentransfers dar.

IV.3. LIMITATIONEN UND ÜBERTRAGBARKEIT

Adenoassoziierte Virale Vektoren besitzen eine Reihe von Eigenschaften, die sie für den Einsatz als Vektoren für einen therapeutischen Gentransfer prädestinieren: Ihre Nonpathogenität in Abwesenheit von Helferviren löst keine Toxizität oder Entzündungszeichen im Wirtsorganismus aus[7;13;16;96], was einen wesentlichen Baustein für die Verträglichkeit der Viren und die Sicherheit des Empfängers darstellt. Die stabile Integration in die Wirts-DNA[13;15;16;96] ermöglicht bei geeignetem Promotor eine langanhaltende Expression des Genproduktes[13;95;96], so dass der gewünschte Zieleffekt beispielsweise im Rahmen einer therapeutischen Arterio- & Angiogenese nicht nur transient zum Tragen kommt. Die Möglichkeit der Pseudotypisierung von verschiedenen AAV Serotypen durch Änderung der Struktur des Viruskapsids ermöglicht eine Einflussnahme auf den Gewebetropismus der Viren, so dass die

Transduktion kontrolliert auf das Zielgewebe konzentriert werden kann[84;89]. Adenoassoziierte Virale Vektoren sind ferner in der Lage, sowohl sich teilende, wie auch sich nicht teilende Zellen zu infizieren[13;24;116], womit sie einen großen Vorteil gegenüber etwa Retroviren haben, die aufgrund der mangelnden DNA-Synthese in sich nicht teilenden Zellen nicht suffizient eingesetzt werden können[7]. Und das Wildtypvirus zeigt, auf den Menschen übertragen, ein geringes Risiko einer insertionellen Mutagenese, da er sich ortsspezifisch in den Genlocus AAVS1 des q-Armes (q13.2-13.4) des humanen Chromosoms 19 integriert[35;54;79;80;95;127;128] und die Variabilität der transgenen Expression gering ist.

Limitierend für den gentherapeutischen Einsatz Adenoassoziierter Viraler Vektoren ist vor allem deren geringe Beladungskapazität von 4,7kB, die es nur ermöglicht, relativ kleine Gene zu übertragen[13-16;22;24;44;153]. Ferner existieren Berichte von ausgeprägten Immunantworten durch präexistierende Antikörper gegenüber zahlreichen AAV Serotypen. Insbesondere anti-AAV-2-Antikörper sind hochprävalent in der menschlichen Population vorhanden[48]. Daher wäre vor einer Übertragung von AAV-Vektoren auf den Menschen, entweder die Suche nach präexistierenden Antikörpern obligat, oder die Entwicklung eines neuen pseudotypisierten AAV Vektors, der keine Reaktivität mit den Antikörpern aufweist, erforderlich. Die Entdeckung des AAV Serotyps 12 und die Resistenz des rekombinanten AAV Serotyps 12 gegenüber zirkulierenden humanen Antikörpern[131] ist ein viel versprechender Ansatz, der jedoch weiterer Forschung insbesondere bezüglich des Gewebetropismus der Viren bedarf.

V. Zusammenfassung

Eckpfeiler für einen effizienten kardialen Gentransfer ist das Vorhandensein eines Vektorsystems, welches eine selektive und eine lang anhaltende Expression des Zielgens ermöglicht. In tierexperimentellen Modellen an Nagern konnte gezeigt werden, dass Adenoassoziierte Virale Vektoren wie der Serotyp 6 Kardiomyozyten effektiv transduzieren können. Da es signifikante speziesabhängige Unterschiede in den Transduktionscharakteristika gibt, sind Studien am Großtiermodell von entscheidender Bedeutung für präklinische Evaluationen.

In der vorliegenden Untersuchung verglichen wir die Effizienz des Gentransfers von pseudotypisiertem AAV Serotyp 6 und Heparinbindungsstellen-gelöschten-AAV-Serotyp-2-Vektoren in einem Tierexperimentellen Modell am Deutschen Landschwein. Die Applikation von jeweils $3{,}5 \times 10^{10}$ Adenoassoziierten Viralen Vektoren erfolgte mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion (SSRI) in die anteriore interventrikuläre Vene (AIV) des Herzens (n=5 Tiere pro Versuchsgruppe); ein Verfahren, von welchem zuvor die Effizienz eines viralen Gentransfers durch Adenoviren belegt werden konnte. Alle Vektoren beinhalteten ein Luciferasereportergen unter der Kontrolle eines kardiopezifischen Promotors (CMV-MLC2v). Der Expressionsgrad wurde vier Wochen nach erfolgtem Gentransfer durch Messung der Luciferaseaktivitität bestimmt. Um systemische Nebenwirkungen durch Transduktion von peripheren Geweben zu erfassen, wurden Gewebeproben auf das Vorhandensein von Vektor-DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) untersucht. Die selektive druckregulierte Retroinfusion von pseudotypisierten-AAV-Serotyp-6 - Vektoren in die anteriore interventrikuläre Vene (AIV) führte zu einer wesentlichen Erhöhung der Reportergenexpression im Zielgebiet des Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD) der linken Koronararterie (65943 ± 31122 vs. Kontrollgebiet 294 ± 69, $p<0{,}05$). Die Retroinfusion von Heparinbindungsstellen-gelöschten-AAV-Serotyp-2-Vektoren zeigte eine geringere transgene Expression, welche durch Coadministration von rekombinantem humanem Vascular Endothelial Growth Factor (rhVEGF) erhöht werden konnte (1365 ± 707 ohne rhVEGF vs. 38760 ± 2448 mit rhVEGF, $p<0{,}05$). Es konnte keine signifikante transgene Expression in anderen

Organen als dem Herzen festgestellt werden, obwohl Vektorgenome des AAV Serotyps 6 auch in Leber und Lunge nachgewiesen wurden.

