

**Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität, München**

Direktor: Prof. Dr. med. C. Hagl

**AAV-2/9 vermittelter Gentransfer in  
porcine Kardiomyozyten im heterotopen  
Herztransplantationsmodell**



**Dissertation**

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

**vorgelegt von**

**Maximilian Schmidt  
aus Wiesbaden**

**2012**

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

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

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Stefan Brunner  
Priv. Doz. Dr. Jan Groetzner

Mitbetreut durch: Dr. med. Lars Burdorf

**Dekan:** Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2012

<b>1. Einführung .....</b>	<b>6</b>
1.1 Hintergrund .....	6
1.2 Zielsetzung.....	10
1.2.1 Erstes Hauptziel.....	10
1.2.2 Zweites Hauptziel.....	11
1.2.3 Nebenziel .....	11
1.3 Grundlagen .....	11
1.3.1 Transduktion .....	11
1.3.2 Adenovirus-Assoziierte-Viren.....	12
1.3.3 Markergene.....	17
1.3.4 Therapeutische Gene.....	18
1.3.5 Transplantatabstoßung .....	23
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1 Gebrauchsmaterial .....	26
2.1.1 Gerätschaften .....	26
2.1.2 Instrumente .....	26
2.2 Verbrauchsmaterial .....	27
2.2.1 Medikamente .....	27
2.2.2 Fäden.....	28
2.2.3 Sonstiges .....	28
2.3 Perfusionssystem .....	29
2.3.1 Materialien .....	29
2.3.2 Aufbau.....	30
2.4 Versuchstiere .....	32
2.5 Versuchsdurchführung .....	32

2.5.1 Narkoseführung .....	32
2.5.2 Operationstechniken .....	33
2.5.3 Postoperativer Verlauf.....	40
2.5.4 Versuchsende .....	41
2.6 Versuchsauswertung.....	42
2.6.1 Probengewinnung .....	42
2.6.2 Färbungen.....	43
2.6.3 Statistische Auswertung.....	46
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
3.1 Effektive Transduktion durch AAV-2/9 .....	47
3.2 Vermittlung organprotektiver Effekte durch PD-L1 und TB4 .....	56
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>87</b>
4.1 Erstes Hauptziel .....	87
4.2 Zweites Hauptziel .....	90
4.3 Nebenziel .....	95
4.4 Ausblick.....	96
4.4.1 Vermeidung der hyperakuten Abstoßung (HAR).....	98
4.4.2 Vermeidung der akuten vaskulären Abstoßung (AVR) .....	100
4.4.3 Verhinderung einer zellulären Abstoßung .....	101
4.4.4 Sonstige organprotektive Veränderungen.....	102
4.4.5 Fazit und zukünftige Transduktionsversuche .....	103
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>104</b>
5.1 Ziele der Studie .....	104
5.1.1 Erstes Hauptziel.....	104
5.1.2 Zweites Hauptziel.....	104

5.1.3 Nebenziel .....	105
5.2 Methodik.....	105
5.3 Ergebnisse .....	106
6. Literaturverzeichnis .....	107
7. Abbildungsverzeichnis.....	120
8. Tabellenverzeichnis.....	125
9. Abkürzungsverzeichnis .....	127
10. Danksagung .....	133

# 1. Einführung

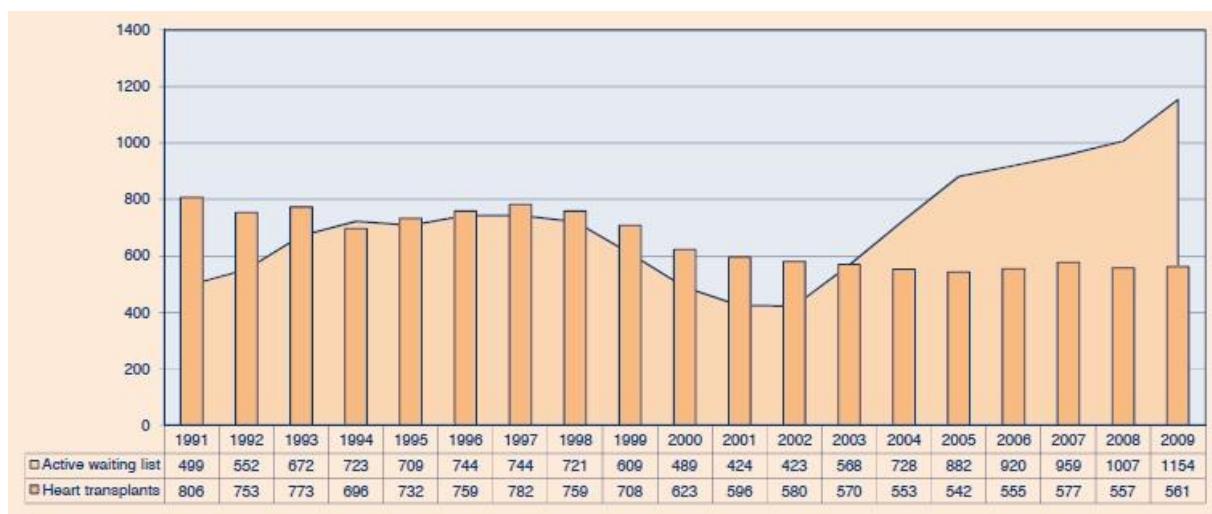
## 1.1 Hintergrund

Die Herztransplantation (HTX) stellt zur Zeit die einzige kurative Therapieoption bei der terminalen Herzinsuffizienz dar, welche durch Infektionen oder Erkrankungen des Herzmuskels, der Koronararterien oder der Herzkappen sowie auch seltener durch Herzfehlbildungen oder systemische Speicherkrankheiten (z.B. Amyloidose oder Morbus Fabry) verursacht sein kann [Lloyd-Jones et al., 2010]. Seit der ersten HTX 1967 in Kapstadt durch Christiaan Barnard wurden alleine in Deutschland bis zum Jahr 2009 über 7000 allogene Herztransplantationen durchgeführt (Quelle: Eurotransplant Jahresbericht 2010). Obwohl immer noch fast 20% der bei Eurotransplant gelisteten Patienten versterben, bevor für sie ein passendes Organ gefunden werden kann, stagniert die Zahl der durchgeföhrten Transplantationen (Abb. 1). Diese Diskrepanz lässt sich durch das geringe Angebot an möglichen Organspendern erklären, welche einer wachsenden Zahl an potentiellen Organempfängern gegenüberstehen. Als problematisch anzusehen ist jedoch auch die Tatsache, dass die Gesamtheit sowohl der Organspender als auch der Organempfänger immer älter wird. Bereits heute wird fast nur denjenigen Patienten ein Herz transplantiert, welche auf der Warteliste in einer sehr hohen Dringlichkeit („High Urgency“) oder hohen Dringlichkeit („Urgency“) gelistet sind. Um den Organbedarf zu decken und allen bedürftigen Patienten helfen zu können ist es deshalb erforderlich

- Die Anzahl der Organspender zu erhöhen
- Das Transplantatüberleben zu verlängern
- Alternativen zur Allotransplantation zu entwickeln.

Die Anzahl der Organspender ließe sich durch die Einführung der sogenannten Widerspruchslösung zur Organspende, wie sie in Spanien oder Österreich existiert,

erhöhen. Die Daten aus diesen Ländern zeigen, dass sich durch diese Maßnahme, bei der jeder Bürger als potentieller Organspender gilt, sofern er nicht ausdrücklich widerspricht, das Organangebot erhöhen ließe. In der Praxis ist eine solche Änderung jedoch nicht so einfach umsetzbar, da in der Bevölkerung große Vorbehalte gegen entsprechende Vorschläge bestehen. Die derzeitige Regelung der erweiterten Zustimmung, bei der entweder die entsprechende Person selbst oder nach seinem Ableben auch nahe Angehörige über den Verbleib der Organe entscheiden, wird demnach voraussichtlich bestehen bleiben. Da jedoch viele Menschen keinen Organspendeausweis besitzen sind Vorschläge, wie z.B. bei Beantragung eines Personalausweises Angaben zur Einwilligung in die Organspende tätigen zu müssen, eine weitere effektive Möglichkeit, das Organspenderangebot zu erhöhen. Ferner könnten durch die weitere konsequente Einführung von Transplantationsbeauftragten zusätzliche potentielle Spender akquiriert werden.



**Abbildung 1:** Entwicklung der Warteliste und der durchgeführten Herztransplantationen von 1991 – 2009. Die Daten beziehen sich auf die an Eurotransplant teilnehmenden Länder. (Quelle: Eurotransplant Jahresbericht 2010)

Um dem Organmangel zu begegnen ist es außerdem von größter Bedeutung das Transplantatüberleben, auch hinsichtlich einer weiter steigenden Lebenserwartung, zu verlängern. Die 1-Jahres-Überlebensrate nach Herztransplantation beträgt aktuell etwa 80%, wobei 90% der Patienten eine gute Herzfunktion zeigen. Nach Fünf

Jahren leben noch 70% der Organempfänger (Quelle: Eurotransplant Jahresbericht 2010). Die Langzeitüberlebensraten entsprechen denen nach einer Nierentransplantation. Trotz der bereits sehr guten Resultate, welche einer optimierten Operationstechnik und vor allem der Entwicklung hochpotenter Immunsuppressiva zuzuschreiben sind, bestehen noch viele bisher ungelöste Probleme. So stellt die Einführung des Medikamentes Cyclosporin A Anfang der 1980iger Jahre zwar einen Meilenstein in der Geschichte der Transplantationsmedizin dar, weil seitdem die meisten Abstoßungsreaktionen effektiv unterdrückt werden können. Seine hohe Toxizität führt jedoch bei einem Viertel der Patienten zu Schäden und einer Intimaproliferation der Koronararterien (Transplantatvaskulopathie = TVP) und kann die Nieren insoweit schädigen, dass auch hier Transplantationsbedarf entstehen kann [Crespo-Leiro, 2005]. Mit der Zulassung des IMPDH-Hemmers Mycophenolatmofetil (MMF) für die Herztransplantation im Jahr 1996, welches üblicherweise in einer Kombination mit den Calcineurinhibitoren Tacrolimus und Cyclosporin A verabreicht wird, konnte ein Rückgang vor allem der TVP beobachtet werden [Dandel and Hetzer, 2010]. Es bedarf aber noch einer großen Anstrengung, um eine potente Immunsuppression bei möglichst geringen unerwünschten Nebenwirkungen zu etablieren. Eine Möglichkeit könnte sein das Spenderorgan vor der Implantation mittels eines viralen Vektors gentechnisch soweit zu verändern, dass die dann noch benötigte Dosis an immunsuppressiven Medikamenten eine weitaus weniger toxische Konzentration erreicht.

Ein weiterer Ansatz, um dem Organmangel zu begegnen, ist die Entwicklung von Alternativen zur herkömmlichen Allotransplantation. Hierzu zählen z.B. die sogenannten Kunstherzen. Es wird unterschieden zwischen vollständig künstlichen Herzen (Total Artificial Hearts = TAH) und ventrikulären Unterstützungssystemen (Ventricular Assist Devices = VAD bzw. Left Ventricular Assist Devices = LVAD). Das erste seiner Art wurde 1969 in Houston, Texas verwendet. Der Apparat erzeugte für 65 Stunden einen ausreichenden Blutkreislauf, bevor er durch ein menschliches Herz ersetzt wurde [Cooley *et al.*, 1969]. Obwohl mittlerweile VADs bzw. LVADs und TAHs entwickelt wurden, welche Laufzeiten von weit über einem Jahr erreichten, stellt ihr Einsatz immer noch eine Übergangslösung dar, bis ein passendes menschliches

Herz zur Verfügung steht. Trotz der Ankündigungen einiger Firmen, in den nächsten Jahren Kunstherzen als gleichwertigen Ersatz der Allotransplantation zur Marktreife zu bringen, ist es fraglich, ob die bei diesen Systemen üblichen Probleme wie die Interaktion des Blutes mit der Fremdoberfläche oder die Energieversorgung zufriedenstellend gelöst werden können.

Mit diesen Problemen muss sich in der Stammzellforschung nicht auseinandersetzt werden. Hier ist es theoretisch möglich, körpereigene pluripotente Stammzellen zu entnehmen und sie in jedes beliebiges Gewebe, also auch Endo-, Epi-, und Myokard differenzieren zu lassen. Da es sich um eine Autotransplantation handeln würde, wäre keine Immunsuppression notwendig. Diese Methode ist von einer klinischen Anwendung jedoch noch weit entfernt, begründet vor allem durch eine mögliche Tumorgenese aus den pluripotenten Zellen.

Alternativ wird auch im Rahmen der Xenotransplantationsforschung nach einer Möglichkeit gesucht, dem vorherrschenden Organmangel zu begegnen. Als Organspender für den Menschen würden sich besonders Schweine (z.B. deutsche Landrasseschweine) eignen, da sich die Herzen physiologisch und anatomisch stark ähneln und in jeder anatomischen Größe verfügbar sind [Swindle, 1984; Weaver *et al.*, 1986]. Innerhalb kürzester Zeit könnte ein ausreichendes Organangebot hergestellt werden und bei einer Tierhaltung in der Nähe der Krankenhäuser würde sich die Ischämiezeit stark verkürzen. Das große Problem in der Xenotransplantation stellt jedoch die phylogenetische Ferne der Schweine von den Menschen dar. Dadurch laufen die Phasen der Abstoßungsreaktion in einer solchen Schwere ab, dass sie mit den herkömmlichen immunsuppressiven Medikamenten für eine klinische Anwendung nicht ausreichend kontrolliert werden können. Eine Lösung dieses Problems könnte der Transfer immunmodulatorischer bzw. immunsuppressiver und protektiv-wirkender Gene in das porcine Myokard darstellen, was mit Hilfe dieser Arbeit näher erforscht werden soll.

## 1.2 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit wurden im Wesentlichen zwei Ziele verfolgt: Das erste Ziel bestand darin, mit Hilfe des sogenannten *in-situ* Langendorff Perfusionssystem und einem rekombinanten Vektorsystem einen effektiven Gentransfer in porcine Kardiomyozyten zu ermöglichen. Nach Etablierung des Vektorsystems sollte dieser in einem zweiten Versuchsabschnitt dazu verwendet werden, um sogenannte therapeutische Gene, also Gene mit immunmodulatorischen und kardioprotektiven Eigenschaften, in den transduzierten Schweineherzen zu exprimieren. Diese sollten anschließend heterotop in das Abdomen von Empfängertieren implantiert werden, um dort mögliche positive Effekte der therapeutischen Gene auf eine Verringerung der Transplantatabstoßung und auf das Transplantatüberleben zu untersuchen.

### 1.2.1 Erstes Hauptziel

#### **Effektive Transduktion porciner Kardiomyozyten mittels rAAV 2/9**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des bereits etablierten *in-situ* Langendorff Perfusionssystem [Schulz, 2009] den rAAV 2/9 als Vektor für einen effektiven Gentransfer porciner Kardiomyozyten zu etablieren. Dabei wurden an den Vektor folgende Anforderungen gestellt:

- Sehr hohe Transduktionsrate
- Kardioselektivität
- Apathogenität
- Keine Immunreaktion

Um die Transduktionseffizienz zu überprüfen wurde ein Markergen, das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (LacZ), verwendet und dessen Expression in jeweils 45 Segmenten der Herzen untersucht.

### **1.2.2 Zweites Hauptziel**

#### **Verlängerung des Transplantatüberlebens durch Einbringen von therapeutischen Genen**

Nach Beweis der Transduktionseffizienz sollte das Einbringen verschiedener therapeutischer Gene (PD-L1 und TB4) mittels rAAV 2/9 für eine Verlängerung des Transplantatüberlebens bzw. für eine Verringerung der makroskopischen und mikroskopischen Abstoßungszeichen sorgen.

### **1.2.3 Nebenziel**

#### **Transduktion von bereits mehrfach transgenen Spenderherzen.**

Es ist davon auszugehen, dass durch das Einbringen von nur einem Gen eine xenogene Transplantatabstoßung trotz optimaler Immunsuppression nicht verhindert werden kann bzw. bei der Allotransplantation eine Verringerung der immunsuppressiven Medikation durch Einbringen von lediglich einem Gen nur schwer vorstellbar ist. Es sollte deshalb untersucht werden, ob eine Transduktion zusätzlicher immunmodulatorischer Gene in bereits mehrfach transgene Spendertiere mittels rAAV 2/9 erfolgreich ist.

## **1.3 Grundlagen**

### **1.3.1 Transduktion**

Als Transduktion bezeichnet man das Einschleusen genetischen Materials in eine Zelle mit Hilfe eines viralen Vektors als Transportmedium. Als Vektoren können dabei sowohl Herpes Simplex Viren, Adenoviren als auch Adeno-Assoziierte Viren fungieren. Je nachdem, welcher Zell- oder Gewebetyp transduziert werden soll, stellt sich die Wahl eines bestimmten Vektorsystems als mehr oder weniger geeignet dar. In unserem Fall war nach dem aktuellen Stand der Forschung das Adeno-Assoziierte

Virus 2/9 (AAV-2/9) sehr vielversprechend, da wir myokardiales Gewebe erreichen wollten. Der Vorgang der Transduktion lässt sich wie folgt vereinfacht darstellen: Der erste Schritt besteht in der Aufnahme des Vektors durch die Zelle mittels Endozytose. Nach dem intrazytoplasmatischen Transport via Mikrotubuli erfolgt nach Einschleusen in den Nukleus die Transkription, also das Abschreiben der genetischen Information mittels mRNA (messenger RNA). Diese gelangt wiederum in das Zytoplasma, wo Ribosomen die mRNA in die entsprechenden Gene übersetzen (Translation).

### **1.3.2 Adenovirus-Assoziierte-Viren**

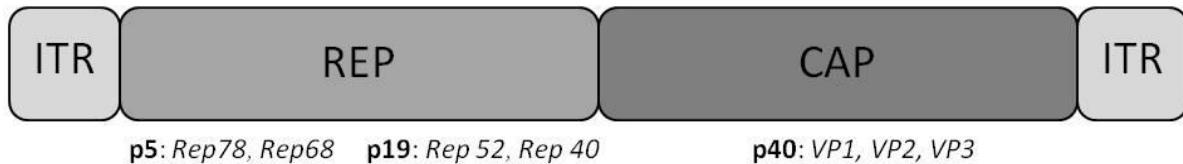
#### **Allgemein**

Das Adeno(virus) - assoziierte Virus (AAV) ist ein Einzelstrang DNA Virus aus der Gattung der Dependoviren und zählt zur Familie der Parvoviridae. Mit seinem etwa 4,7 Kb (Kilobasen) umfassenden Genom und dem 18-30 nm im Durchmesser großen, ikosaedrischen Kapsid zählt es zu den kleinsten bekannten eukaryontischen DNA-Viren [Carter and Samulski, 2000; Palomeque *et al.*, 2007; Zentilin and Giacca, 2008].

#### **Genomaufbau**

Das Genom des AAV lässt sich in drei funktionelle Einheiten unterteilen: In die beiden offenen Leserahmen (ORF = Open Reading Frames) CAP und REP und in die ITR's (Inverted Terminal Repeats), welche die ORF flankieren [Mendelson *et al.*, 1986; Srivastava *et al.*, 1983]. Der am 3'-Ende gelegene CAP ORF kodiert für die drei Proteine VP1, VP2 und VP3, welche zusammen das Viruskapsid bilden. Die Expression der drei Proteine wird durch den Promotor p40 reguliert. Am 5'-Ende, dem offenen Leserahmen CAP, regulieren zwei Promotoren die Expression von vier Proteinen. Rep78 und seine Spleißvariante Rep68 werden durch p5 reguliert, p19 steuert die Expression von Rep52 und der Spleißvariante Rep40. Die vier Proteine sind zuständig für die Verpackung der Einzelstrang-DNA in das Virus-Kapsid, die Replikations- und Transkriptionskontrolle sowie für den ortsspezifischen Einbau in

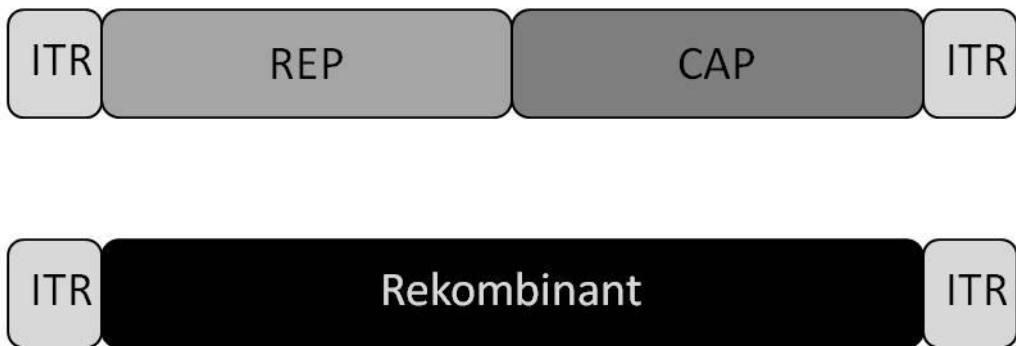
das Wirtsgenom [Berns, 1990; Berns *et al.*, 1988; Carter and Samulski, 2000; Im and Muzyczka, 1992; McCarty *et al.*, 1992; McLaughlin *et al.*, 1988; Muzyczka, 1992].



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Genoms von AAV-2, modifiziert nach [Buning et al., 2008].

## Rekombinante AAV (rAAV)

Um das AAV als Vektor zum Transfer verschiedener Gene nutzen zu können, werden REP und CAP entfernt und durch ein Transgen ersetzt. Lediglich die beiden invertierten terminalen Repetitionen (ITR), welche 4% des viralen Genoms ausmachen, werden für die Verpackung und Replikation benötigt. Voraussetzung ist, dass dem Vektorplasmid REP und CAP zur Verfügung gestellt werden. Dies geschieht durch ein Helferplasmid, welches keine ITR enthält [Blouin *et al.*, 2004].



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Funktionsweise von AAV-Vektoren. Lediglich die für die Verpackung und Replikation benötigten ITRs werden belassen, REP und CAP werden durch das gewünschte Gen ersetzt.

## Serotypen

Die Adeno-assoziierten Viren wurden erstmals 1965 als Kontamination von Adenovirus-Präparaten entdeckt, nach welchen sie benannt wurden [Atchison *et al.*, 1965]. Bis heute wurden 14 Serotypen beschrieben, nämlich AAV-1 – AAV-12 sowie AAV-mo.1 und AAV-ra.1, wobei AAV-2 mit Abstand am besten verstanden wird. Bis auf AAV-mo.1 sind alle Serotypen in der Lage, humane Zellen *in vitro* zu transduzieren. Die bekannten Serotypen 2, 3 und 5 wurden aus humanem Gewebe isoliert [Bantel-Schaal and zur Hausen, 1984; Blacklow *et al.*, 1967; Tobiasch *et al.*, 1994] und von der zentralen Kommission für biologische Sicherheit (ZKBS) in die Risikogruppe 1 (S1) eingeteilt, da ihnen keine Pathogenität nachgewiesen werden konnte [Buning *et al.*, 2004; Monahan and Samulski, 2000]. Der neuere AAV-9 wurde zwar auch aus humanem Gewebe isoliert, da jedoch über seine Verbreitung und eine Assoziation mit Krankheitssymptomen wenig bekannt ist, wird er in die Risikogruppe 2 eingeteilt. Ebenfalls in die Risikogruppe 2 eingeteilt werden die Serotypen 1, 4, 6, 7, 8, 10 und 11, da diese aus Affen isoliert wurden und nicht sicher von einer Apathogenität ausgegangen werden kann. Die jeweiligen Serotypen besitzen eine unterschiedliche Zusammensetzung der Kapsidproteine, weshalb sie verschiedene Oberflächenrezeptoren für den Zelleintritt verwenden [Hacker *et al.*, 2005]. Das erklärt, warum bestimmte Gewebearten von einigen Serotypen besser transduziert werden als andere. Mittlerweile wurden zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien durchgeführt um die Effizienz der einzelnen AAV-Serotypen bei der Transduktion verschiedener Gewebearten zu testen und die jeweiligen Rezeptoren für die Zellaufnahme zu benennen. Am besten erforscht ist hierbei AAV-2, bei den neueren Serotypen sind noch nicht alle Mechanismen aufgeklärt.

Von den bisher beschriebenen Serotypen unterscheidet man die sogenannten Pseudoserotypen, bei welchen das Genom und das Kapsid von unterschiedlichen Serotypen kombiniert werden. Bei der Produktion von Vektoren verwendet man fast ausschließlich das rekombinante AAV-2 Genom, da man von diesem Serotyp zum ersten Mal infektiöse Klone generieren konnte, und kombiniert es mit dem gewünschten Kapsid. Die Vorteile hierbei sind, dass potentielle Einflüsse serotypspezifischer ITR-Strukturen eliminiert werden und die bereits bekannten und

establierten Transgenplasmide auf AAV-2 Basis weiterverwendet werden können. Zudem stellt es eine Möglichkeit dar, trotz bestehender Seropositivität gegen AAV-2 eine erfolgreiche Transduktion durchzuführen. Rekombinante Pseudoserotypen mit AAV-2 ITR-Struktur werden von der ZKBS in die Risikogruppe 1 eingeteilt. Der in unseren Versuchen verwendete Vektor war ein Hybrid aus transgenem AAV-2 Genom und AAV-9 Kapsid (rAAV-2/9).

### **Replikationszyklus**

Als Dependovirus ist das AAV auf eine Koinfektion mit einem Helfervirus angewiesen, damit es sich reproduzieren und in die sogenannte lytische Phase eintreten kann. Als Helferviren fungieren das Herpes Simplex Virus (HSV), Papillomaviren, Humane Herpes Viren Typ 6 (HHV-6), Zytomegalieviren und Adenoviren. Beschrieben wurde jedoch auch, dass die Funktion der Helferviren durch chemische oder physikalische Noxen teilweise ersetzt werden kann. In Abwesenheit von Helferviren tritt das AAV in die latente Phase ein und integriert sich in das Wirtsgenom. Dies geschieht in ungefähr 70% der Fälle an dem als AAVS1 bekannten Lokus 19q13.3-qter auf Chromosom 19 [Bernd, 1990; Bernd *et al.*, 1988].

### **Infektionsbiologie**

Die Infektion einer Zelle durch AAV ist ein mehrstufiger Prozess, wobei nicht für jeden Serotypen die genauen Mechanismen bekannt sind. Am besten untersucht ist der Vorgang für AAV-2. Der Eintritt in die Zelle erfolgt über Rezeptor-vermittelte Endozytose, im Durchschnitt berührt der Virus 4,4 Mal die Zelloberfläche, bevor er an seinen Primärrezeptor andockt [Seisenberger *et al.*, 2001]. Dieser ist für AAV-2 Heparan Sulfat Proteoglykan (HSPG) [Summerford and Samulski, 1998]. Studien über die Kapsid-Rezeptor-Interaktion haben gezeigt, dass neben dem Primärrezeptor auch Korezeptoren notwendig sind, damit der Virus aufgenommen werden kann. Für den AAV-2 sind dies der Fibroblast-Growth-Factor-Receptor 1, der Hepatocyte-Growth-Factor Receptor sowie das avß5 Integrin [Buning *et al.*, 2003; Kashiwakura *et al.*, 2005; Qing *et al.*, 1999]. Inzwischen wurden für viele andere Serotypen die Primär- und Korezeptoren identifiziert, über die Rezeptoren des noch relativ neuen und von uns verwendeten AAV-9 Kapsids ist bis heute allerdings wenig bekannt.

Einmal aufgenommen, findet der intrazelluläre Transport vermutlich in Endosomen statt. Bisher wurden mindestens fünf verschiedene endosomale Transportwege für Adeno-Assoziierte-Viren beschrieben, aber wann und wie die Endosomen verlassen werden ist noch nicht vollständig geklärt und hängt vermutlich vom Zelltyp ab [Buning et al., 2008]. Sicher ist jedoch, dass durch die Ansäuerung der Endosomen eine Konformationsänderung des viralen Kapsids getriggert wird. Dadurch werden zuvor versteckte Regionen, wie der N-Terminus des VP1, freigelegt und dienen somit wahrscheinlich der Freilassung aus den Endosomen. Sobald sie freigelassen wurden, werden sie durch Ubiquitinierung für den Abbau in den Proteasomen markiert. Bevor dies geschieht, muss das virale Genom in den Zellkern gelangen (Abb. 4). Der genaue Vorgang, insbesondere die Frage, ob die Enkapsidierung im Zytosol oder im Zellkern stattfindet, ist immer noch Gegenstand der aktuellen Forschung und hat bisher zu zum Teil kontroversen Ergebnissen geführt. Einerseits haben einige Forschungsgruppen intakte virale Partikel im Zellkern nachweisen können und auch ein intranukleär applizierter Antikörper gegen das AAV-Kapsid konnte eine effektive Transduktion verhindern. Andererseits wurde das Eindringen viralen Kapsids in den Nukleus als seltenes Ereignis beschrieben und bei geringer Viruslast konnte lediglich das AAV-Genom im Zellkern detektiert werden [Buning et al., 2008]. Einmal im Nukleus angekommen, entscheidet die Anwesenheit eines Helferviruses darüber, ob das AAV in einen latenten oder lytischen Replikationszyklus eintritt (siehe oben).

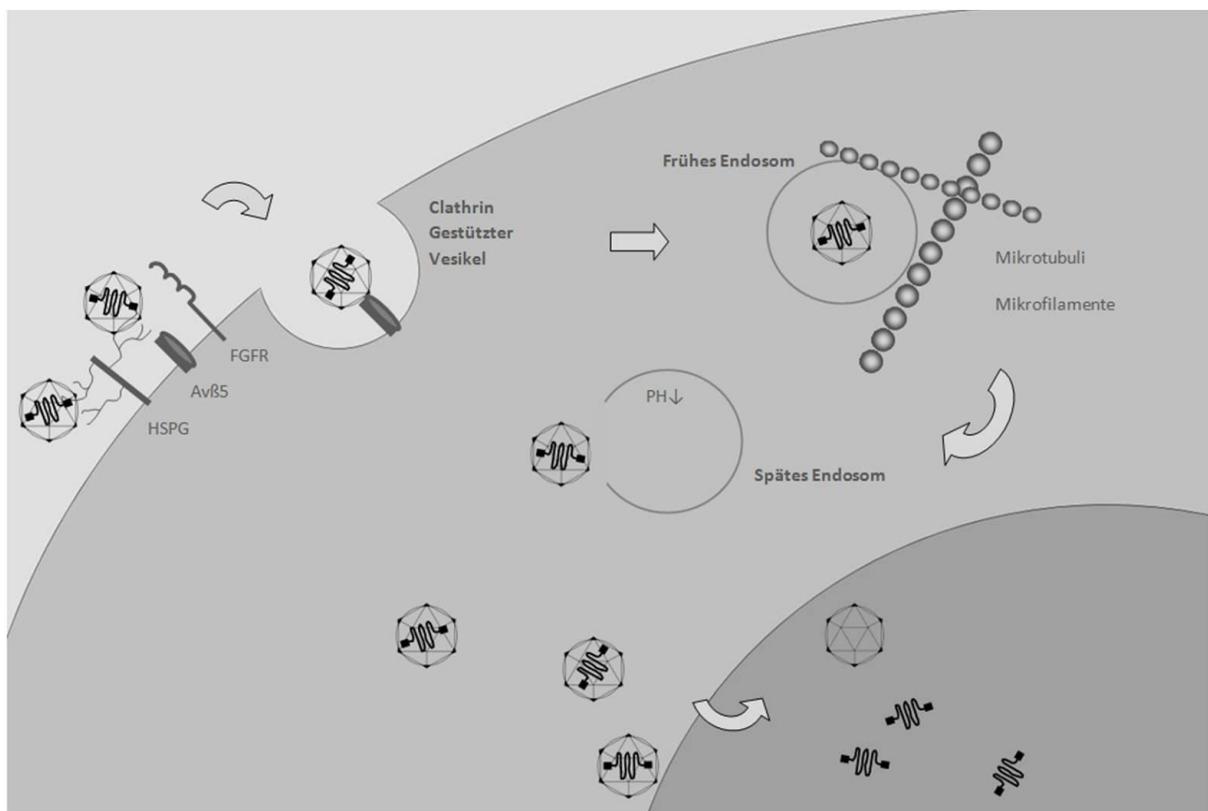


Abbildung 4: Infektionsbiologie am Beispiel von AAV-2. Modifiziert nach [Buning et al., 2008].

### 1.3.3 Markergene

Marker- oder Reportergene sind Gene oder Genfragmente, mit dessen Hilfe sich andere Gene qualitativ oder quantitativ nachweisen lassen. In unseren Versuchen verwendeten wir ausschließlich das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen um Aussagen zum Transduktionserfolg und zum Myotropismus des verwendeten Vektors treffen zu können.

#### $\beta$ -Galaktosidase-Gen (LacZ)

Als  $\beta$ -Galaktosidasen werden Enzyme bezeichnet, welche in allen Lebewesen vorkommen und die endständige Hydrolyse von Polysacchariden wie Gangliosiden, Glycoproteinen und Glycosaminoglycanen katalysieren. Molekularbiologisch wird vor allem das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen aus dem Lac-Operon von Escherichia Coli (LacZ) als Markergen verwendet, da es in der Lage ist, 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-

galactopyranosid (X-Gal) in Galaktose und in einen wasserunlöslichen, blauen Indigo-Farbstoff zu spalten, welcher die LacZ-Genexpression anzeigt [Eustice *et al.*, 1991; Olesen *et al.*, 2000].

### **1.3.4 Therapeutische Gene**

Als therapeutische Gene werden im Folgenden diejenigen Gene oder Genprodukte bezeichnet, welche durch ihre Expression im xenogenen Transplantationsmodell durch antiinflammatorische, immunsuppressive oder neovaskulogenetische Mechanismen potentiell positive Effekte auf das Transplantatüberleben oder die Transplantatfunktion haben.

#### **PD-L1**

Der PD-1 (Programmed Death) Rezeptor gehört zur Ig-Familie und wirkt über eine Interaktion mit dem entsprechenden Liganden (PD-L1) hemmend auf die T-Zell Aktivierung und Proliferation. Es wird vermutet, dass diese Interaktion eine wichtige Rolle in der Selbst-Toleranz spielt. Bisher durchgeführte Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit dem Einfluss einer erhöhten PD-L1 Expression auf Tumorzellen, welche daraufhin seltener durch zytotoxische T-Zellen angegriffen wurden [/wai *et al.*, 2002]. Eines unserer Ziele bestand darin herauszufinden, ob eine Überexpression von PD-L1 auf porcinen Kardiomyozyten nach heterotoper Xenotransplantation eine Toleranzentwicklung im Sinne einer verminderten T-Zell Aktivierung induziert.