Zusammenfassend führte am Großtiermodell des Deutschen Landschweins die selektive druckregulierte Retroinfusion (SSRI) von pseudotypisierten-AAV-Serotyp-6-Vektoren in die anteriore interventrikuläre Vene (AIV) des Herzens zu einer effizienten, langzeitigen myokardialen Reportergenexpression in dem Zielgebiet des Ramus interventricularis anterior (RIVA / LAD) der linken Koronararterie. Die Coapplikation von rekombinantem humanem Vascular endothelial growth factor (rhVEGF) erhöhte die Transduktionseffizienz von Heparin-bindungsstellen-gelöschtem-AAV-Serotyp-2 signifikant.

Die höhere kardiale Transduktionseffizienz von AAV Serotyp 6 wird dabei auf seine dem Serotyp 2 überlegenen Tropismuseigenschaften, insbesondere bei der Permeation durch die Gefäßwand, zurückgeführt.

VI. Literaturverzeichnis

1. Points to consider in human somatic cell therapy and gene therapy (1991). Hum.Gene Ther. 1991; 2: 251-6

2. Ahn A, Frishman WH, Gutwein A, Passeri J, Nelson M: Therapeutic angiogenesis: a new treatment approach for ischemic heart disease--part I 7. Cardiol.Rev. 2008; 16: 163-71

3. Ahn A, Frishman WH, Gutwein A, Passeri J, Nelson M: Therapeutic angiogenesis: a new treatment approach for ischemic heart disease--Part II. Cardiol.Rev. 2008; 16: 219-29

4. Bai H, Morishita R, Kida I, Yamakawa T, Zhang W, Aoki M, Matsushita H, Noda A, Nagai R, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T, Sawa Y, Matsuda H: Inhibition of intimal hyperplasia after vein grafting by in vivo transfer of human senescent cell-derived inhibitor-1 gene. Gene Ther. 1998; 5: 761-9

5. Barr E, Carroll J, Kalynych AM, Tripathy SK, Kozarsky K, Wilson JM, Leiden JM: Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication-defective adenovirus. Gene Ther. 1994; 1: 51-8

6. Berns KI, Bohenzky RA: Adeno-associated viruses: an update. Adv.Virus Res. 1987; 32: 243-306

7. Berry JD, Lloyd-Jones DM, Garside DB, Wang R, Greenland P: Social avoidance and long-term risk for cardiovascular disease death in healthy men: the Western Electric study. Ann.Epidemiol. 2007; 17: 591-6

8. Bhardwaj S, Roy H, Yla-Herttuala S: Gene therapy to prevent occlusion of venous bypass grafts. Expert.Rev.Cardiovasc.Ther. 2008; 6: 641-52

9. Boekstegers P, Giehrl W, von DG, Steinbeck G: Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty
1. J.Am.Coll.Cardiol. 1998; 31: 1525-33

10. Boekstegers P, von DG, Giehrl W, Heinrich D, Hullin R, Kupatt C, Steinbeck G, Baretton G, Middeler G, Katus H, Franz WM: Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins
5. Gene Ther. 2000; 7: 232-40

11. Boekstegers P, von DG, Giehrl W, Kupatt C, Franz W, Steinbeck G: Selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins as an alternative access of ischemic myocardium: implications for myocardial protection, myocardial gene transfer and angiogenesis. Z.Kardiol. 2000; 89 Suppl 9: IX/109-IX/112

12. Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA: Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. J.Virol. 1981; 40: 241-7

13. Buning H, Braun-Falco M, Hallek M: Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy. Cells Tissues.Organs 2004; 177: 139-50

14. Buning H, Nicklin SA, Perabo L, Hallek M, Baker AH: AAV-based gene transfer. Curr.Opin.Mol.Ther. 2003; 5: 367-75

15. Buning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M: Recent developments in adeno-associated virus vector technology. J.Gene Med. 2008; 10: 717-33

16. Carter PJ, Samulski RJ: Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. Int.J.Mol.Med. 2000; 6: 17-27

17. Cebe-Suarez S, Zehnder-Fjallman A, Ballmer-Hofer K: The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. Cell Mol.Life Sci. 2006; 63: 601-15

18. Christensen G, Minamisawa S, Gruber PJ, Wang Y, Chien KR: High-efficiency, long-term cardiac expression of foreign genes in living mouse embryos and neonates. Circulation 2000; 101: 178-84

19. Chu D, Sullivan CC, Weitzman MD, Du L, Wolf PL, Jamieson SW, Thistlethwaite PA: Direct comparison of efficiency and stability of gene transfer into the mammalian heart using adeno-associated virus versus adenovirus vectors
5. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 2003; 126: 671-9

20. Clayton JA, Chalothorn D, Faber JE: Vascular endothelial growth factor-A specifies formation of native collaterals and regulates collateral growth in ischemia. Circ.Res. 2008; 103: 1027-36

21. Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Hewett P, Ahmed S, Ahmed A: VEGF-E activates endothelial nitric oxide synthase to induce angiogenesis via cGMP and PKG-independent pathways. Biochem.Biophys.Res.Commun. 2006; 345: 1275-82

22. Daly TM: Overview of adeno-associated viral vectors
1. Methods Mol.Biol. 2004; 246: 157-65

23. David A, Chetritt J, Guillot C, Tesson L, Heslan JM, Cuturi MC, Soulillou JP, Anegon I: Interleukin-10 produced by recombinant adenovirus prolongs survival of cardiac allografts in rats. Gene Ther. 2000; 7: 505-10

24. Daya S, Berns KI: Gene therapy using adeno-associated virus vectors. Clin.Microbiol.Rev. 2008; 21: 583-93

25. DeBruyne LA, Li K, Chan SY, Qin L, Bishop DK, Bromberg JS: Lipid-mediated gene transfer of viral IL-10 prolongs vascularized cardiac allograft survival by inhibiting donor-specific cellular and humoral immune responses. Gene Ther. 1998; 5: 1079-87

26. Del MF, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ: Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in a rat model of heart failure. Circulation 2001; 104: 1424-9

27. Dewhirst MW, Cao Y, Li CY, Moeller B: Exploring the role of HIF-1 in early angiogenesis and response to radiotherapy
2. Radiother.Oncol. 2007; 83: 249-55

28. Dick RJ, Popma JJ, Muller DW, Burek KA, Topol EJ: In-hospital costs associated with new percutaneous coronary devices. Am.J.Cardiol. 1991; 68: 879-85

29. Dixon JA, Spinale FG: Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. Circ.Heart Fail. 2009; 2: 262-71

30. Donahue JK, Kikkawa K, Johns DC, Marban E, Lawrence JH: Ultrarapid, highly efficient viral gene transfer to the heart. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1997; 94: 4664-8

31. Donahue JK, Kikkawa K, Thomas AD, Marban E, Lawrence JH: Acceleration of widespread adenoviral gene transfer to intact rabbit hearts by coronary perfusion with low calcium and serotonin. Gene Ther. 1998; 5: 630-4

32. Donahue JK, Sasano T, Kelemen K: Gene therapy approaches to ventricular tachyarrhythmias. J.Electrocardiol. 2007; 40: S187-S191

33. Donnini S, Solito R, Giachetti A, Granger HJ, Ziche M, Morbidelli L: Fibroblast growth factor-2 mediates Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angiogenesis in coronary endothelium. J.Pharmacol.Exp.Ther. 2006; 319: 515-22

34. Du L, Kido M, Lee DV, Rabinowitz JE, Samulski RJ, Jamieson SW, Weitzman MD, Thistlethwaite PA: Differential myocardial gene delivery by recombinant serotype-specific adeno-associated viral vectors. Mol.Ther. 2004; 10: 604-8

35. Dutheil N, Henckaerts E, Kohlbrenner E, Linden RM: Transcriptional Analysis of the Adeno-Associated Virus Integration Site. J.Virol. 2009;

36. Egginton S: Invited review: activity-induced angiogenesis. Pflugers Arch. 2009; 457: 963-77

37. Enestvedt CK, Hosack L, Winn SR, Diggs BS, Uchida B, O'Rourke RW, Jobe BA: VEGF gene therapy augments localized angiogenesis and promotes anastomotic wound healing: a pilot study in a clinically relevant animal model. J.Gastrointest.Surg. 2008; 12: 1762-70

38. Erdamar S, Bagci P, Oz B, Dirican A: Correlation of endothelial nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor expression with malignancy in patients with astrocytic tumors. J.BUON. 2006; 11: 213-6

39. Franz WM, Breves D, Klingel K, Brem G, Hofschneider PH, Kandolf R: Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. Circ.Res. 1993; 73: 629-38

40. Franz WM, Rothmann T, Frey N, Katus HA: Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. Cardiovasc.Res. 1997; 35: 560-6

41. Freedman SB, Isner JM: Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease 4. Ann.Intern.Med. 2002; 136: 54-71

42. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K: VEGF function for upregulation of endogenous PlGF expression during FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis. Atherosclerosis 2008; 200: 51-7

43. Gao G, Vandenberghe LH, Wilson JM: New recombinant serotypes of AAV vectors. Curr.Gene Ther. 2005; 5: 285-97

44. Gardlik R, Palffy R, Hodosy J, Lukacs J, Turna J, Celec P: Vectors and delivery systems in gene therapy
2. Med.Sci.Monit. 2005; 11: RA110-RA121

45. Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD, Nozaki S, DeMaria AN, Dillmann WH, Mathieu-Costello O, Hammond HK: Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in an ischemic region of the heart. Nat.Med. 1996; 2: 534-9

46. Gordon EM, Anderson WF: Gene therapy using retroviral vectors. Curr.Opin.Biotechnol. 1994; 5: 611-6

47. Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW, Chamberlain JS: Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. Nat.Med. 2004; 10: 828-34

48. Grimm D, Kay MA: From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. Curr.Gene Ther. 2003; 3: 281-304

49. Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA: Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6
1. Mol.Ther. 2003; 7: 839-50

50. Grimm D, Kern A, Pawlita M, Ferrari F, Samulski R, Kleinschmidt J: Titration of AAV-2 particles via a novel capsid ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2
6. Gene Ther. 1999; 6: 1322-30

51. Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL: Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris
4. Circulation 2002; 105: 1291-7

52. Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ, Iskandrian AE, Rade JJ, Marrott P, Pratt C, Kleiman N: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina
2. J.Am.Coll.Cardiol. 2003; 42: 1339-47

53. Griscelli F, Gilardi-Hebenstreit P, Hanania N, Franz WM, Opolon P, Perricaudet M, Ragot T: Heart-specific targeting of beta-galactosidase by the ventricle-specific cardiac myosin light chain 2 promoter using adenovirus vectors. Hum.Gene Ther. 1998; 9: 1919-28

54. Guilbaud M, Chadeuf G, Avolio F, Francois A, Moullier P, Recchia A, Salvetti A: Relative influence of the adeno-associated virus (AAV) type 2 p5 element for recombinant AAV vector site-specific integration. J.Virol. 2008; 82: 2590-3

55. Haga Y, Uriuda Y, Bjorkman JA, Hatori N, Johansson L, Nordlander R, Sjoquist PO, Ryden L: Ischemic and nonischemic tissue concentrations of felodipine after coronary venous retroinfusion during myocardial ischemia and reperfusion: an experimental study in pigs. J.Cardiovasc.Pharmacol. 1994; 24: 298-302

56. Hammond HK, McKirnan MD: Angiogenic gene therapy for heart disease: a review of animal studies and clinical trials. Cardiovasc.Res. 2001; 49: 561-7