#### **Thymosin $\beta$ 4**

Als Thymosine wird eine Gruppe an Polypeptiden bezeichnet, welche erstmals in Thymusgewebe von Rindern nachgewiesen werden konnte. Die 40 - 44 Aminosäuren langen Polypeptide werden entsprechend ihres isolektrischen Punktes in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Thymosine eingeteilt [Low *et al.*, 1979]. Das mit Abstand bedeutendste und zurzeit am intensivsten erforschte Thymosin ist Thymosin  $\beta$ 4 (TB4), welches 1966 erstmalig von Goldstein und White beschrieben wurde [Goldstein *et al.*, 1966; Low *et al.*, 1981]. Heute wissen wir, dass TB4 in allen

Säugetieren und vielen Nicht-Säugetieren fast ubiquitär intrazellulär in Konzentrationen von 0,3 - 0,4 mM vorhanden ist und 70 - 80% aller Thymosine stellt [Huff *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 1992]. NMR (Nuklear-Magnet-Resonanz) - Studien haben gezeigt, dass TB4 in wässriger Lösung hauptsächlich unstrukturiert vorliegt und keine definierte Sekundärstruktur aufweist. Dies änderte sich bei Zugabe von fluoriertem Alkohol und es konnte unter diesen Bedingungen festgestellt werden, dass TB4 ein eher gestrecktes Molekül von 5nm Länge ist [Zarbock *et al.*, 1990].

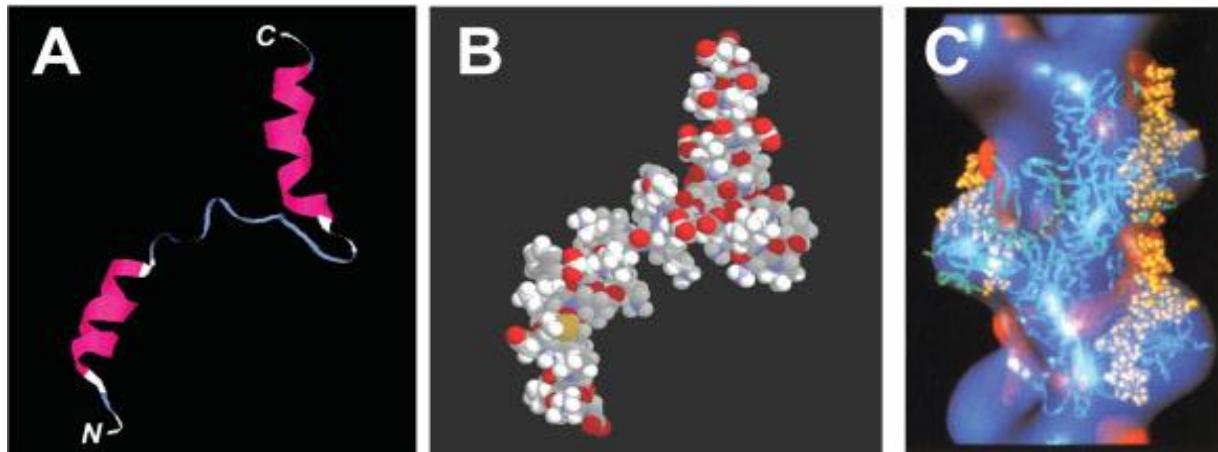


Abbildung 5: TB4-Struktur. A und B nach [Zarbock *et al.*, 1990], C nach [Ballweber *et al.*, 2002]. Modifiziert nach [Mannherz and Hannappel, 2009]

Thymosin  $\beta$ 4 wurden zahlreiche Funktionen nachgewiesen. Mittlerweile ist bekannt, dass TB4 wertvolle Aufgaben sowohl extrazellulär, intrazellulär, als auch intranukleär übernimmt und somit vor allem dank seiner regenerativen und antientzündlichen Eigenschaften von Forschungsgruppen verschiedenster Fachrichtungen verwendet wird. Einen Überblick über die wichtigsten Funktionen und Mechanismen von TB4 gibt die folgende Tabelle.

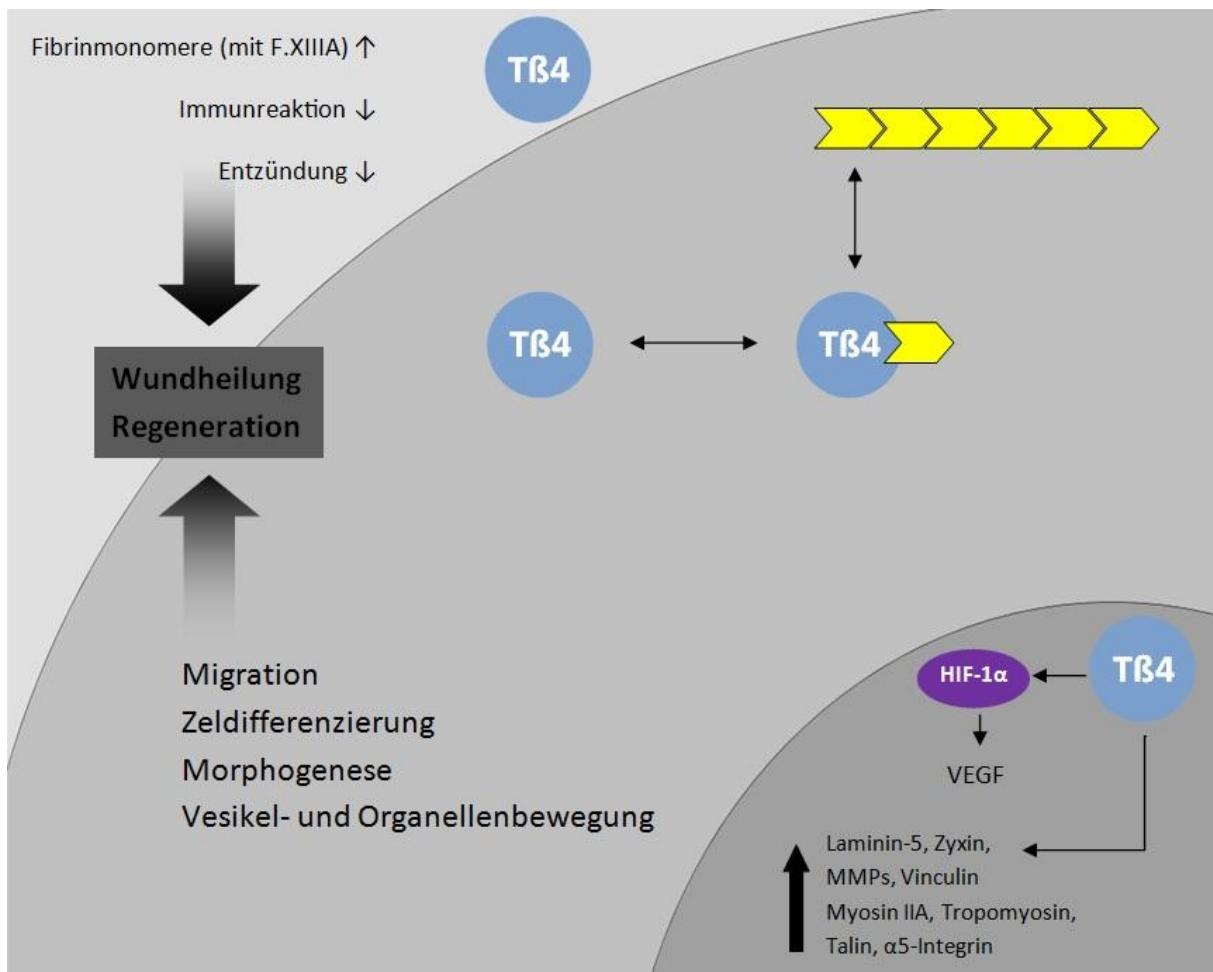
Aktivität/Eigenschaft	Wichtig für	Referenzen
<b>Aktin-Bindung</b>	Zellform und Migration, Viskositätsverminderung im CF-Sputum	[Goldstein <i>et al.</i> , 2005; Malinda <i>et al.</i> , 1997; Mannherz and Hannappel, 2009]
<b>Migration</b>	Wundheilung (Re-Epithelisierung), Organ- und Blutgefäßformation	[Cha <i>et al.</i> , 2003; Kobayashi <i>et al.</i> , 2002; Malinda <i>et al.</i> , 1997; Qiu <i>et al.</i> , 2007; Roy <i>et al.</i> , 2001; Sosne <i>et al.</i> , 2002a]
<b>Angiogenese</b>	Wundheilung, Organformation, Nervenwachstum, Gewebeüberleben	[Grant <i>et al.</i> , 1995; Li <i>et al.</i> , 2007; Philp <i>et al.</i> , 2003; Smart <i>et al.</i> , 2007]
<b>Antiinflammatorisch</b>	Reduziert Schwellungen, Schmerzen, Gewebeschaden, Tod (während des septischen Schocks)	[Badamchian <i>et al.</i> , 2003; Sosne <i>et al.</i> , 2002b; Young <i>et al.</i> , 1999]
<b>Antia apoptotisch</b>	Verhindert Zelltod durch Infektionen, Toxine oder verminderte Blutversorgung	[Badamchian <i>et al.</i> , 2003; Bock-Marquette <i>et al.</i> , 2004; Popoli <i>et al.</i> , 2007; Sosne <i>et al.</i> , 2004a]
<b>Antimikrobiell</b>	Verhindert bakterielle Infektionen und Zellschaden	[Huang <i>et al.</i> , 2007]
<b>Wundheilung</b>	Haut, Cornea und Herz	[Bock-Marquette <i>et al.</i> , 2004; Goldstein <i>et al.</i> , 2005; Philp <i>et al.</i> , 2003; Sosne <i>et al.</i> , 2001]
<b>Antifibrotisch</b>	Verhindert Narbenbildung und Gewebeschaden	[Cavasin, 2006]
<b>Stammzell differenzierung</b>	Wundheilung, Haarwachstum, Herzregeneration, fördert Stammzell Maturation	[Goldstein <i>et al.</i> , 2005; Philp <i>et al.</i> , 2004b; Smart <i>et al.</i> , 2007]

**Tabelle 1:** TB4 Schlüsselfunktionen, modifiziert nach [Philp and Kleinman, 2010]

Wichtige Funktionen, wie z.B. die Zellmigration, Zelldifferenzierung oder die Organogenese, ermöglicht Thymosin  $\beta$ 4 durch seine Fähigkeit, G-Aktin im Verhältnis 1:1 zu binden und so die Bildung von Aktin-Polymeren zu verhindern [Hannappel and Leibold, 1985; Low *et al.*, 1981; Safer *et al.*, 1991] (Abb. 1C). Da in den meisten Zellen monomeres G-Aktin und polymeres F-Aktin in gleichen Mengen vorhanden ist, wird vermutet, dass TB4 für die hohe Konzentration an Aktinmonomeren

mitverantwortlich ist, welche in ruhenden Zellen beobachtet wurde. Intranukleär fungiert TB4 als Transkriptionsfaktor, der für das Zytoskelett wichtige Proteine hochreguliert und somit weitere notwendige Voraussetzungen für die Zellmigration erfüllt. Diese Proteine sind unter anderem Myosin IIa,  $\alpha$ -actinin, tropomyosin, talin,  $\alpha 5$ -integrin, vinculin and zyxin, sowie Komponenten der extrazellulären Matrix wie laminin-5 als auch Matrix Metalloproteininasen [Golla *et al.*, 1997; Moon *et al.*, 2006; Sosne *et al.*, 2005; Sosne *et al.*, 2004b]. TB4 kommt auch extrazellulär vor. Mit einer Plasmakonzentration von 0,03 - 0,4 mg/L [Hannappel and van Kampen, 1987], das entspricht einem Prozent der gesamten TB4-Menge im Blut, ist Thymosin  $\beta$ 4 an der Blutgerinnung beteiligt: Nachdem es aus aggregierten Thrombozyten sezerniert wird bildet es mit Hilfe von Faktor XIIIa teilweise Querverbindungen mit Fibrin [Huff *et al.*, 2002]. Außer im Plasma wurde TB4 auch in Speichel- [Inzitari *et al.*, 2009], Tränen- [Badamchian *et al.*, 2007] und Wundflüssigkeit [Bodendorf *et al.*, 2007] nachgewiesen, wo es einige für die Inflammation wichtige Chemokine und Zytokine wie TNF- $\alpha$  herunter reguliert. Extern appliziert, konnte TB4 so z.B. deren entzündlichen Einfluss auf Epithelzellen der Kornea *in vitro* verhindern [Sosne *et al.*, 2007; Sosne *et al.*, 2005; Sosne *et al.*, 2006]. Besonders hervorzuheben sind jedoch die Effekte, welche Thymosin  $\beta$ 4 auf das Herz besitzt, da diese für die von uns durchgeführten Versuche von Nutzen sein sollten:

Ein kardioprotektiver Effekt beruht vermutlich darauf, dass TB4 die Komplexbildung zwischen ILK (Integrin-linked Kinase) und PINCH fördert, was in Kardiomyozyten eine Konzentrationserhöhung der Kinase Akt zur Folge hat, welche das Zellüberleben fördert und somit resistenter gegenüber Ischämie macht [Bock-Marquette *et al.*, 2004; Kupatt *et al.*, 2008; Sosne *et al.*, 2007]. Des Weiteren fördert Thymosin  $\beta$ 4 die Vaskulogenese. Studien legen nahe, dass TB4 vom Myokard aus parakrin auf epikardiale Zellen wirkt [Hinkel *et al.*, 2008; Smart *et al.*, 2007]. Sogenannte EPDCs (Epicardium-derived Progenitor Cells = Vorläuferzellen epikardialen Ursprungs) wandern vom Epikard aus in das Myokard ein (EMT = Epithelial to Mesenchymal Transition) und differenzieren sich dort entweder mithilfe von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und bFGF (Fibroblast Growth Factor) zu Endothelzellen oder mithilfe von PDGF (Platelet Derived Growth Factor) und TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor) zu glatten Muskelzellen.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der insbesondere für die Wundheilung wichtigen intra- und extrazellulären Funktionen von TB4. Im Zellkern fungiert TB4 als Transkriptionsfaktor und reguliert so v.a. wichtige Zellstrukturproteine. Diese werden benötigt für Funktionen wie z.B. die Migration, welche durch die Aktin-Bindungsfähigkeit von TB4 im Zellplasma beeinflusst wird. Extrazellulär hat Thymosin  $\beta$ 4 unter anderem antientzündliche Eigenschaften und unterstützt mit Hilfe des Gerinnungsfaktors XIIIa die Bildung von Fibrinmonomeren.

Die Ergebnisse zahlreicher präklinischer Studien bezüglich der vielfältigen Wirkungen von TB4 sind überwiegend positiv: Neben den bereits erwähnten antiapoptotischen, antiinflammatorischen und angiogenetischen Eigenschaften wurden auch Effekte auf die Wundheilung [Fine, 2007; Philp et al., 2003; Sosne et al., 2002a; Sosne et al., 2005], das Haarwachstum [Philp et al., 2004a; Philp et al., 2004b] und die neuronale Regenerationsfähigkeit [Popoli et al., 2007; J Zhang et al., 2009] festgestellt. Aufgrund der vielversprechenden Datenlage werden deshalb

momentan einige multizentrische Phase II Studien durchgeführt, welche unter anderem die Effekte von TB4 nach ST-Hebungs-Infarkt (STEMI), Schlaganfall, Rückenmarksverletzung, zudem bei Bandscheibendegeneration, septischem Schock, Mukoviszidose und Multipler Sklerose untersuchen [<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=thymosin>, 2011]. Jedoch gibt es in der Literatur noch keine Angaben über eine Studie, welche die Verwendung von Thymosin  $\beta$ 4 im Rahmen der Organtransplantation beschreibt, weshalb dies im Zuge dieser Arbeit näher erforscht werden soll.

### 1.3.5 Transplantatabstoßung

Bei einer Allo- oder Xenotransplantation wird dem Immunsystem des Organempfängers fremdes Gewebe präsentiert. Den größten Einfluss haben hierbei die MHC-Moleküle (Major Histocompatibility Complex), beim Menschen auch HLA (Human Leukocyte Antigen) genannt. Sie können direkt oder indirekt durch das Immunsystem erkannt werden. Auf direktem Weg, wenn gewebsständige antigenpräsentierende Zellen (APC) des Spenders MHC-Moleküle an ihrer Oberfläche tragen oder indirekt, durch Expression von Spender-Peptidfragmenten seitens der Empfänger-APC [Dong et al., 1999]. Die resultierende Immunantwort wird sowohl durch B- als auch durch T-Lymphozyten vermittelt. T-Lymphozyten sind hauptsächlich verantwortlich für die zelluläre Immunreaktion, welche bei der akuten Abstoßungsreaktion eine große Rolle spielt. Wohingegen die humorale Immunantwort (mittels Antikörper), die Teil der akuten und chronischen Abstoßung ist, durch B-Lymphozyten vermittelt wird. Des Weiteren sind bei der Abstoßung und somit der Schädigung des Transplantats auch Makrophagen, natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Lymphozyten beteiligt. Einen Überblick über die verschiedenen Formen der Abstoßung und den zugrunde liegenden Mechanismen gibt die folgende Tabelle.