57. Hatori N, Sjoquist PO, Regardh C, Ryden L: Pharmacokinetic analysis of coronary sinus retroinfusion in pigs. Ischemic myocardial concentrations in the left circumflex coronary arterial area using metoprolol as a tracer. Cardiovasc.Drugs Ther. 1991; 5: 1005-10

58. Hauswirth WW, Lewin AS, Zolotukhin S, Muzyczka N: Production and purification of recombinant adeno-associated virus
9. Methods Enzymol. 2000; 316: 743-61

59. Henry TD, Abraham JA: Review of Preclinical and Clinical Results with Vascular Endothelial Growth Factors for Therapeutic Angiogenesis
7. Curr.Interv.Cardiol.Rep. 2000; 2: 228-41

60. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER: The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis
1. Circulation 2003; 107: 1359-65

61. Henry TD, Grines CL, Watkins MW, Dib N, Barbeau G, Moreadith R, Andrasfay T, Engler RL: Effects of Ad5FGF-4 in patients with angina: an analysis of pooled data from the AGENT-3 and AGENT-4 trials
1. J.Am.Coll.Cardiol. 2007; 50: 1038-46

62. Henry TD, Rocha-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, Losordo DW, Hendel RC, Bonow RO, Eppler SM, Zioncheck TF, Holmgren EB, McCluskey ER: Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease 5. Am.Heart J. 2001; 142: 872-80

63. Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA, Nakai H: Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8 1. Mol.Ther. 2006; 14: 45-53

64. Isobe M, Suzuki J, Morishita R, Kaneda Y, Amano J: Gene therapy for heart transplantation-associated coronary arteriosclerosis. Ann.N.Y.Acad.Sci. 2000; 902: 77-83

65. Iwata A, Sai S, Moore M, Nyhuis J, de Fries-Hallstrand R, Quetingco GC, Allen MD: Gene therapy of transplant arteriopathy by liposome-mediated transfection of endothelial nitric oxide synthase. J.Heart Lung Transplant. 2000; 19: 1017-28

66. Jacobs ER, Zhu D, Gruenloh S, Lopez B, Medhora M: VEGF-induced relaxation of pulmonary arteries is mediated by endothelial cytochrome P-450 hydroxylase. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol 2006; 291: L369-L377

67. Jang GC, Block PC, Cowley MJ, Gruentzig AR, Dorros G, Holmes DR, Jr., Kent KM, Leatherman LL, Myler RK, Sjolander SM, .: Relative cost of coronary angioplasty and bypass surgery in a one-vessel disease model. Am.J.Cardiol. 1984; 53: 52C-5C

68. Janik JE, Huston MM, Rose JA: Locations of adenovirus genes required for the replication of adenovirus-associated virus. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1981; 78: 1925-9

69. Jayakumar J, Suzuki K, Khan M, Smolenski RT, Farrell A, Latif N, Raisky O, Abunasra H, Sammut IA, Murtuza B, Amrani M, Yacoub MH: Gene therapy for myocardial protection: transfection of donor hearts with heat shock protein 70 gene protects cardiac function against ischemia-reperfusion injury. Circulation 2000; 102: III302-III306

70. Jayakumar J, Suzuki K, Sammut IA, Smolenski RT, Khan M, Latif N, Abunasra H, Murtuza B, Amrani M, Yacoub MH: Heat shock protein 70 gene transfection protects mitochondrial and ventricular function against ischemia-reperfusion injury. Circulation 2001; 104: I303-I307

71. Jiang M, Wang B, Wang C, He B, Fan H, Guo TB, Shao Q, Gao L, Liu Y: Angiogenesis by transplantation of HIF-1 alpha modified EPCs into ischemic limbs 3. J.Cell Biochem. 2008; 103: 321-34

72. Kaneda Y: Improvements in gene therapy technologies. Mol.Urol. 2001; 5: 85-9

73. Katz MG, Swain JD, Low D, White JD, Stedman HH, Bridges CR: Cardiac Gene Therapy: Optimization of Gene Delivery Techniques in Vivo. Hum.Gene Ther. 2009;

74. Kawauchi M, Suzuki J, Morishita R, Wada Y, Izawa A, Tomita N, Amano J, Kaneda Y, Ogihara T, Takamoto S, Isobe M: Gene therapy for attenuating cardiac allograft arteriopathy using ex vivo E2F decoy transfection by HVJ-AVE-liposome method in mice and nonhuman primates. Circ.Res. 2000; 87: 1063-8

75. Kern A, Schmidt K, Leder C, Muller OJ, Wobus CE, Bettinger K, Von der Lieth CW, King JA, Kleinschmidt JA: Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids
2. J.Virol. 2003; 77: 11072-81

76. Kleiman NS, Califf RM: Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS 2000 and ACC 2000. American College of Cardiology
21. J.Am.Coll.Cardiol. 2000; 36: 310-25

77. Kornowski R, Leon MB, Fuchs S, Vodovotz Y, Flynn MA, Gordon DA, Pierre A, Kovesdi I, Keiser JA, Epstein SE: Electromagnetic guidance for catheter-based transendocardial injection: a platform for intramyocardial angiogenesis therapy. Results in normal and ischemic porcine models. J.Am.Coll.Cardiol. 2000; 35: 1031-9

78. Kotin RM: Prospects for the use of adeno-associated virus as a vector for human gene therapy. Hum.Gene Ther. 1994; 5: 793-801

79. Kotin RM, Linden RM, Berns KI: Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. EMBO J. 1992; 11: 5071-8

80. Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI: Site-specific integration by adeno-associated virus. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1990; 87: 2211-5

81. Kupatt C, Dessy C, Hinkel R, Raake P, Daneau G, Bouzin C, Boekstegers P, Feron O: Heat shock protein 90 transfection reduces ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction via reciprocal endothelial NO synthase serine 1177 phosphorylation and threonine 495 dephosphorylation
2. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2004; 24: 1435-41

82. Kupatt C, Hinkel R, Vachenauer R, Horstkotte J, Raake P, Sandner T, Kreuzpointner R, Muller F, Dimmeler S, Feron O, Boekstegers P: VEGF165 transfection decreases postischemic NF-kappa B-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of eNOS phosphorylation
1. FASEB J. 2003; 17: 705-7

83. Kutryk MJ, Stewart DJ: Angiogenesis of the heart. Microsc.Res.Tech. 2003; 60: 138-58

84. Kwon I, Schaffer DV: Designer gene delivery vectors: molecular engineering and evolution of adeno-associated viral vectors for enhanced gene transfer. Pharm.Res. 2008; 25: 489-99

85. Kypson A, Hendrickson S, Akhter S, Wilson K, McDonald P, Lilly R, Dolber P, Glower D, Lefkowitz R, Koch W: Adenovirus-mediated gene transfer of the beta2-adrenergic receptor to donor hearts enhances cardiac function. Gene Ther. 1999; 6: 1298-304

86. Laffel GL, Fineberg HV, Braunwald E: A cost-effectiveness model for coronary thrombolysis/reperfusion therapy. J.Am.Coll.Cardiol. 1987; 10: 79B-90B

87. Lahteenvuo JE, Lahteenvuo MT, Kivela A, Rosenlew C, Falkevall A, Klar J, Heikura T, Rissanen TT, Vahakangas E, Korpisalo P, Enholm B, Carmeliet P, Alitalo K, Eriksson U, Yla-Herttuala S: Vascular endothelial growth factor-B induces myocardium-specific angiogenesis and arteriogenesis via vascular endothelial growth factor receptor-1- and neuropilin receptor-1-dependent mechanisms. Circulation 2009; 119: 845-56

88. Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Murphree SS, French BA: Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits. Circulation 1998; 98: 1438-48

89. Li W, Asokan A, Wu Z, Van DT, DiPrimio N, Johnson JS, Govindaswamy L, gbandje-McKenna M, Leichtle S, Redmond DE, Jr., McCown TJ, Petermann KB, Sharpless NE, Samulski RJ: Engineering and selection of shuffled AAV genomes: a new strategy for producing targeted biological nanoparticles. Mol.Ther. 2008; 16: 1252-60

90. Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D: Lifetime risk of developing coronary heart disease. Lancet 1999; 353: 89-92

91. Lloyd-Jones DM, Wilson PW, Larson MG, Beiser A, Leip EP, D'Agostino RB, Levy D: Framingham risk score and prediction of lifetime risk for coronary heart disease. Am.J.Cardiol. 2004; 94: 20-4

92. Lopez JJ, Laham RJ, Carrozza JP, Tofukuji M, Sellke FW, Bunting S, Simons M: Hemodynamic effects of intracoronary VEGF delivery: evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response. Am.J.Physiol 1997; 273: H1317-H1323

93. Losordo DW, Vale PR, Isner JM: Gene therapy for myocardial angiogenesis. Am.Heart J. 1999; 138: S132-S141

94. Louis AA, Manousos IR, Coletta AP, Clark AL, Cleland JG: Clinical trials update: The Heart Protection Study, IONA, CARISA, ENRICHD, ACUTE, ALIVE, MADIT II and REMATCH. Impact Of Nicorandil on Angina. Combination Assessment of Ranolazine In Stable Angina. ENhancing Recovery In Coronary Heart Disease patients. Assessment of Cardioversion Using Transoesophageal Echocardiography. AzimiLide post-Infarct surVival Evaluation. Randomised Evaluation of Mechanical Assistance for Treatment of Chronic Heart failure 1. Eur.J.Heart Fail. 2002; 4: 111-6

95. Maeda Y, Ikeda U, Ogasawara Y, Urabe M, Takizawa T, Saito T, Colosi P, Kurtzman G, Shimada K, Ozawa K: Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. Cardiovasc.Res. 1997; 35: 514-21

96. Maeda Y, Ikeda U, Shimpo M, Ueno S, Ogasawara Y, Urabe M, Kume A, Takizawa T, Saito T, Colosi P, Kurtzman G, Shimada K, Ozawa K: Efficient gene transfer into cardiac myocytes using adeno-associated virus (AAV) vectors. J.Mol.Cell Cardiol. 1998; 30: 1341-8

97. Maharaj AS, D'Amore PA: Roles for VEGF in the adult. Microvasc.Res. 2007; 74: 100-13

98. Matsumoto T, Komori K, Yonemitsu Y, Morishita R, Sueishi K, Kaneda Y, Sugimachi K: Hemagglutinating virus of Japan-liposome-mediated gene transfer of endothelial cell nitric oxide synthase inhibits intimal hyperplasia of canine vein grafts under conditions of poor runoff. J.Vasc.Surg. 1998; 27: 135-44

99. Maurice JP, Hata JA, Shah AS, White DC, McDonald PH, Dolber PC, Wilson KH, Lefkowitz RJ, Glower DD, Koch WJ: Enhancement of cardiac function after adenoviral-mediated in vivo intracoronary beta2-adrenergic receptor gene delivery. J.Clin.Invest 1999; 104: 21-9

100. McLean JW, Fox EA, Baluk P, Bolton PB, Haskell A, Pearlman R, Thurston G, Umemoto EY, McDonald DM: Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice. Am.J.Physiol 1997; 273: H387-H404

101. Mercadier JJ, Logeart D: Myocardial gene therapy. Arch.Mal Coeur Vaiss. 2002; 95: 197-203

102. Milkiewicz M, Hudlicka O, Brown MD, Silgram H: Nitric oxide, VEGF, and VEGFR-2: interactions in activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol 2005; 289: H336-H343

103. Mohle R, Rafii S, Moore MA: The role of endothelium in the regulation of hematopoietic stem cell migration. Stem Cells 1998; 16 Suppl 1: 159-65