Abstoßung	Zeitraum	Mechanismus	Quellen
<b>Hyperakut</b>	Innerhalb weniger Minuten	Präformierte Antikörper des Empfängers reagieren mit dem Endothel des Spenderorgans, woraufhin es durch die Aktivierung des Komplementsystems zu einer massiven Koagulation mit nachfolgend ischämischen Nekrosen kommt.	[Bu et al., 2011; del Rio et al., 2008]
<b>Akzeleriert</b>	Stunden bis Tage	B- und T-Zell vermittelt. Zugrunde liegt eine vorangegangene Sensibilisierung durch Bluttransfusionen, Schwangerschaften oder Organtransplantationen. Es kommt zu fibrinösen Ablagerungen und einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten.	[Jin et al., 2011; Y Zhang et al., 2010]
<b>Akut</b>	Innerhalb weniger Tage	Vor allem T-Zell vermittelt, aber teilweise sind auch Antikörper beteiligt. Durch die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und die Expression von Zytokinen kommt es zu einer zellulären Infiltration des Transplantats von u.a. Makrophagen und T-Zellen, was zu Ödemen und Nekrosen führt.	[Loke and Allison, 2003]
<b>Chronisch</b>	Monate bis Jahre	Der genaue Pathomechanismus dieser auch als Transplantatvaskulopathie bezeichneten Reaktion ist nicht genau bekannt. Der Einfluss verschiedener immunologischer und nicht-immunologischer Faktoren führt zu einer Gefäßwandentzündung und einer Proliferation der glatten Muskelzellen und mündet schließlich in einer Intimaproliferation mit konsekutiver Lumenverengung.	[Butte et al., 2007; Keir et al., 2008; Yang et al., 2008]

**Tabelle 2:** Auflistung der Abstoßungsformen sortiert nach ihrem zeitlichen Auftreten

Die hyperakute Abstoßungsreaktion kann in der Xenotransplantation seit kurzem durch die Verwendung von transgenen Spenderorganen verhindert werden. Indem bestimmte Spendergene inaktiviert werden („knock out“) oder zusätzliche Gene exprimiert („knock in“), kann die Immunantwort des Organempfängers entsprechend beeinflusst werden. Da in nicht-humanen Primaten Antikörper gegen porcine Galα1,3Gal Antigene vorhanden sind, konnte die Verwendung von α1,3-

Galaktosyltransferase defizienten Schweinenherzen (Gal-KO) zur heterotopen Transplantation in Paviane die hyperakute Abstoßungsreaktion verhindern und ein Transplantatüberleben von sechs Monaten erreicht werden [Kolber-Simonds *et al.*, 2004; Kuwaki *et al.*, 2005; Phelps *et al.*, 2003; Tseng *et al.*, 2005]. Das bei diesen Versuchen beobachtete Auftreten von thrombotischen Mikroangiopathien, verursacht vermutlich durch die sekundäre Gefäßendothelaktivierung mittels anti-nicht-Gal Antikörper und Komplementfaktoren, könnte durch die zusätzliche Expression eines oder mehrerer humaner komplementregulatorischer Proteine, wie hCD46 (Membran Kofaktor Protein, MCP) oder hCD55 (Decay Accelerating Factor, DAF) verhindert werden [Cooper *et al.*, 2008; Houser *et al.*, 2004].

Um den Schweregrad der akuten Abstoßungsreaktion einheitlich klassifizieren zu können, wurde von der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) im Jahr 1990 ein Bewertungssystem eingeführt, welches sich an der Histologie eines aus dem Herzen entnommenen Biopsats orientiert [Nakazawa *et al.*, 2004]. Aktuell wurde nun auch eine entsprechende Klassifikation für die chronische Transplantatabstoßung entwickelt [Yamazaki *et al.*, 2002] (Siehe Tabelle 3).

Grad ISHLT	Akut	Chronisch
<b>0</b>	Keine Abstoßung	Keine Gefäßläsion
<b>1</b>	Fokales (1A) oder spärlich diffuses Infiltrat (1B)	Angiographisch LCA-Stenose < 50 % oder ein anderer Ast < 70 % ohne Graft Dysfunktion
<b>2</b>	Ein Herd mit massiver Infiltration oder fokale Myozytenschädigung	LCA-Stenose mind. 50 % oder ein anderer Ast mind. 70 % ohne Graft Dysfunktion
<b>3</b>	Multifokale massive Infiltration (3A) oder diffuse Entzündung (3B)	ISHLT 1 oder ISHLT 2 mit zusätzlicher Graft-Dysfunktion
<b>4</b>	Diffuse massive, polymorphe Abstoßung, fakultativ Ödeme, Vaskulitis, Hämorrhagie	

**Tabelle 3:** Stadieneinteilung (vereinfacht) der ISHLT zur akuten und chronischen Transplantatabstoßung, modifiziert nach [Nakazawa *et al.*, 2004; Yamazaki *et al.*, 2002]

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Gebrauchsmaterial

#### 2.1.1 Gerätschaften

Beatmungsgerät Servo 900, Siemens, Elema, Schweden  
Blutgasanalysegerät, Chiron Diagnostics Bayer Healthcare Essex, England  
Defibrillator Sirecust 302, Siemens  
EKG Gerät Sirecust 404, Siemens, Elema, Schweden  
Infrarotleuchte  
Madrein-Draht  
Sauger  
Temperatursonde rektal  
Wärmematte

#### 2.1.2 Instrumente

Arterienklemme Kocher gerade, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Arterienklemme gerade, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Carotis Sperrer, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Haken nach Roux mittel, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Haken nach Roux groß, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Langenbeck Wundhaken, Griff vertikal zum Blatt, Aesculap AG/ B. Braun, Tuttlingen  
Metzenbaumschere, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Miculicz Klemme, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Mosquitoklemme, Jacobson, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Nadelhalter, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Overholt-Klemme, Allgaier Instrumente, Frittlingen/ Tuttlingen  
Pinzette anatomisch, mittelbreit, Aesculap AG/ B. Braun, Tuttlingen  
Pinzette chirurgisch, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Präparierklemme gebogen, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen

Präparierschere fein, gebogen, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Präparierschere fein, gerade, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Schlauchklemme, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Thoraxsperre, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Tuchklemme, gerade, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Tupferzange, BBraun, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Tupferzange, Heywood-Smith, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Volkmann Wundhaken, 4 - Zähne, scharf, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Wundhaken, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen  
Wundsperre, Aesculap AG / B. Braun, Tuttlingen

## 2.2 Verbrauchsmaterial

### 2.2.1 Medikamente

Atropinsulfat B. Braun 0,5 mg (Atropin), B. Braun Melsungen AG, Melsungen  
Bepanthen Augen- und Nasensalbe (Dexpanthenol), Bayer Vital, Leverkusen  
CellCept 500 mg Tabletten (Mycophenolat - Mofetil), Roche Pharma AG, Grenzach - Wyhlen  
CellCept Infusionslösungskonzentrat 500 mg (Mycophenolat - Mofetil), Roche Pharma AG, Grenzach - Wyhlen  
Diazepam - ratiopharm 10 mg (Diazepam), Ratiopharm, Ulm  
Fentanyl Janssen 0,5 mg (Fentanyl), Janssen Cilag, Neuss  
Isofluran - Baxter (Isofluran), Baxter, Chicago, USA  
Isopropanol 70 % (Isopropanol), Bombastus - Werke AG, Freital  
Isotone Kochsalz Infusionslösung 0,9 %, B. Braun, Melsungen  
Kardioplegielösung Custodiol, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach - Hahnlein  
Ketamin - hameln (Ketamin), 50 mg/ml, Hameln Pharma plus GmbH, Hameln  
Midazolam - ratiopharm 5 mg/1 ml (Midazolam), Ratiopharm, Ulm  
Pancuronium Inresa (Pancuroniumbromid), Inresa, Freiburg  
Prograf 0,5 mg (Tacrolimus), Axicorp Pharma GmbH, Friedrichsdorf  
Propofol 2 %, MCT Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg

Stresnil (Azaperon), Janssen Cilag GmbH, Neuss  
Temgesic (Buprenorphin), Essex Pharma GmbH, München  
Urbason 16 mg (Methylprednisolon), Aventis Pharma, Wien, Österreich  
Voluven 6 % 500 ml, Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg  
Xylocain Gel 2 % (Lidocain), Astra Zeneca GmbH, Wedel

## 2.2.2 Fäden

Ethibond Excel 2-0, Ethicon, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien  
Monocryl 3-0, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien  
Monocryl 4-0, Ethicon INC, Somerville, New Jersey, USA  
Prolene 2-0, Ethicon INC, Somerville, New Jersey, USA  
Prolene 5-0, Ethicon, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien  
Prolene 6-0, Ethicon, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien  
Vicryl 3-0, Johnson&Johnson Intl., St Stevens Woluwe, Belgien

## 2.2.3 Sonstiges

Aortic Arch Cannula, 77110 (10 French), Stöckert, Mirandola, Italien  
Arterielle Schleuse (6 French), Arrow, Erding  
Bedside test, Biotech, Dreieich  
Desinfektionslösung Kodan, Schülke&Mayr GmbH, Norderstedt  
Einfach-Dom-Set, Becton Dickinson Critical Care Systems inc., Sandy, USA  
EKG Elektroden Skintact F 40, Skintact, Innsbruck, Österreich  
Hahnbank für Infusionstherapie, B-Braun, Melsungen  
Handschuhe steril Biogel, Canute Court, Cheshire, England  
Handschuhe unsteril, Sempermed, Wien, Österreich  
Infusionsgerät, V86-P-R, 43.4357, Codan, Lensahn  
i.v. Katheter, Braunüle 18 G, 20 G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen  
Kauterelektrode, Valleylab, Boulder, USA  
Leukoplast, BSN medical GmbH&Co KG, Hamburg  
Mullbinden Nobagaze, Noba Verbandsmittel Danz GmbH, Wetter

Multi-Adapter, Sarstedt, Nürnbrecht  
Nadel BD Microlance 3 (20G 1,5“, 25G 1“), Becton Dickinson GmbH, Fraga, Spanien  
Neutralelektrode Poly Hesive, Tyco Healthcare UK Ltd., Valleylab, USA  
OP Gesichtsmasken Surgine, Mölnlycke Healthcare Inc., Newtown, USA  
Perfusorleitung, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg  
Pflaster, Ethicon GmbH, Norderstedt  
Saugeraufsatz, REF KEX 80, Cardinal Health, McGaw Park, USA  
Serum Röhrchen weiß, rot, grün, Sarstedt, Nürnbrecht  
Skalpell No.11, Feather Safety Razor CO LTD, Osaka, Japan  
Skalpell No.22, Feather Safety Razor CO LTD, Osaka, Japan  
Spritze 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, Becton Dickinson SA, Fraga, Spanien  
Spritze 100 ml, Medi Syst, Rheinstetten  
Sprühpflaster Band Aid, Johnson&Johnson  
Ssniff® Schweine-Standarddiät, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest  
Sterile Abdeckung grün Secu Drape, Sengewald Klinikprodukte, Rohrdorf-Thansau  
Sterile Abdeckung Convertors, Cardinal Health, McGaw Park, USA  
Sterile Mullkompressen, Noba Verbandmittel Danz GmbH, Wetter  
Tubus orotracheal 5,0 mm, Hi-Lo Lanz, Mallinkrod Medical, Athlone, Ireland  
Unsterile Kompressen, Verbandmittel Danz GmbH, Wetter  
Venous Arch Cannula (10 French), V123-10, Stöckert, Mirandola, Italien  
Waschlösung Baktolin basic, Bode Chemie, Hamburg  
Wundverband Cutiplast steril, Beiersdorf AG, Hamburg

## 2.3 Perfusionssystem

### 2.3.1 Materialien

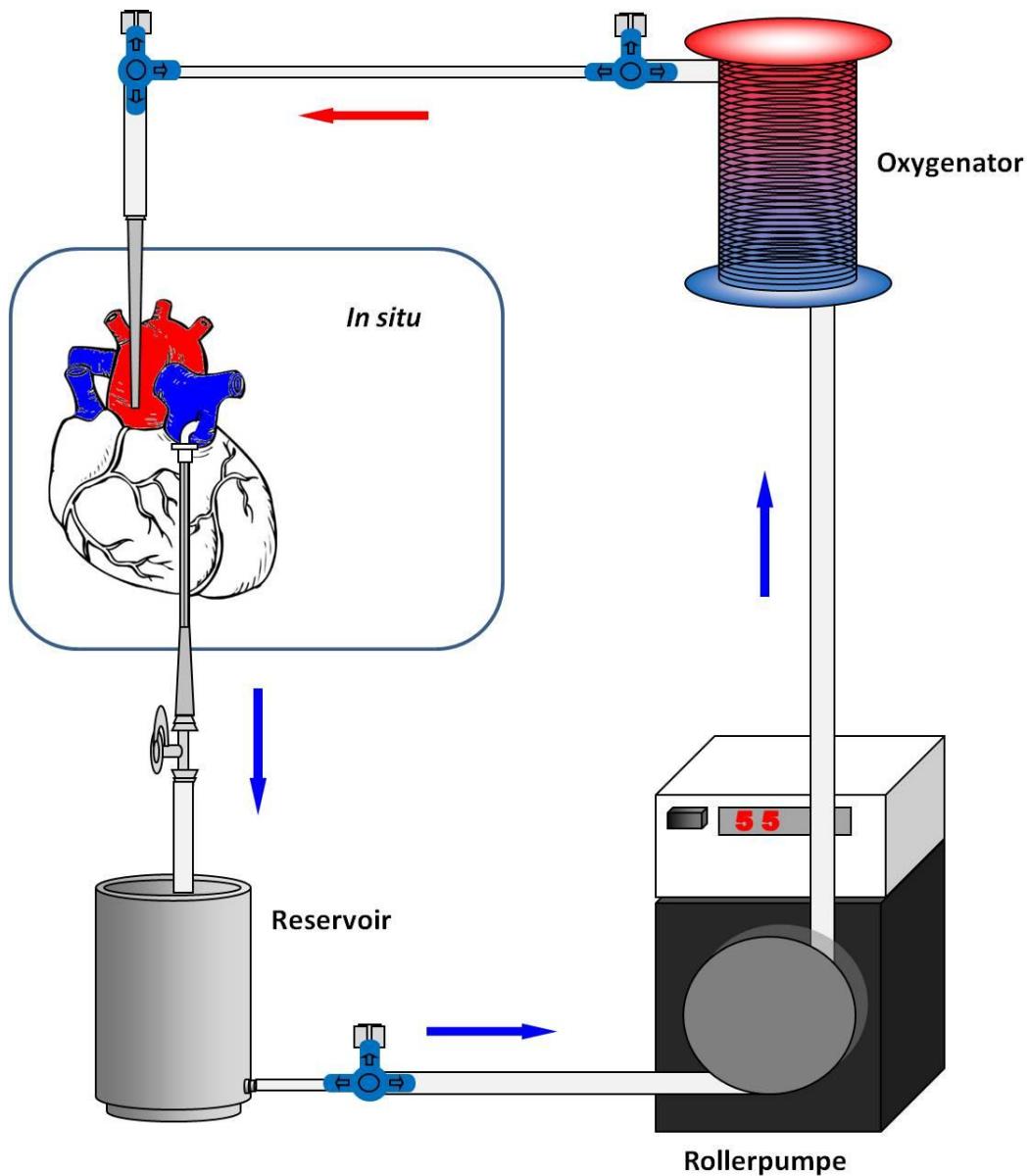
Dreiwegehahn Discofix, B Braun Melsungen AG, Melsungen  
Kombistopper, B. Braun Melsungen AG, Melsungen  
Oxygenator D902, Lilliput2, Cobe Cardio-vascular Inc, Arvada, CO, USA

---

Reservoir (Durchmesser 7 cm, Höhe 14 cm), Edelstahl, Eigenbau  
Rollerpumpe MCP, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz  
Schlauchverlängerungen Silikon, Raumedic-ECC, Rehau AG & Co, Rehau

### **2.3.2 Aufbau**

Das *in-situ* Langendorff Perfusionssystem stellt eine Weiterentwicklung einer erstmals von Oskar Langendorff entwickelten Methode dar. Dieser zeigte im Jahr 1885 anhand von Froschherzen, dass durch die Perfusion einer Nährlösung retrograd über die Aorta eine anhaltende kardiale Kontraktion möglich ist, indem der Herzmuskel über die Koronararterien versorgt wird. Dies System wurde in dem Walter-Brendel-Zentrum für chirurgische Forschung in München von E. Thein und L. Burdorf [Burdorf *et al.*, 2007] weiterentwickelt und in der in unseren Versuchen verwendeten Form von A. Schulz im Rahmen ihrer Dissertation im Detail beschrieben [Schulz, 2009]. Das Perfusionssystem ermöglicht es uns, Schweineherzen ohne vorherige Kardioplegie mit einem definierten Perfusionsdruck und einem geringen Blutvolumen von etwa 500 ml unter normothermen, normoxämen Bedingungen zu perfundieren. Da dies, obwohl das Herz vollkommen autark vom Torso des Schweines schlägt, im Thorax geschieht, wurde das System „*in situ* Langendorff - Perfusionssystem“ genannt.



**Abbildung 7:** Schematischer Aufbau des *in-situ* Langendorff Perfusionssystem. Über die venöse Kanüle gelangt das Blut in ein gewärmtes Reservoir, bevor es mittels einer Rollerpumpe durch einen Oxygenator geführt wird und letztendlich unter normothermen, normoxämen und normotonen Bedingungen die Aorta erreicht.

## 2.4 Versuchstiere

Alle Tierschutzversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Als Versuchstiere wurden Schweine der deutschen Landrasse, CD46/Gal-KO-doppeltransgene Schweine der Rasse White Large und Munich-Mini-Pigs verwendet. Alle Tiere stammen vom Lehr- und Versuchstiergut der Ludwig-Maximilians-Universität zu München in Oberschleißheim. Die Tierhaltung fand in geeigneten Gehegen am Walter-Brendel-Zentrum für chirurgische Forschung in München statt und erfolgte unter Berücksichtigung aller Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes. Alle verwendeten Versuchstiere erhielten eine Ferkeldiät (ssniff® Schweine-Standarddiät) und Wasser ad libitum. Betreut wurden sie durch ausgebildete Versuchstierpfleger und durch die an dem Projekt beteiligten Tierärzte.

## 2.5 Versuchsdurchführung

### 2.5.1 Narkoseführung

Die Narkoseeinleitung erfolgte bereits im Tierstall. Dazu wurde den Tieren intramuskulär 10 mg/kg KG Ketamin, 10 mg/kg KG Azaperon, 5 - 10 mg Midazolam und 0,5 mg Atropin injiziert. Sobald die sedierende Wirkung der Medikamente eingesetzt hatte, erfassten wir das Gewicht der Schweine und rasierten, sofern eine starke Behaarung vorhanden war, das Operationsgebiet. Danach erst erfolgte unter Oxygenierung und pulsoxymetrischer Überwachung der Transport in den Operationsraum, wo wir zuerst einen venösen Zugang über eine Ohrvene etablierten. Über diesen applizierten wir einen Bolus von 1,5 - 2,5 mg/kg KG Propofol und 0,1 mg Fentanyl bevor wir die endotracheale Intubation durchführten und die kontrollierte maschinelle Beatmung über ein Beatmungsgerät (Servo 900, Siemens) starteten. Die Narkose wurde durch die intravenöse Gabe von 8 - 12 mg/kg KG/h Propofol mittels Perfusor und Fentanyl-Boli aufrecht erhalten. Die Narkosetiefe und

die Vitalparameter überwachten wir mit einem 3-Kanal EKG (Sirecust 404, Siemens), einem Pulsoxymeter, einer invasiven Messung des Blutdrucks sowie einem Kapnometer zur Erfassung der end-tidalen CO<sub>2</sub>-Konzentration. Des Weiteren wurden durch regelmäßige Blutgasanalysen die arteriellen Partialdrücke an Sauerstoff und CO<sub>2</sub>, die Konzentrationen an Natrium, Kalium, Kalzium, Glukose, Lactat, Natriumbikarbonat und Hämoglobin sowie der Hämatokrit und der Base Excess (BE) gemessen. Durch die frühe Narkoseinduktion konnte der Stress für die Tiere möglichst gering gehalten werden.

## 2.5.2 Operationstechniken

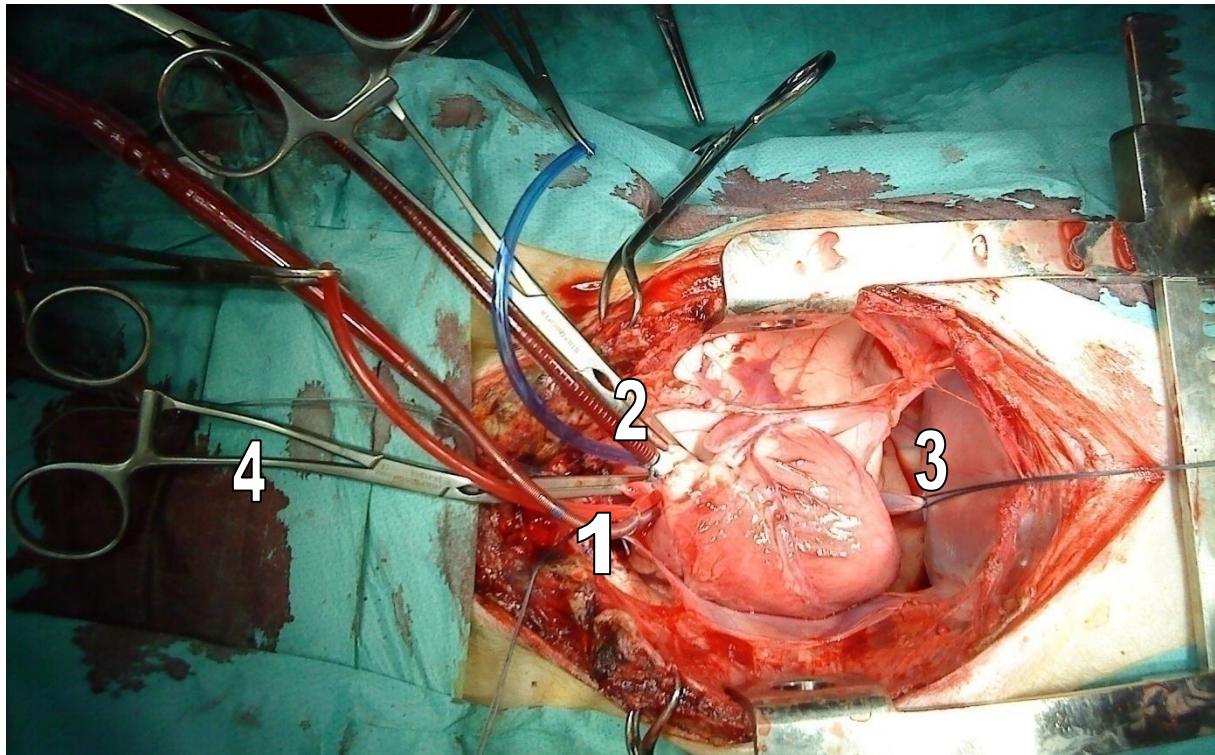
Alle Operationen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Dazu rasierten wir zunächst großzügig das Operationsgebiet, reinigten es mit Jod-Lösung und klebten es mit sterilen Papiertüchern ab.

### Operation der Spendertiere

Zuerst erfolgte die Anlage eines arteriellen Zugangs, um Blutgasanalysen und eine invasive Blutdruckmessung durchführen zu können. Dazu setzten wir mit einem Skalpell der Größe 22 einen Hautschnitt medial des M. sternokleidomastoideus und legten mit einer Overholt-Klemme stumpf die Arteria carotis externa frei. Das Operationsgebiet wird hierbei durch einen Chicago-Hautspreizer offen gehalten. Mittels einer Overholt-Klemme wurde die Arterie mit zwei Ligaturen (Ethibond 2) umschlungen, eine Kanüle (Braunüle 18 G, Braun Melsungen AG) eingeführt und fixiert. Bevor wir die distale A. carotis externa ligierten, verabreichten wir zur Prophylaxe einer Thrombenbildung intravenös 2000 I.E. Heparin. Nach dem Spülen des Zugangs konnte das System zur invasiven Blutdruckmessung (Arterielle Schleuse 6 French, Arrow) angeschlossen werden.

Nun erfolgte die Öffnung des Thorax mittels einer medianen Sternotomie. Hierbei führten wir mit einem Skalpell (Gr. 22) einen Hautschnitt vom Xiphoid bis zum

Jugulum durch und durchtrennten das Sternum mit einer Knochenschere. Um das Operationsgebiet zu erweitern, wurde ein Thoraxspreller eingesetzt. Mit einer Präparierschere eröffneten wir das Perikard und fixierten es mit Fäden (Prolene 2-0) an beiden Seiten des Sternums, vorhandenes Thymusgewebe wurde entfernt. Um Blutverlusten in der Perfusionsphase vorzubeugen, erfolgte zudem die Ligation der Vena hemiazygos, welche im Gegensatz zum Menschen beim Schwein direkt in den rechten Vorhof mündet. Als Vorbereitung auf ihre Kanülierung und Klemmung präparierten wir die Aorta ascendens vom Truncus pulmonalis und schlangen sie zur besseren Übersicht mit Ligaturen an. Ebenso wurden die Vena cava superior und inferior angeschlungen, da diese im weiteren Versuchsablauf verschlossen werden sollten. Sobald sichergestellt war, dass alle Gefäße ordnungsgemäß geklemmt werden können, setzten wir Tabaksbeutelnähte an der Aorta ascendens und dem Truncus pulmonalis. Zur nachfolgenden Kanülierung wurden die beiden Gefäße jeweils mit einem Skalpell (Größe 11) perforiert und die venöse (Venous Arch Cannula, 10 French, Stöckert) bzw. aortale (Aortic Arch Cannula, 10 French, Stöckert) Kanüle eingeführt und mit Tourniquets fixiert. Zuvor erfolgte die vollständige Heparinisierung des Tieres mit 400 I.E. Heparin/kg KG intravenös.



**Abbildung 8:** Operationssitus nach Kanülierung und Klemmen der Aorta ascendens und des Truncus pulmonalis. Zu sehen sind die aortale Kanüle, fixiert mit dem roten Tourniquet (1), das blaue Tourniquet kennzeichnet die venöse Kanüle (2). Erkennbar sind zudem die ligierte Vena cava inferior (3) und die beiden 120°-Klemmen distal der Kanülen (4).

### Anschluss an das Perfusionssystem

Nachdem die korrekte Lage und Fixierung der Kanülen sichergestellt war, wurde das Perfusionssystem vorbereitet. Dazu füllten wir das Reservoir mit vorgewärmerter HAES-Lösung (Fresenius Kabi GmbH) und entfernten durch den Einsatz der Rollerpumpe sämtliche Luft aus den Schläuchen und dem Oxygenator. Nun öffneten wir die Klemme über der venösen Kanüle und klemmten partiell den Truncus pulmonalis, woraufhin sich das Reservoir langsam mit Blut füllte. Sobald genug Blut abgeführt wurde, schalteten wir die Rollerpumpe an, klemmten die Aorta und den Truncus pulmonalis vollständig und ligierten die Venae cavae. Die invasive Druckmessung schlossen wir nun an den neuen Kreislauf an und stellten die Rollerpumpe dermaßen ein, dass physiologische Perfusionsdrücke entstanden. Da das Herz nun ausschließlich durch den externen Kreislauf perfundiert wurde, schalteten wir das Beatmungsgerät ab. Die Euthanasie wurde gemäß Protokoll in tiefer Narkose herbeigeführt.



Abbildung 9: In-situ Langendorff Perfusionssystem in Betrieb

### VEGF- und Vektorgabe

Sobald wir unter der Langendorff-Perfusion einen stabilen Sinusrhythmus des Herzens unter normothermen, normoxämen und normotonen Bedingungen erreicht hatten, fügten wir dem System über einen 3-Wege Hahn zuerst  $100 \mu\text{l}$  VEGF und kurze Zeit später  $10^{13}$  Kopien des Vektors hinzu. Das VEGF sollte vor allem durch eine Lockerung der Gefäßendothelien für eine erhöhte myokardiale Aufnahme des Vektors sorgen, welcher aus einem Adeno-Assoziierten Virus vom Serotyp 2/9 (AAV-2/9) und in der Kontrollgruppe zusätzlich einem Markergen (LacZ) bestand. In den Versuchsgruppen ersetzten wir das Markergen durch ein therapeutisches Gen (PD-L1 oder TB4). Sowohl das VEGF als auch die verwendeten Vektoren erhielten wir über unsere Kooperation mit der AG von Prof. Kupatt, Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern, München.

### **Kardioplegie und Explantation**

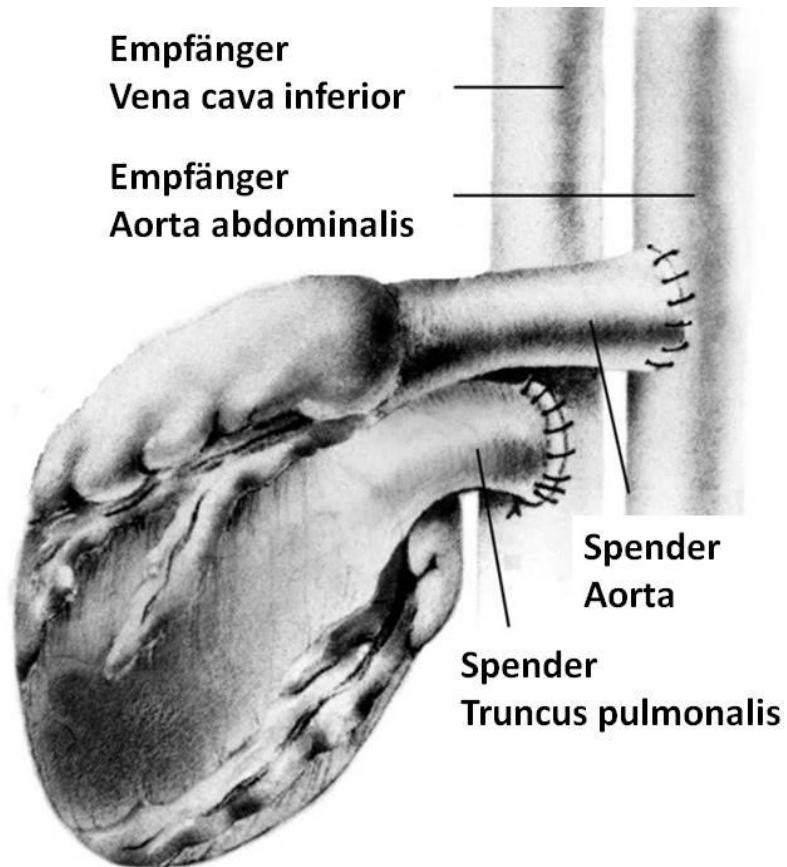
Um eine effektive zelluläre Aufnahme durch Endozytose zu ermöglichen, sollte das Herz nach der Vektorgabe für 45 Minuten unter nahezu physiologischen Bedingungen und unter Einhaltung eines Sinusrhythmus mittels des beschriebenen Systems perfundiert werden. Zu Beginn und am Ende der Perfusionsphase wurden Blutgasanalysen durchgeführt. Nachdem nun sichergestellt wurde, dass während der Zirkulationszeit optimale Verhältnisse herrschten, leiteten wir die Kardioplegie ein. Wir verwendeten hierzu eine kalte Lösung nach Bretschneider. Das Herz wurde mit gekühlter Natriumchloridlösung begossen, um den Zellstoffwechsel möglichst schnell zu verlangsamen und ein Absterben der Zellen hinauszuzögern. Nun konnte das Organ aus dem Thorax entfernt und durch Präparation der Gefäßstümpfe auf die Anastomosierung vorbereitet werden. Wir ermittelten das Gewicht und lagerten das Herz bis zur Implantation bei ca. 4° Celsius in Transplantatbeuteln auf Eis.

### **Operation der Empfängertiere**

Die Narkoseinduktion und -aufrechterhaltung erfolgte nach dem gleichen Schema und es herrschten die gleichen sterilen Bedingungen wie bei der Operation der Spendertiere (siehe oben). Des Weiteren etablierten wir auch hier zunächst einen arteriellen Zugang in der A. carotis externa, um die Blutgase und den Blutdruck invasiv messen zu können. Perioperativ wurde eine Infektionsprophylaxe mittels Infusion von 750 mg Cefuroxim durchgeführt. Danach führten wir eine mediale Laparotomie durch, welche von unterhalb des Xiphoids bis zur Symphyse reichte. Verwendet wurde hierzu ein bauchiges Skalpell (Gr. 22) für die Durchtrennung von Kutis und Subkutis, das Peritoneum öffneten wir mit einer Präparierschere und einer Pinzette. Blutungen aus größeren Gefäßen stoppten wir durch Ligation (Ethibond 2), kleinere mittels Elektrokoagulation. Um das Operationsgebiet zu erweitern, setzten wir einen dreiteiligen Bauchspanner ein, den Darm schützen warme und feuchte Bauchtücher. Jetzt wurde nach einer geeigneten Stelle unterhalb der Aa. renalis zur Durchführung der Anastomosen gesucht und dort das Retroperitoneum eröffnet. Unter Schonung des Ductus lymphaticus, dessen Verletzung zu erheblichen Flüssigkeitsverlusten führen kann, präparierten wir die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior soweit frei, dass ein simultanes Klemmen der beiden Gefäße möglich wurde.

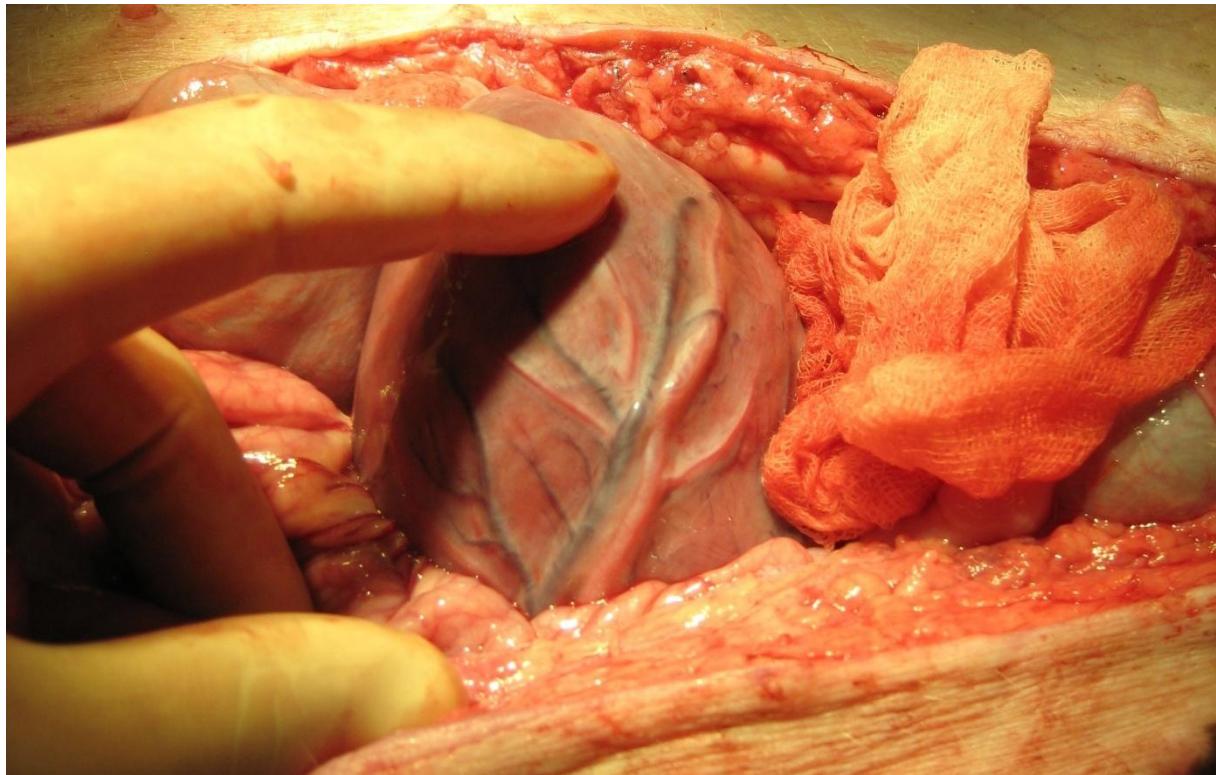
## Implantation

Um die Anastomosen mit dem Spenderorgan durchführen zu können, mussten die entsprechenden aortalen und cavalen Gefäßabschnitte ausgeklemmt werden (Satinsky Gefäßklemme). Zuvor jedoch führten wir als Thromboseprophylaxe die totale Heparinisierung mit 400 I.E./kg KG durch. Mit einem Skalpell (Gr. 11) eröffneten wir die abdominelle Aorta und Vena cava und passten mit feinen Scheren die Länge der Inzision den zu anastomosierenden Gefäßen an. Nun verbanden wir mit einer fortlaufenden Naht (Prolene 6-0 ACC, Ethicon) zunächst den Truncus pulmonalis mit der Vena cava inferior, dann mit der gleichen Technik die Aorta ascendens des Spenderherzens mit der Aorta abdominalis des Empfängertieres.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der abdominalen Verhältnisse nach Implantation des Spenderherzens

Bevor die Klemmen nun wieder geöffnet wurden, erfolgte die erste Immunsuppression durch die intravenöse Gabe von 1 mg/kg KG Methylprednisolon. In den Versuchen ISL 14 – ISL 23 infundierte wir intraoperativ zusätzlich 1000 mg Mycophenolat Mofetil (MMF). Durch die Reperfusion des Herzens stellte sich in der Regel selbstständig ein Sinusrhythmus ein, bei initialem Kammerflimmern wurde intern mit 10 Joule defibrilliert. Nach einer mehrminütigen Beobachtungsphase, in welcher insbesondere auf ein Sistieren kleinerer Blutungen und die Stabilisierung der Herzfunktion geachtet wurde, konnte das Abdomen wieder verschlossen werden. Dabei verwendeten wir für das Peritoneum 1-0 Vicryl, für die Subcutis 3-0 Prolene und Prolene 1-0 diente uns zum Verschluss der Haut mittels Donati-Rückstichtechnik. Anschließend trugen wir zunächst mehrere Schichten Blauspray und dann Sprühpflaster auf. Mit der gleichen Vorgehensweise verschlossen wir das Operationsgebiet am Hals, nachdem der arterielle Zugang entfernt und die A. carotis externa ligiert wurde. Zuvor bestimmten wir noch einmal die Blutgase und entnahmen EDTA- und Serumblut. Erst als eine suffiziente Spontanatmung einsetzte, konnte das Tier extubiert werden. In der Zwischenzeit verabreichten wir ihm erstmalig Tacrolimus (0,3 mg/kg KG i.m.) und zur Analgesie 0,5 mg Buprenorphin (i.m.). Im Anschluss verbrachten wir es unter ständiger Kontrolle der Vitalparameter zurück in den Tierstall, wo es bis zum Aufwachen engmaschig beobachtet wurde.