104. Molin D, Post MJ: Therapeutic angiogenesis in the heart: protect and serve 30. Curr.Opin.Pharmacol. 2007; 7: 158-63

105. Morgan RA, Anderson WF: Human gene therapy. Annu.Rev.Biochem. 1993; 62: 191-217

106. Muller OJ, Katus HA, Bekeredjian R: Targeting the heart with gene therapy-optimized gene delivery methods. Cardiovasc.Res. 2007; 73: 453-62

107. Muller OJ, Leuchs B, Pleger ST, Grimm D, Franz WM, Katus HA, Kleinschmidt JA: Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors
2. Cardiovasc.Res. 2006; 70: 70-8

108. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF: VEGF-A(164/165) and PlGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis. Trends Cardiovasc.Med. 2003; 13: 169-75

109. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF: VEGF-A induces angiogenesis, arteriogenesis, lymphangiogenesis, and vascular malformations. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 2002; 67: 227-37

110. Nakai H, Fuess S, Storm TA, Muramatsu S, Nara Y, Kay MA: Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice 1. J.Virol. 2005; 79: 214-24

111. O'Donnell J, Taylor KA, Chapman MS: Adeno-associated virus-2 and its primary cellular receptor--Cryo-EM structure of a heparin complex. Virology 2009; 385: 434-43

112. Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, Zolotukhin I, Tarantal AF, Byrne BJ: Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo 1. Circ.Res. 2006; 99: e3-e9

113. Palomeque J, Chemaly ER, Colosi P, Wellman JA, Zhou S, Del MF, Hajjar RJ: Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo. Gene Ther. 2007; 14: 989-97

114. Parsons-Wingerter P, Elliott KE, Clark JI, Farr AG: Fibroblast growth factor-2 selectively stimulates angiogenesis of small vessels in arterial tree. Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. 2000; 20: 1250-6

115. Perabo L, Goldnau D, White K, Endell J, Boucas J, Humme S, Work LM, Janicki H, Hallek M, Baker AH, Buning H: Heparan sulfate proteoglycan binding properties of adeno-associated virus retargeting mutants and consequences for their in vivo tropism. J.Virol. 2006; 80: 7265-9

116. Podsakoff G, Wong KK, Jr., Chatterjee S: Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. J.Virol. 1994; 68: 5656-66

117. Pohl T, Giehrl W, Reichart B, Kupatt C, Raake P, Paul S, Reichenspurner H, Steinbeck G, Boekstegers P: Retroinfusion-supported stenting in high-risk patients for percutaneous intervention and bypass surgery: results of the prospective randomized myoprotect I study 1. Catheter.Cardiovasc.Interv. 2004; 62: 323-30

118. Praveen SV, Francis J, Venugopal K: Gene therapy in cardiac arrhythmias. Indian Pacing Electrophysiol.J. 2006; 6: 111-8

119. Qin L, Chavin KD, Ding Y, Woodward JE, Favaro JP, Lin J, Bromberg JS: Gene transfer for transplantation. Prolongation of allograft survival with transforming growth factor-beta 1. Ann.Surg. 1994; 220: 508-18

120. Raake P, von DG, Hinkel R, Vachenauer R, Sandner T, Beller S, Andrees M, Kupatt C, Schuler G, Boekstegers P: Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery
1. J.Am.Coll.Cardiol. 2004; 44: 1124-9

121. Rabinowitz JE, Bowles DE, Faust SM, Ledford JG, Cunningham SE, Samulski RJ: Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups. J.Virol. 2004; 78: 4421-32

122. Renault MA, Losordo DW: Therapeutic myocardial angiogenesis. Microvasc.Res. 2007; 74: 159-71

123. Rissanen TT, Yla-Herttuala S: Current status of cardiovascular gene therapy
1. Mol.Ther. 2007; 15: 1233-47

124. Roberts WG, Palade GE: Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J.Cell Sci. 1995; 108 (Pt 6): 2369-79

125. Ryden L, Tadokoro H, Sjoquist PO, Regardh C, Kobayashi S, Corday E, Drury JK: Pharmacokinetic analysis of coronary venous retroinfusion: a comparison with anterograde coronary artery drug administration using metoprolol as a tracer. J.Am.Coll.Cardiol. 1991; 18: 603-12

126. Sakoda T, Kasahara N, Kedes L: Lentivirus vector-mediated gene transfer to cardiomyocytes. Methods Mol.Biol. 2003; 219: 53-70

127. Samulski RJ, Zhu X, Xiao X, Brook JD, Housman DE, Epstein N, Hunter LA: Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. EMBO J. 1991; 10: 3941-50

128. Satoh W, Hirai Y, Tamayose K, Shimada T: Site-specific integration of an adeno-associated virus vector plasmid mediated by regulated expression of rep based on Cre-loxP recombination. J.Virol. 2000; 74: 10631-8

129. Sawa Y, Kadoba K, Suzuki K, Bai HZ, Kaneda Y, Shirakura R, Matsuda H: Efficient gene transfer method into the whole heart through the coronary artery with hemagglutinating virus of Japan liposome. J.Thorac.Cardiovasc.Surg. 1997; 113: 512-8

130. Schirmer SH, van RN: Stimulation of collateral artery growth: a potential treatment for peripheral artery disease. Expert.Rev.Cardiovasc.Ther. 2004; 2: 581-8

131. Schmidt M, Voutetakis A, Afione S, Zheng C, Mandikian D, Chiorini JA: Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. J.Virol. 2008; 82: 1399-406

132. Scholl FG, Sen L, Drinkwater DC, Laks H, Ma XY, Hong YS, Chang P, Cui G: Effects of human tissue plasminogen gene transfer on allograft coronary atherosclerosis. J.Heart Lung Transplant. 2001; 20: 322-9

133. Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P: Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. J.Cell Biol. 1998; 141: 1659-73

134. Seiler MP, Miller AD, Zabner J, Halbert CL: Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry. Hum.Gene Ther. 2006; 17: 10-9