**Abbildung 11:** Operationssitus nach Anastomosierung und vollständiger Reperfusion des implantierten Herzens

### 2.5.3 Postoperativer Verlauf

Jeden Tag wurde eine Kontrolle der Graftfunktion durch Palpation des Abdomens durchgeführt. Zusätzlich beurteilten wir den Allgemeinzustand des Tieres. Bei den geringsten Anzeichen für Schmerzen (Nahrungsverweigerung, fehlende Neugier, gekrümmte Haltung) injizierten wir Buprenorphin (0,05 – 0,1 mg i.m.). Alle drei Tage entnahmen wir zudem Blutproben zur Verlaufskontrolle wichtiger Laborparameter (Kleines Blutbild, Elektrolyte, CRP, Troponin I, Myoglobin, Kreatinin, Harnstoff sowie die Arzneimittelspiegel von MMF und Tacrolimus). Bei den Anzeichen einer Infektion (Erhöhte Körpertemperatur, Leukozyten- und/oder CRP-Anstieg, reduzierter Allgemeinzustand) wurde antibiotisch behandelt. Zusätzlich führten wir im Rahmen der Blutentnahmen sonographische Kontrollen der Graftfunktion durch.

### **Immunsuppression**

Bei allen Versuchstieren wurde nach folgendem Schema die Immunsuppression durchgeführt:

- Methylprednisolon. Einmalgabe intraoperativ (1 mg/kg KG)
- Tacrolimus. Es sollte für 10 Tage ein Arzneimittelspiegel von 20-30 ng/ml bestehen. Dazu verabreichten wir intraoperativ 0,3 mg/kg KG und passten die nachfolgend täglich gespritzten Dosen den gemessenen Blutkonzentrationen an.

Bei den Versuchen ab einschließlich ISL 14 bestand das immunsuppressive Schema zusätzlich aus der Gabe von Mycophenolat Mofetil (MMF), da hier durch die Verwendung von Munich-Mini-Pigs als Empfängertiere stärkere Abstoßungsreaktionen der Landrasse-Schweineherzen verursacht wurden. Verabreicht wurde auch dieses Medikament über einen Zeitraum von 10 Tagen, die erste Gabe wurde intraoperativ durchgeführt (1000 mg über eine Stunde i.v.), die weitere Zufuhr erfolgte täglich oral (50 - 100 mg/kg KG, zerkleinerte Tabletten in Nuss-Nougat Creme)

### **2.5.4 Versuchsende**

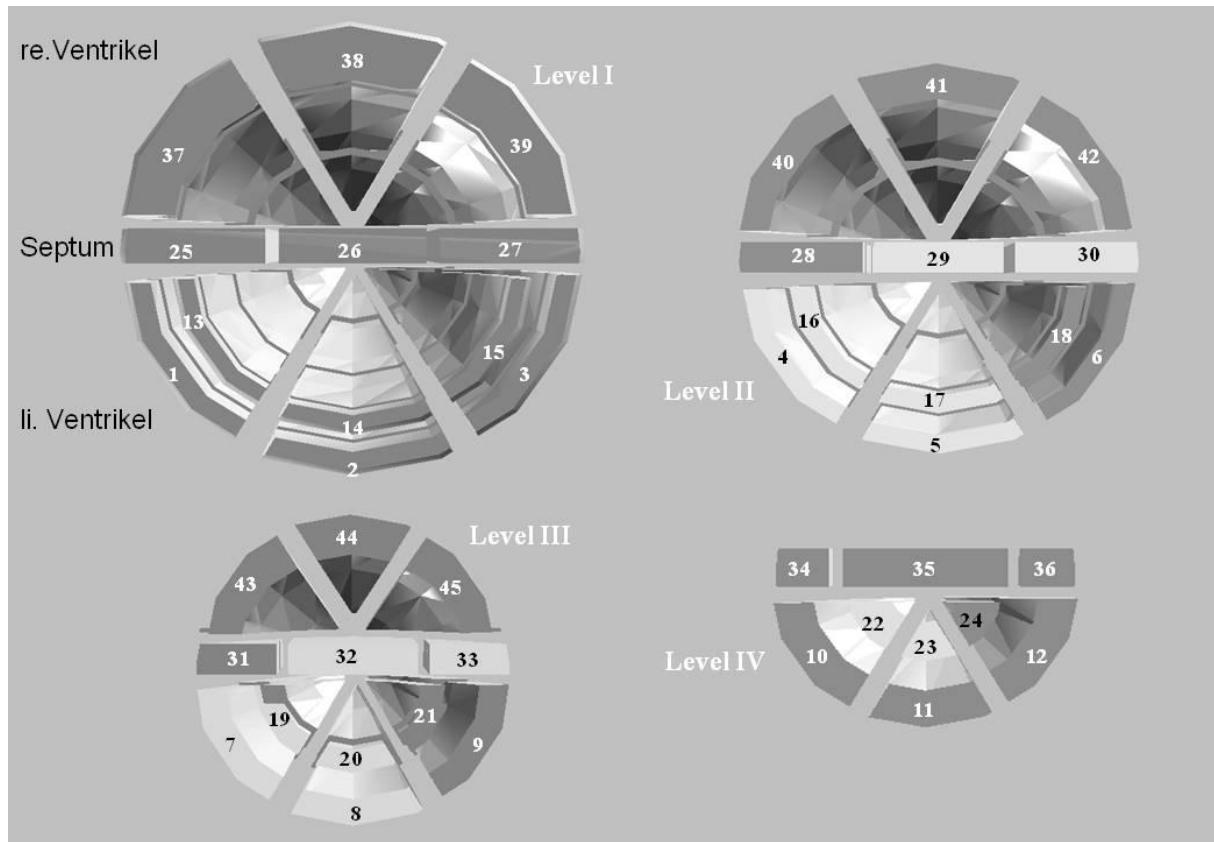
Sobald die gewünschte Versuchsdauer erreicht worden war, sich der Allgemeinzustand des Tieres trotz entsprechender Therapie verschlechterte oder keine Graft-Funktion mehr feststellbar war, wurde der Versuch beendet. Dazu leiteten wir, nach dem unter 2.5.1 beschriebenen Schema, die Narkose im Tierstall ein und setzten sie nach erfolgter Intubation im Operationsraum mit Propofol (1,5 - 2,5 mg/kg KG als Bolus i.v., anschließend 8 - 12 mg/kg KG/h i.v.) und Fentanyl-Boli (0,05 - 0,1 mg i.v.) fort. Auch wurde ein Monitoring wie schon zu Versuchsbeginn durchgeführt. Die Operation fand unter nicht-sterilen Bedingungen statt. Mit einem Elektrokauter eröffneten wir das Abdomen entlang der Narbe, welche durch die Implantation bei Versuchsbeginn entstanden war und präparierten das

Herztransplantat frei. Falls es ein Kammerflimmern aufwies, defibrillierten wir es mit 10 Joule intern. Dann wurde die Kontraktilität des linken und rechten Ventrikels mittels SES (Subendokardiale Segmentverkürzung) bestimmt und venöses Blut zur laborchemischen Auswertung entnommen. Bevor wir das Graft durch Zertrennen der Anastomosen entnahmen, euthanasierten wir das Tier mit einer intrakardialen Injektion von Kaliumchlorid.

## **2.6 Versuchsauswertung**

### **2.6.1 Probengewinnung**

Das entnommene Graft wurde in 45 Segmente unterteilt und zuerst in flüssigem Stickstoff und dann bei - 80° Celsius bis zur weiteren histologischen Auswertung gelagert (siehe Abb. 12). Jeweils eine Probe aus dem rechten und linken Vorhof und Ventrikel sowie aus dem Septum wurden in Formalin konserviert und im pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität zu München durch Prof. Dr. Scotlar und Dr. Faber bezüglich der histologischen Abstoßungszeichen untersucht.



**Abbildung 12:** Dissektionsschema der entnommenen Grafts. Zur besseren Vergleichbarkeit verwenden wir das gleiche Schema und das gleiche Computerprogramm (Organ 3D, B. Thein), welche schon in den zuvor durchgeföhrten in-situ Langendorff Versuchen verwendet wurden [Schulz, 2009].

## 2.6.2 Färbungen

Um Färbungen durchführen zu können, wurden aus den jeweiligen Segmenten mittels eines Kryotoms (Leica CM3050) 5 µm dünne Schnittpräparate angefertigt und auf Objekträgern (Menzel-Gläser, Thermo Scientific) fixiert.

### β-Galaktosidase-Färbung

Zum Nachweis des Transduktionserfolgs und um Aussagen zum Myotropismus des verwendeten Vektors treffen zu können, wurde bei den mit dem β-Galaktosidase-Gen transduzierten Herzen aus der Kontrollgruppe eine LacZ-Färbung aller 45 Schnittpräparate angefertigt. Dazu hat sich folgende Vorgehensweise bewährt:

- 1) Beträufeln der Gewebeschnitte mit 0,5 % Glutaraldehyd (1 ml 0,25 % Glutaraldehyd auf 50 ml PBS+)
- 2) Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten
- 3) Vorsichtiges Abklopfen des Glutaraldehyds
- 4) Beträufeln der Gewebeschnitte mit der X-Gal Färbelösung, bestehend aus 20 ml PBS+, 0,5 ml 40x X-Gal und 1 ml 20x KC
- 5) Inkubation für 6 Stunden bei 37° C
- 6) Entfernen der X-Gal Färbelösung mittels PBS

Die so gefärbten Gewebeproben wurden unter einem Lichtmikroskop in 10-facher und 40-facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert. Den Transduktionserfolg bzw. die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens konnten wir anhand der stattgefundenen Blauverfärbung qualitativ beurteilen. Um den Myotropismus quantitativ beschreiben zu können, teilten wir den Bildausschnitten anhand ihrer prozentualen Blauverfärbung einen numerischen Wert (0 - 3) zu.

### **Alkalische-Phosphatase-Färbung**

Bei den mit Thymosin  $\beta$ 4 transduzierten Herzen wurde in jeweils 5 Arealen (Segment 4, 6, 20, 32, 44, siehe Abb. 10) die Kapillaren mittels der AP-Färbung (Alkalische-Phosphatase) sichtbar gemacht, ihre Anzahl bestimmt und mit den entsprechend gefärbten Arealen aus der Kontrollgruppe verglichen. Das von uns verwendete Schema wurde in seinen Grundzügen bereits 1984 beschrieben [Fritz *et al.*, 1984].

#### Materialien:

- Pufferlösung: 6,9 mmol/l  $MgSO_4$  und 27,5 mmol/l  $B_4Na_2O_7$  gelöst in destilliertem Wasser (Aqua dest.)
- 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidin-Salz

- Nitrotetrazolium blue chloride (SIGMA N-6876)
- PBS
- Formalin
- Kernechtrot

Methode:

1. Die Gewebeproben werden für 5 Minuten mit 4°C kaltem Aceton vorbehandelt.
2. Lufttrocknen.
3. Färbelösung anrühren: In 30 ml Pufferlösung werden 30 mg Nitrotetrazolium blue chloride und 6 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-toluidin-Salz gelöst.
4. Die Färbelösung mittels einer Pipette auf die Objektträgerträufeln.
5. Inkubation für eine Stunde bei 37°C in einer Feuchtkammer.
6. Abwaschen der Färbelösung durch dreimaliges Schwenken in PBS.
7. Fünf Minuten in Formalin fixieren.
8. Eine Minute in destilliertem Wasser waschen.
9. Gegenfärbeln für eine Minute mit Kernechtrot.
10. Erneutes Waschen mit destilliertem Wasser.
11. Lufttrocknen.

---

Die so gefärbten Gewebeproben wurden unter einem Lichtmikroskop in 10- und 40-facher Vergrößerung betrachtet und photographiert. Die sich nun schwarz

darstellenden Kapillarquerschnitte wurden gezählt und mit entsprechend gefärbten Proben der Kontrollgruppe verglichen. Zur Kapillarzählung wurde das von G. Stachel 2009 programmierte und lediglich intern verwendete Programm „Kaninchen“ verwendet.

### **2.6.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Versuche wurde mit dem Programm SigmaPlot 11.0 durchgeführt. Zur Detektion von Unterschieden zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe wurde bei Vorliegen einer Normalverteilung der Daten (Shapiro-Wilk-Test) der T-Test angewendet. Bei nicht-normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

### 3. Ergebnisse

Es wurden insgesamt 23 Versuche durchgeführt. Der erste Versuch war aufgrund einer unstillbaren Blutung während der Perfusionsphase nicht erfolgreich, sodass am Ende 22 heterotop-abdominelle Herztransplantationen durchgeführt und in die Auswertung eingeschlossen werden konnten.

Von den 22 Tieren wurden 9 mit AAV-2/9-LacZ transduziert und dienten sowohl als Kontrollgruppe als auch zur Feststellung der Transduktionseffizienz. Drei Herzen erhielten AAV-2/9-PD-L1 und 10 Herzen wurden mit AAV-2/9-TB4 perfundiert.

Die Auswertung der Versuche sollte vor allem zwei Fragestellungen beantworten:

1. Transduziert der AAV-2/9 in unserem Modell effektiv Landrasse- und CD46/Gal-KO- Schweineherzen?
2. Lassen sich durch die Verwendung von PD-L1 oder TB4 als therapeutische Gene protektive Effekte bezüglich der Abstoßung transplanterter Herzen nachweisen?

#### 3.1 Effektive Transduktion durch AAV-2/9

Zur Bestimmung der Transduktionsrate von Schweineherzen durch AAV-2/9 wurden die mit LacZ transduzierten Herzen nach dem Versuchsende in 45 Segmente unterteilt, um nach entsprechender Färbung die jeweilige lokale Expressionsrate fluoreszensmikroskopisch beurteilen zu können. Von den neun Versuchen, welche mit dem Markergen LacZ durchgeführt wurden, konnten acht ausgewertet werden. ISL 12 musste bereits nach vier Tagen beendet werden und zeigte keine

Transgenexpression. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Versuche zur Ermittlung des Kardiomyotropismus von AAV-2/9.

Versuch	Vektor	Ü-Tage	Beendigungsgrund	Rasse Spender	Rasse Empfänger	MMF
<b>ISL 2</b>	AAV-2/9-LacZ	9	AZ-Verschlechterung, Nierenversagen	Deutsche Landrasse	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 4</b>	AAV-2/9-LacZ	24	AZ-Verschlechterung, Pneumonie + Narbenhernie	Deutsche Landrasse	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 7</b>	AAV-2/9-LacZ	57	AZ-Verschlechterung, Parese der Hinterläufe	Deutsche Landrasse	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 8</b>	AAV-2/9-LacZ	9	Keine Graftfunktion mehr nachweisbar	CD46/Gal-Ko TG	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 10</b>	AAV-2/9-LacZ	12	AZ-Verschlechterung, Ileus	Deutsche Landrasse	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 12</b>	AAV-2/9-LacZ	4	Keine Graftfunktion mehr nachweisbar	Deutsche Landrasse	Munich Mini-Pig	Nein
<b>ISL 14</b>	AAV-2/9-LacZ	16	AZ-Verschlechterung, drohender Exitus	Deutsche Landrasse	Munich Mini-Pig	Ja
<b>ISL 17</b>	AAV-2/9-LacZ	18	Maximale Versuchsdauer erreicht	Deutsche Landrasse	Munich Mini-Pig	Ja
<b>ISL 18</b>	AAV-2/9-LacZ	18	Maximale Versuchsdauer erreicht	Deutsche Landrasse	Munich Mini-Pig	ja

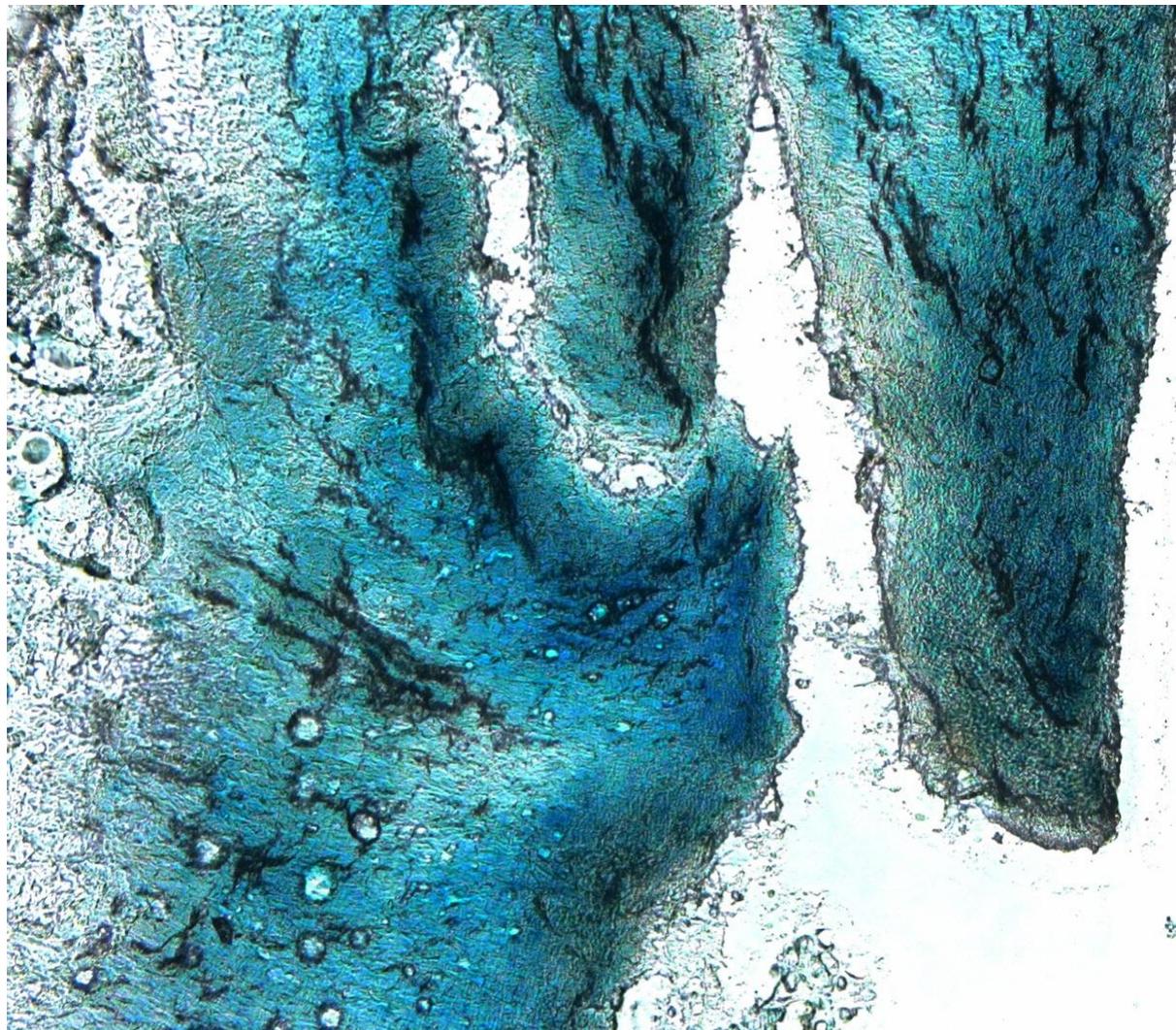
**Tabelle 4:** Übersicht über die Versuche, bei denen das Markergen LacZ verwendet wurde. ISL 12 wurde nicht in die Auswertung zur Ermittlung des Kardiomyotropismus einbezogen, da nach nur 4 Tagen eine Transgenexpression nicht zu erwarten war. Ü-Tage = Überlebenstage, MMF = Behandlung mit Mycophenolat – Mofetil.

Der Kardiomyotropismus in den einzelnen Herzsegmenten wurde anhand der Markergenexpression, also in diesem Fall anhand der prozentualen Blaufärbung, ausgewertet. Pro Segment wurden drei Schnitte angefertigt und mikroskopisch in zehnfacher Vergrößerung beurteilt. Wir verwendeten dabei folgende Tabelle, um der prozentualen Blaufärbung einen numerischen Wert zuzuordnen:

Prozentuale Blaufärbung	Numerischer Wert
<b>Keine Blaufärbung nachweisbar</b>	0
<b>Weniger als 50 %</b>	1
<b>50 % - 79 %</b>	2
<b>80 % - 100 %</b>	3

**Tabelle 5:** Darstellung der dem Grad der Blaufärbung zugeordnete numerische Wert, welcher in der 3D-Darstellung jeweils eine bestimmte Farbe zugeordnet wurde.

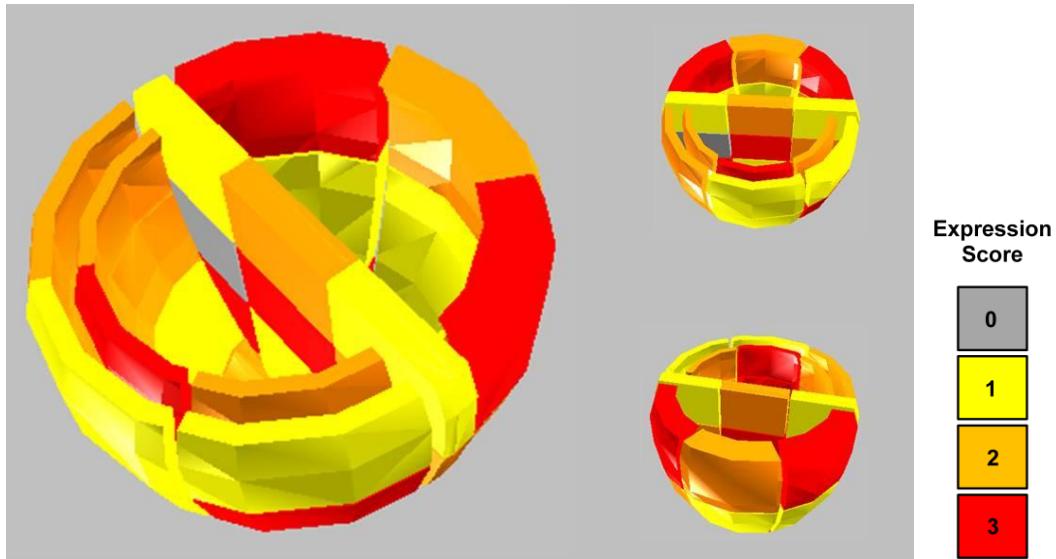
Exemplarisch dargestellt ist nachfolgend ein Beispielbild für eine sehr gute Transgenexpression, entnommen aus ISL 4, Segment 38 (rechter Ventrikel).



**Abbildung 13:** Beispiel für eine sehr gute Transduktion, erkennbar an der fast durchgehenden Blauverfärbung des Präparates in der x-Gal Färbung. Entnommen aus ISL 4, Segment 38 (rechter Ventrikel).

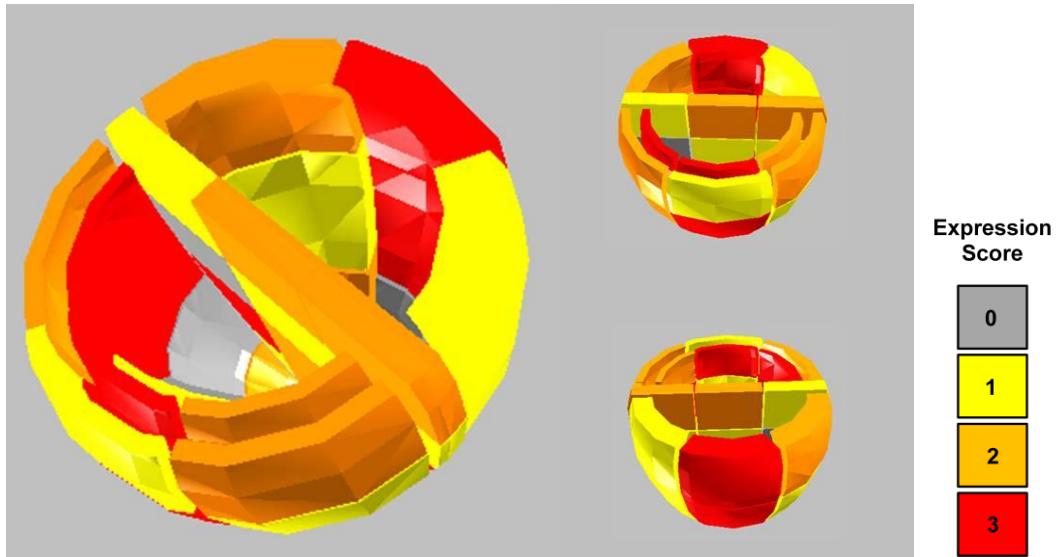
Die Transgenexpression stellt sich im Einzelnen wie folgt dar:

## ISL 2



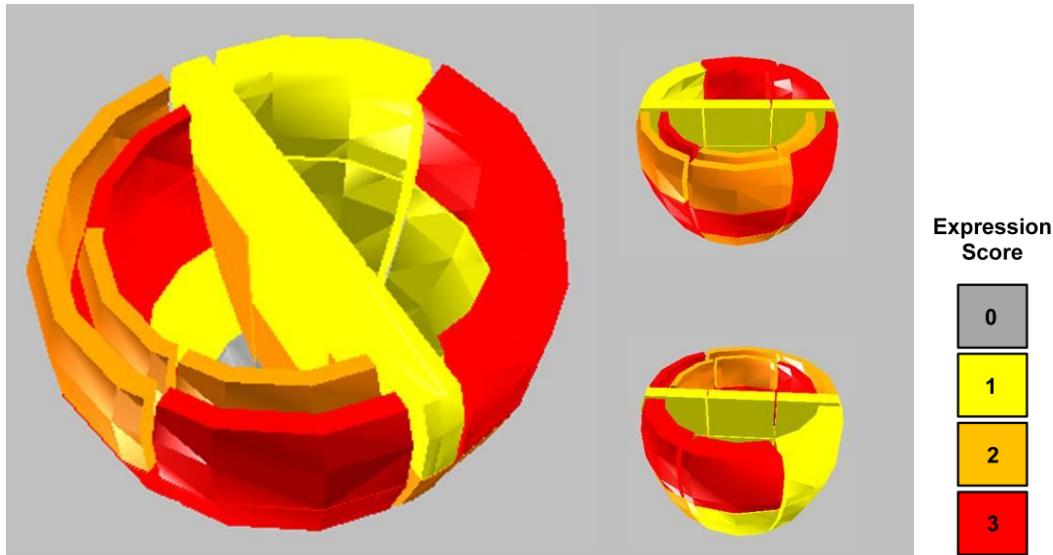
**Abbildung 14:** Transgenexpression in ISL 2. Besonders im oberen rechten Ventrikel konnte eine gute bis sehr gute Transgenexpression erreicht werden. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.

## ISL 4



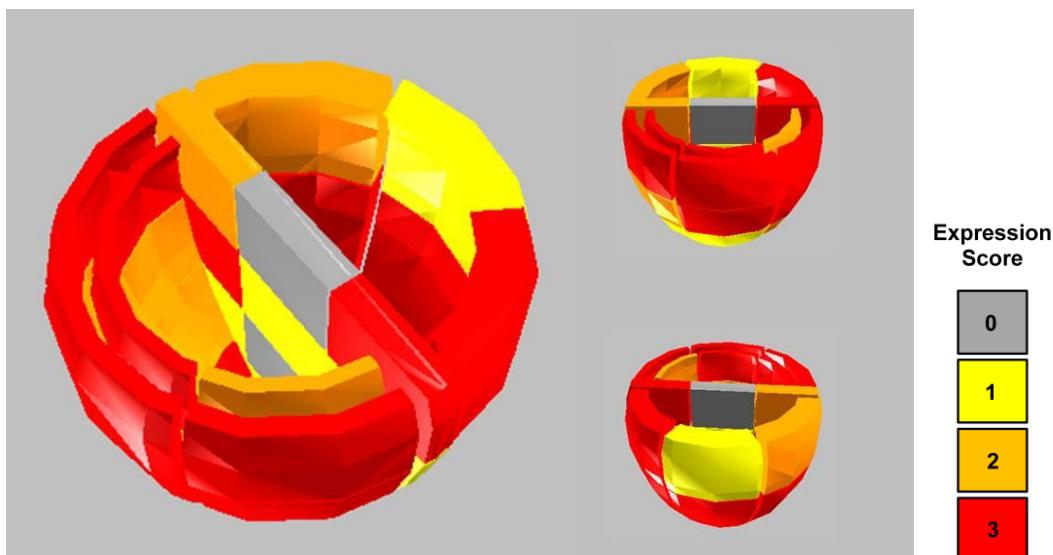
**Abbildung 15:** Transgenexpression in ISL 4. Gute bis sehr gute Transgenexpression in den meisten Segmenten des rechten und linken Ventrikels, an der Herzspitze teilweise keine Expression. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.

## ISL 7



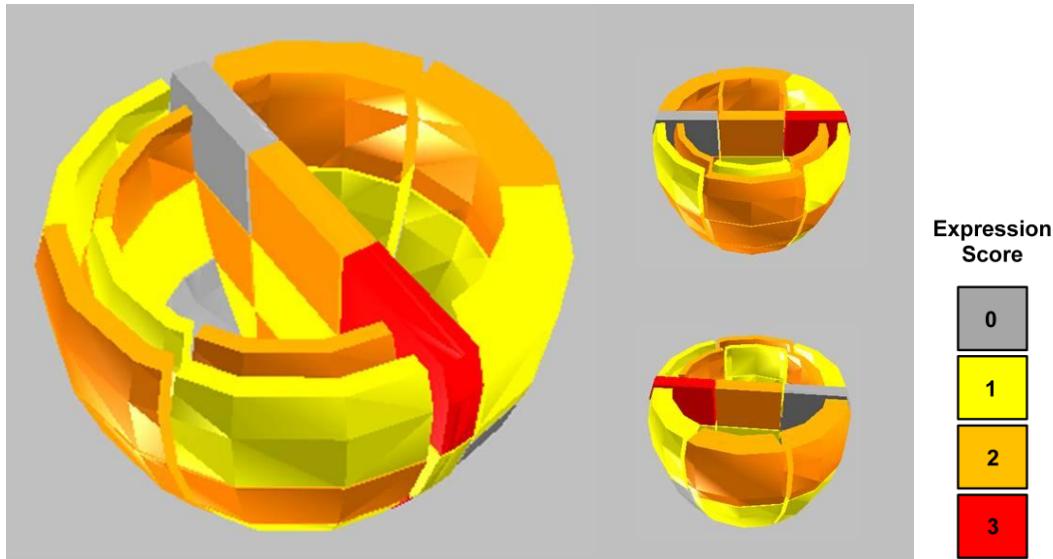
**Abbildung 16:** Transgenexpression in ISL 7. Gute bis sehr gute Transgenexpression in den meisten Segmenten beider Ventrikel, Im Ventrikelseptum findet sich eine geringere Expression. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.

## ISL 8



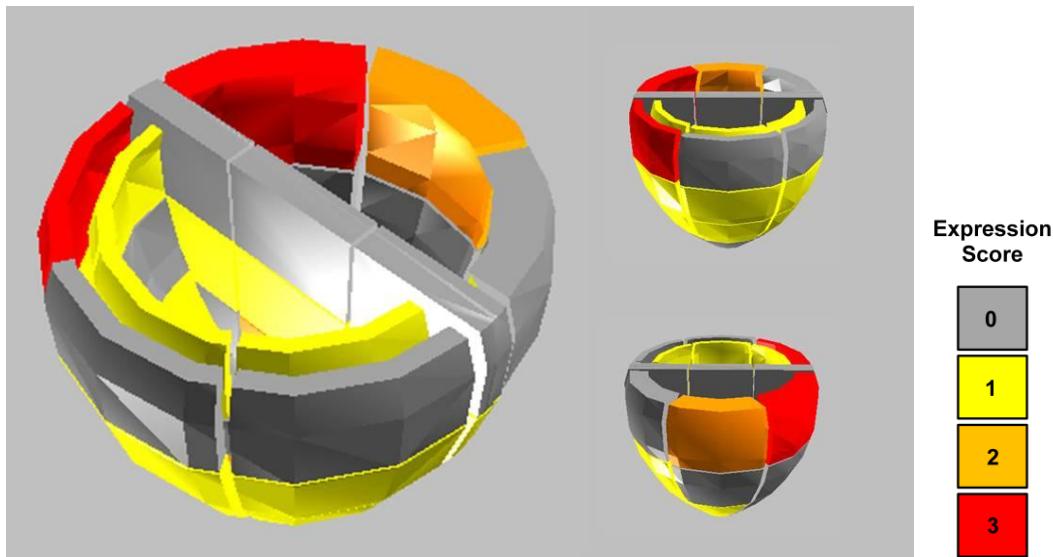
**Abbildung 17:** Transgenexpression in ISL 8. Gute bis sehr gute Transgenexpression in den meisten Segmenten des rechten und, noch stärker, des linken Ventrikels, im Ventrikelseptum teilweise keine Expression. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.