135. Shah AS, Lilly RE, Kypson AP, Tai O, Hata JA, Pippen A, Silvestry SC, Lefkowitz RJ, Glower DD, Koch WJ: Intracoronary adenovirus-mediated delivery and overexpression of the beta(2)-adrenergic receptor in the heart : prospects for molecular ventricular assistance. Circulation 2000; 101: 408-14

136. Shah AS, White DC, Emani S, Kypson AP, Lilly RE, Wilson K, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ: In vivo ventricular gene delivery of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. Circulation 2001; 103: 1311-6

137. Shears LL, Kawaharada N, Tzeng E, Billiar TR, Watkins SC, Kovesdi I, Lizonova A, Pham SM: Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis. J.Clin.Invest 1997; 100: 2035-42

138. Simons M, Bonow RO, Chronos NA, Cohen DJ, Giordano FJ, Hammond HK, Laham RJ, Li W, Pike M, Sellke FW, Stegmann TJ, Udelson JE, Rosengart TK: Clinical trials in coronary angiogenesis: issues, problems, consensus: An expert panel summary. Circulation 2000; 102: E73-E86

139. Sleeper MM, Bish LT, Sweeney HL: Gene therapy in large animal models of human cardiovascular genetic disease. ILAR.J. 2009; 50: 199-205

140. Stewart MJ, Plautz GE, Del BL, Yang ZY, Xu L, Gao X, Huang L, Nabel EG, Nabel GJ: Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice. Hum.Gene Ther. 1992; 3: 267-75

141. Summerford C, Samulski RJ: Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. J.Virol. 1998; 72: 1438-45

142. Sun B, Zhang H, Franco LM, Brown T, Bird A, Schneider A, Koeberl DD: Correction of glycogen storage disease type II by an adeno-associated virus vector containing a muscle-specific promoter
5. Mol.Ther. 2005; 11: 889-98

143. Symes JF, Losordo DW, Vale PR, Lathi KG, Esakof DD, Mayskiy M, Isner JM: Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. Ann.Thorac.Surg. 1999; 68: 830-6

144. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K: The biology of vascular endothelial growth factors. Cardiovasc.Res. 2005; 65: 550-63

145. Tomanek RJ, Zheng W, Yue X: Growth factor activation in myocardial vascularization: therapeutic implications. Mol.Cell Biochem. 2004; 264: 3-11

146. Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A: Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. Circulation 1994; 90: 583-612

147. Valdes G, Kaufmann P, Corthorn J, Erices R, Brosnihan KB, Joyner-Grantham J: Vasodilator factors in the systemic and local adaptations to pregnancy. Reprod.Biol.Endocrinol. 2009; 7: 79

148. Varenika V, Kells AP, Valles F, Hadaczek P, Forsayeth J, Bankiewicz KS: Controlled dissemination of AAV vectors in the primate brain. Prog.Brain Res. 2009; 175: 163-72

149. Vassalli G, Bueler H, Dudler J, von Segesser LK, Kappenberger L: Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo: a comparative study with adenovirus vectors
1. Int.J.Cardiol. 2003; 90: 229-38

150. Vincent KA, Feron O, Kelly RA: Harnessing the response to tissue hypoxia: HIF-1 alpha and therapeutic angiogenesis
5. Trends Cardiovasc.Med. 2002; 12: 362-7

151. von DG, Giehrl W, Boekstegers P: Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion. Cardiovasc.Res. 1997; 35: 233-40

152. Wafai R, Tudor EM, Angus JA, Wright CE: Vascular effects of FGF-2 and VEGF-B in rabbits with bilateral hind limb ischemia
3. J.Vasc.Res. 2009; 46: 45-54

153. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ: Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. Mol.Ther. 2006; 14: 316-27

154. Yang R, Bunting S, Jin H: Effects of VEGF on hemodynamics and cardiac function: characterization and mechanisms. IDrugs. 2000; 3: 1346-52

155. Yla-Herttuala S, Markkanen JE, Rissanen TT: Gene therapy for ischemic cardiovascular diseases: some lessons learned from the first clinical trials
1. Trends Cardiovasc.Med. 2004; 14: 295-300

156. Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J: Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. J.Am.Coll.Cardiol. 2007; 49: 1015-26

157. Yokomori H, Oda M, Yoshimura K, Nagai T, Ogi M, Nomura M, Ishii H: Vascular endothelial growth factor increases fenestral permeability in hepatic sinusoidal endothelial cells. Liver Int. 2003; 23: 467-75

158. Yonemitsu Y, Alton EW, Komori K, Yoshizumi T, Sugimachi K, Kaneda Y: HVJ (Sendai virus) liposome-mediated gene transfer: current status and future perspectives (review). Int.J.Oncol. 1998; 12: 1277-85

159. Zatloukal K, Wagner E, Cotten M, Phillips S, Plank C, Steinlein P, Curiel DT, Birnstiel ML: Transferrinfection: a highly efficient way to express gene constructs in eukaryotic cells. Ann.N.Y.Acad.Sci. 1992; 660: 136-53

160. Zhao J, Lever AM: Lentivirus-mediated gene expression. Methods Mol.Biol. 2007; 366: 343-55

161. Zhao J, Pettigrew GJ, Thomas J, Vandenberg JI, Delriviere L, Bolton EM, Carmichael A, Martin JL, Marber MS, Lever AM: Lentiviral vectors for delivery of genes into neonatal and adult ventricular cardiac myocytes in vitro and in vivo. Basic Res.Cardiol. 2002; 97: 348-58

162. Zhu T, Zhou L, Mori S, Wang Z, Mctiernan CF, Qiao C, Chen C, Wang DW, Li J, Xiao X: Sustained whole-body functional rescue in congestive heart failure and muscular dystrophy hamsters by systemic gene transfer
1. Circulation 2005; 112: 2650-9

163. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE: Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. Mol.Ther. 2008; 16: 1073-80

VII. Abkürzungen

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AAV	Adenoassoziiertes Virus
AAVS1	Genlocus q-Arm (q13.2-13.4) humanes Chromosom 19
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AIV	anterior interventricular vein
anti-AAV2-AK	Anti-AAV2-Antikörper
Aqua dest	Destilliertes Wasser
atm	athmosphere (1 atm = 101,325 Pascal)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
CK	Creatinkinase
cm	Centimeter
cm^3	Kubikcentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CMV_{enh}-MLC1.5-Luc	cytomegalievirus enhanced myosin light chain 1.5 luciferase Gen
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm

ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ENDO	Endomyokardial
EPI	Epimyokardial
F	Frech cathether scale
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
H_2O	Wasser
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HF	Herzfrequenz
HIF 1α	Hypoxia Inducible Factor 1α
HPSG	Heparan-Sulfat-Proteoglykan
hsp70	heat shock protein 70
hsp90	heat shock protein 90
HVJ	Hemagglutinating Virus of Japan
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
ICF	Institut für Chirurgische Forschung der LMU München
IE	Injektionseinheit
ITR	inverted terminal repeat
kB	kilo-Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht

kg	Kilogramm
KM	Kontrastmittel
LAD	left anterior descending artery
LVEDP	Linksventrikulärer Enddiastolischer Druck
m	Meter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
$Mg(OH)_2$	Magnesiumhydroxid
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgCO_3$	Magnesiumcarbonat
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MID	Midmyokardial
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MLC	myosin light chain
µm	Mikrometer
mmHg	millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millilmol
mol	Molekulargewicht
mV	Millivolt
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

NO	Stickstoffmonooxid
OP	Operation
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pfu	plaque forming unit
pH	pH-Wert
PTCA	percutaneous transluminal coronary angioplasty
R484E, R585E	Heparinbindungsstellengelöschter AAV-2 Vektor
RCX	Ramus circumflexus
rhVEGF	recombinant human vascular endothelial growth factor
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RLU	relative light units
RNA	Ribonucleic acid
RNAse	Ribonuclease
rpm	revolutions per minute
RR	Riva-Rocci
SD/SA	splice-donor / splice-acceptor signal
SERCA	Sarkoendoplasmatisches-Retikulum-ATPase
SOD	Superoxiddismutase
SSRI	selective synchronized suction and retroinfusion
TBE	TRIS-Borat-EDTA - Puffer
Tricin	N-(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycine
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units

UV	Ultraviolett
V	Volt
V.	Vena
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol%	Volumenprozent
vs	versus
Vv.	Venae
VVD	Venenverschlußdruck

VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt

- Herrn Prof. Dr. Peter Boekstegers für die Überlassung des interessanten Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine Betreuung im Verlauf dieser Dissertation. Auch insbesondere für die optimalen Bedingungen in der Arbeitsgruppe, bei den Versuchsabläufen und den analytischen Auswertungen möchte ich mich besonders bedanken

- Herrn Dr. Philip Raake für die intensive Betreuung und Unterstützung innerhalb der Arbeitsgruppe während der experimentellen Phase, sowie für die konstruktive und begleitende Kritik während der Erstellung dieser Arbeit

- Herrn Dr. Oliver Müller, Herrn Dr. Robert Kreuzpointner und Herrn Prof. Dr. Hugo A. Katus der Universitätsklinik Heidelberg für das zur Verfügung stellen der Vektoren und für ihre kompetente fachliche Unterstützung

- Frau Rabea Hinkel, Frau Dr. Marie-Luise von Brühl und Herrn Jan Horstkotte für die freundschaftlich-kollegiale Arbeitsathmosphäre und die Unterstützung in klinisch-experimentellen Fragestellungen

- Frau Susanne Helbig und Frau Elisabeth Ronft für die vielfältige Unterstützung bei den laboranalytischen Auswertungen und den labortechnischen Fragestellungen, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre

- Herrn PD Dr. Christian Kupatt für das Heranführen an wissenschaftliche Fragestellungen und die Interpretation wissenschaftlicher Ergebnisse

- Frau Susanne Müller für die gegenseitige Unterstützung bei der praktischen Durchführung der experimentellen Arbeiten und der gemeinsamen Betreuung der Versuchstiere

- Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl für das zur Verfügungstellen der Räumlichkeiten seines Institutes für Chirurgische Forschung der LMU München und sämtlicher Mitarbeiter des Institutes, die mich freundlich aufnahmen und stets zuverlässig unterstützten

- meiner Frau Ruth für die liebevolle Unterstützung und Hilfestellung während der vielen langen Arbeiten im Operationssaal des Institutes für Chirurgische Forschung, der Auswertungsarbeiten im Labor des Klinikums Großhadern und dem Erstellen dieser Arbeit

- meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung, ihren Antrieb und dafür, dass sie mir diesen Weg ermöglicht haben

IX. Lebenslauf

Persönliche Daten:	Sebastian Delker geboren am 15.10.1979 in Mainz
Eltern:	Dr. rer. nat. Rex Delker Angelika Delker, geb. Windmeier
Geschwister:	Andreas und Florian Delker
Nationalität:	Deutsch
Familienstand:	Verheiratet

Schulausbildung:

1986-1991	Grundschule Escola-Suiço-Brasileira, São Paulo, Brasilien
1991-1999	Leonhard-Wagner-Gymnasium, Schwabmünchen
25.06.1999	Schulabschluss (allgemeine Hochschulreife)

Wehrdienst:

07/1999 – 04/2000	Grundwehrdienst

Studium:

10/2000 – 04/2007	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
09/2002	Ärztliche Vorprüfung
08/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
25.04.2007	Approbation als Arzt

Berufliche Tätigkeit:

seit 05/2007	Assistenzarzt für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin am Zentralklinikum Augsburg