## ISL 10



**Abbildung 18:** Transgenexpression in ISL 10. Homogene Verteilung, jedoch höchstens gute Transgenexpression in den meisten Segmenten des rechten und linken Ventrikels. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.

## ISL 14

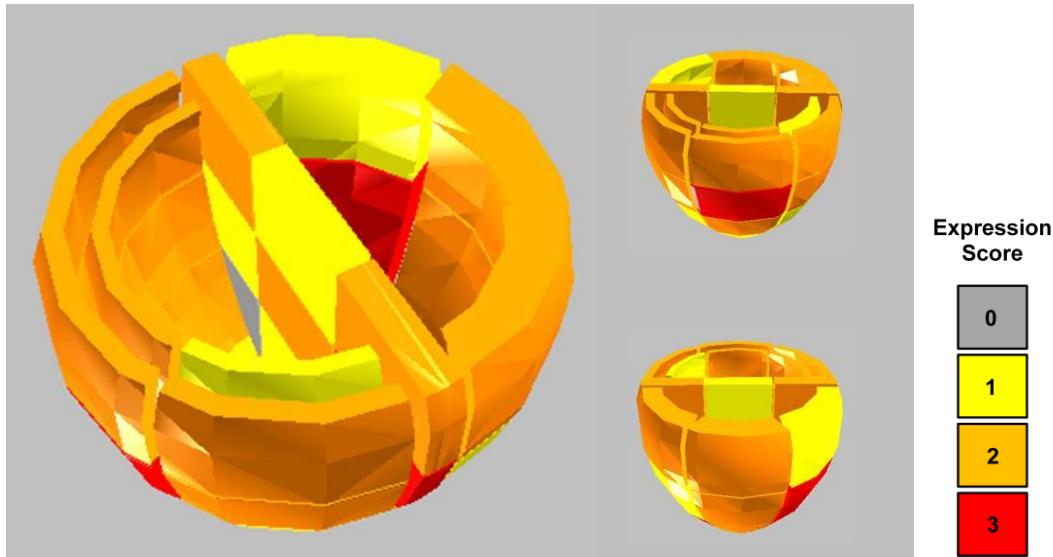


**Abbildung 19:** Transgenexpression in ISL 14. Wenig oder keine Transgenexpression in den meisten Segmenten. In nur drei Segmenten fand sich eine gute oder sehr gute Expression. Die Ursache sind in großflächigen Nekrosen des Herzens zu sehen (siehe Abb. 20). Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.



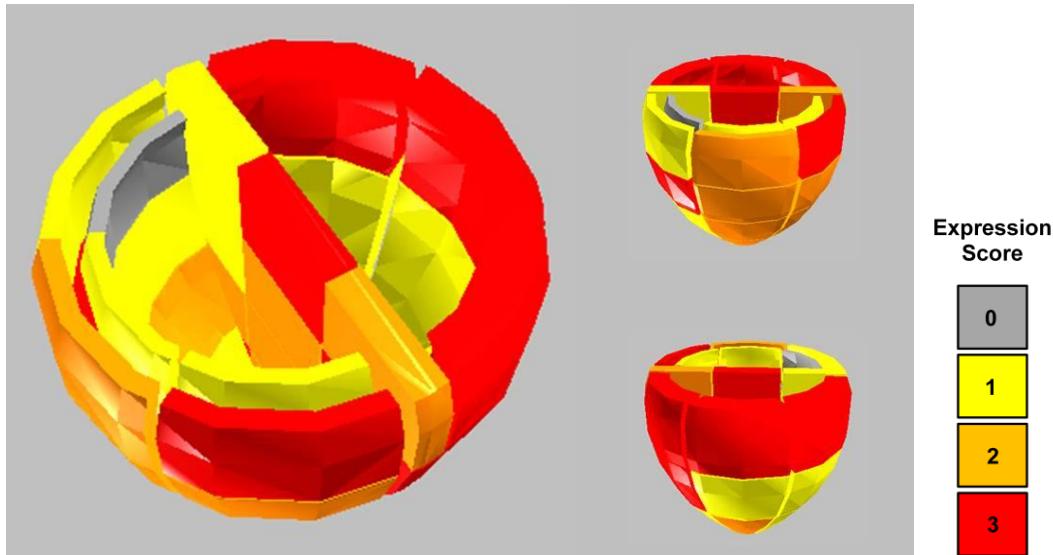
**Abbildung 20:** Explantiertes und aufgeschnittenes Graft aus Versuch ISL 14. Zu erkennen ist überwiegend nekrotisch/hämorrhagisch verändertes Gewebe.

## ISL 17



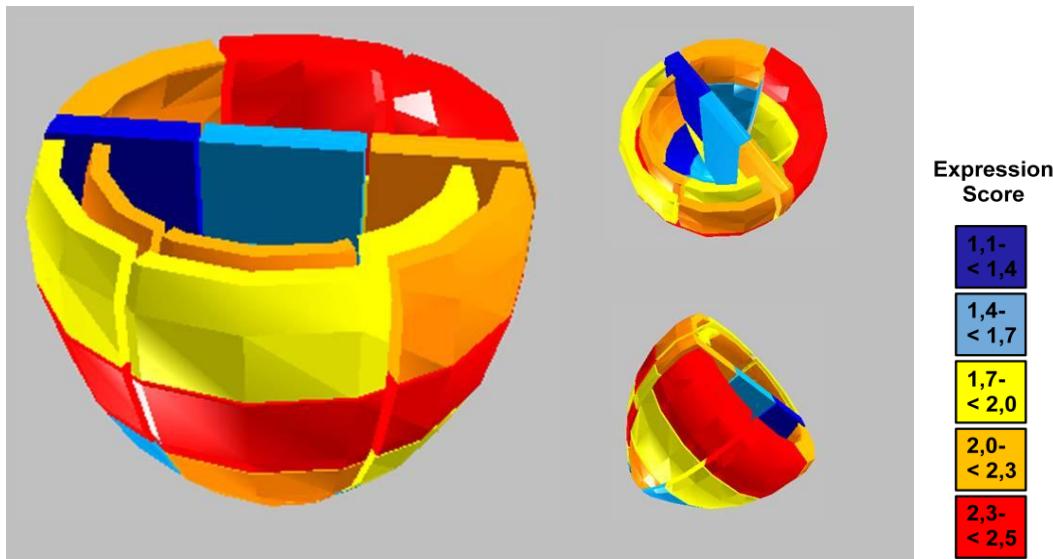
**Abbildung 21:** Transgenexpression in ISL 17. Gleichmäßig gute Transgenexpression in den Ventrikeln, etwas geringere Expression im Septum. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.

## ISL 18



**Abbildung 22:** Transgenexpression in ISL 18. Gute bis sehr gute Transgenexpression in den meisten Segmenten, vor allem in den oberen Anteilen des rechten Ventrikels. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.

## Mittlere LacZ Expression



**Abbildung 23:** Mittlere LacZ-Expression. Dargestellt sind für jedes Segement jeweils der mittlere Expression Score. ISL 14 wurde aufgrund des vollkommen nekrotischen Grafts nicht mit einbezogen. Zu sehen ist, dass im Mittel eine gute bis sehr gute Transgenexpression der Ventrikel, vor allem des rechten Ventrikels, zu erreichen ist. Im Septum konnte im Durchschnitt nur eine mittlere bis geringe Transgenexpression erreicht werden. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.

## Fazit Transduktionsversuche

Die durchgeführten Versuche zeigen eine überwiegend gute bis sehr gute Transgenexpression v. a. des rechten und linken Ventrikels. Im Ventrikelseptum konnte in fast allen Fällen nur eine mäßige Markergenexpression gemessen werden (siehe Abb. 23).

## 3.2 Vermittlung organprotektiver Effekte durch PD-L1 und TB4

In diesem zweiten Versuchsabschnitt sollte festgestellt werden, ob durch die Expression potentiell therapeutischer Gene eine Organprotektion erreicht werden kann. Zuerst verwendeten wir PD-L1, die entsprechenden Versuche sind nachfolgend tabellarisch dargestellt.

Versuch	Vektor	Ü-Zeit	Beendigungsgrund	Rasse Spender	Rasse Empfänger	MMF
<b>ISL 3</b>	AAV-2/9-PD-L1	61	Versuchsabbruch, Tier wiegt über 60 kg	Deutsche Landrasse	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 5</b>	AAV-2/9-PD-L1	60	Versuchsabbruch, Tier wiegt über 60 kg	Deutsche Landrasse	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 6</b>	AAV-2/9-PD-L1	62	Versuchsabbruch, Tier wiegt über 60 kg	Deutsche Landrasse	Deutsche Landrasse	Nein

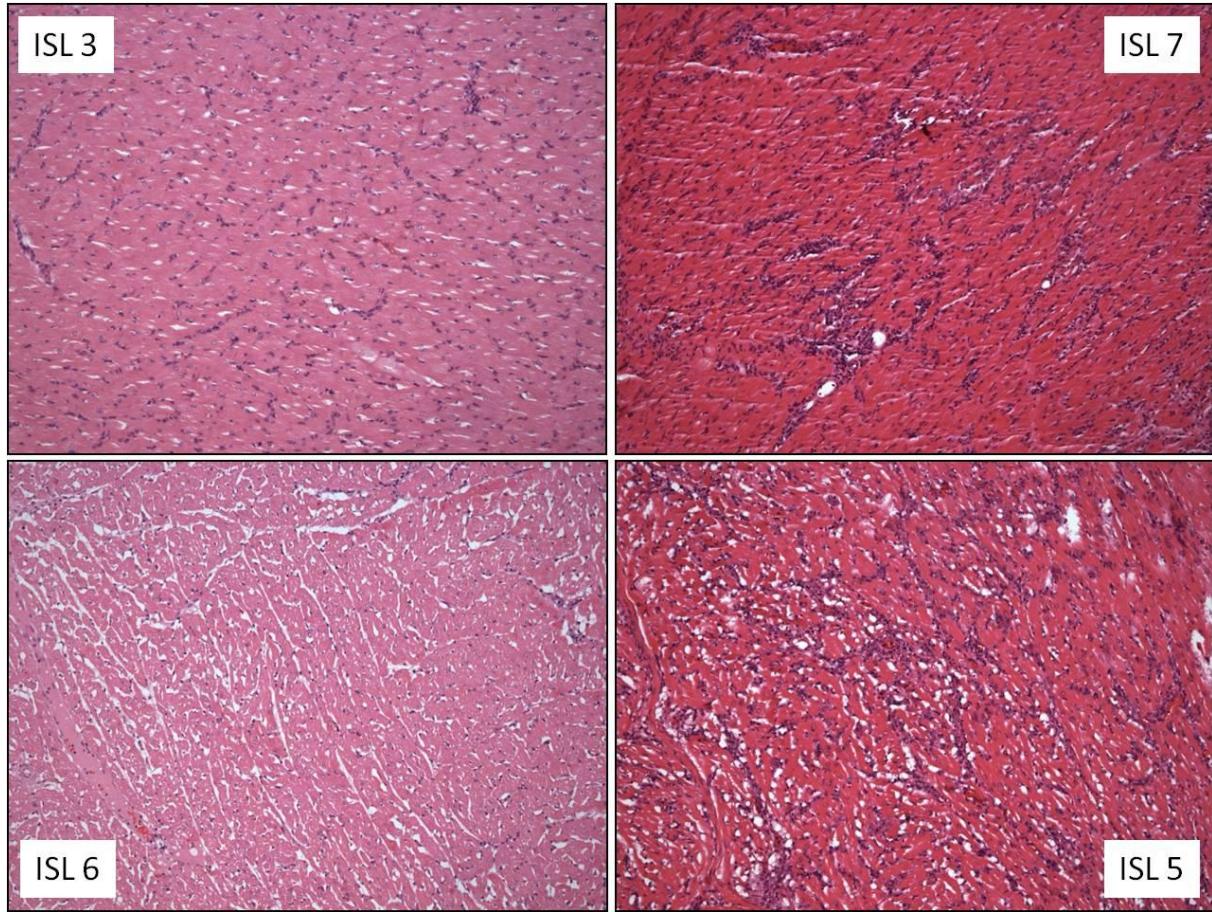
**Tabelle 6:** Übersicht über die Versuche, bei welchen AAV-2/9-PD-L1 verwendet wurde. Alle 3 Versuche wurden nach zwei Monaten beendet, weil die Versuchstiere über 60 kg wogen. Ü-Zeit = Überlebenszeit, MMF = Behandlung mit Mycophenolat-Mofetil.

Alle drei Versuche wurden beendet, nachdem die Tiere zu schwer wurden und eine sichere tägliche Kontrolle der Graftfunktion nicht mehr gewährleistet werden konnte. Als Kontrollgruppe verwendeten wir ISL 2, ISL 4 und ISL 7. Ein ursprünglich geplanter Vergleich der Überlebenszeiten von Kontroll- und Versuchsgruppe wurde verworfen, da auch in der Kontrollgruppe ein entsprechend langes Graftüberleben erzielt wurde, jedoch mussten diese Versuche jeweils aufgrund einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes beendet werden. Um Aussagen bezüglich der Abstoßungsreaktionen treffen zu können, wurden die explantierten Grafts histologisch beurteilt. Einen Überblick über die histopathologische und immunhistochemische Auswertung gibt die nachfolgende Tabelle:

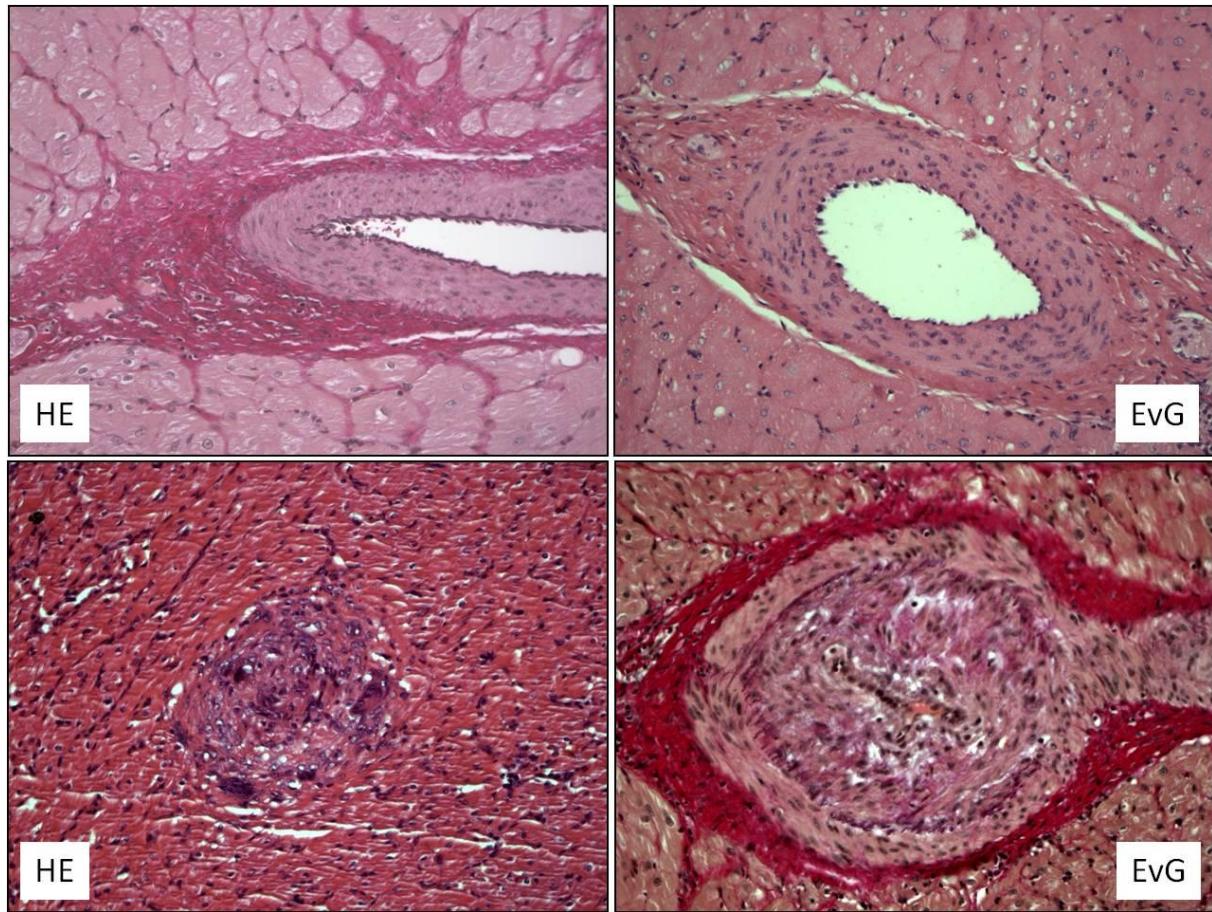
	ISL 3	ISL 4	ISL 5	ISL 6	ISL 7
<b>Lymphozytäres Infiltrat</b>	+	++(+)	++(+)	+	++
<b>Vaskulopathie</b>	-	(+)	+++	-	+++
<b>Quilty – Effekt</b>	+	+	ND	ND	ND
<b>Entspricht ISHLT (2004)</b>	1R	2R	2R	1R	2R
<b>Ig M</b>	+(+)	+(+)	++	+(+)	++
<b>C4d</b>	(+)	+	+	(+)	(+)
<b>Fibrin</b>	-	-	-	-	-

**Tabelle 7:** Tabellarische Darstellung der histopathologischen und immunhistochemischen Auswertung der Versuche ISL 3 – ISL 7 durch Prof. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München. Der Quilty – Effekt konnte in ISL 5 – ISL 7 nicht untersucht werden, da kein Endothel angeschnitten war. ISL 4 und ISL 7 bildeten die Kontrollgruppe.

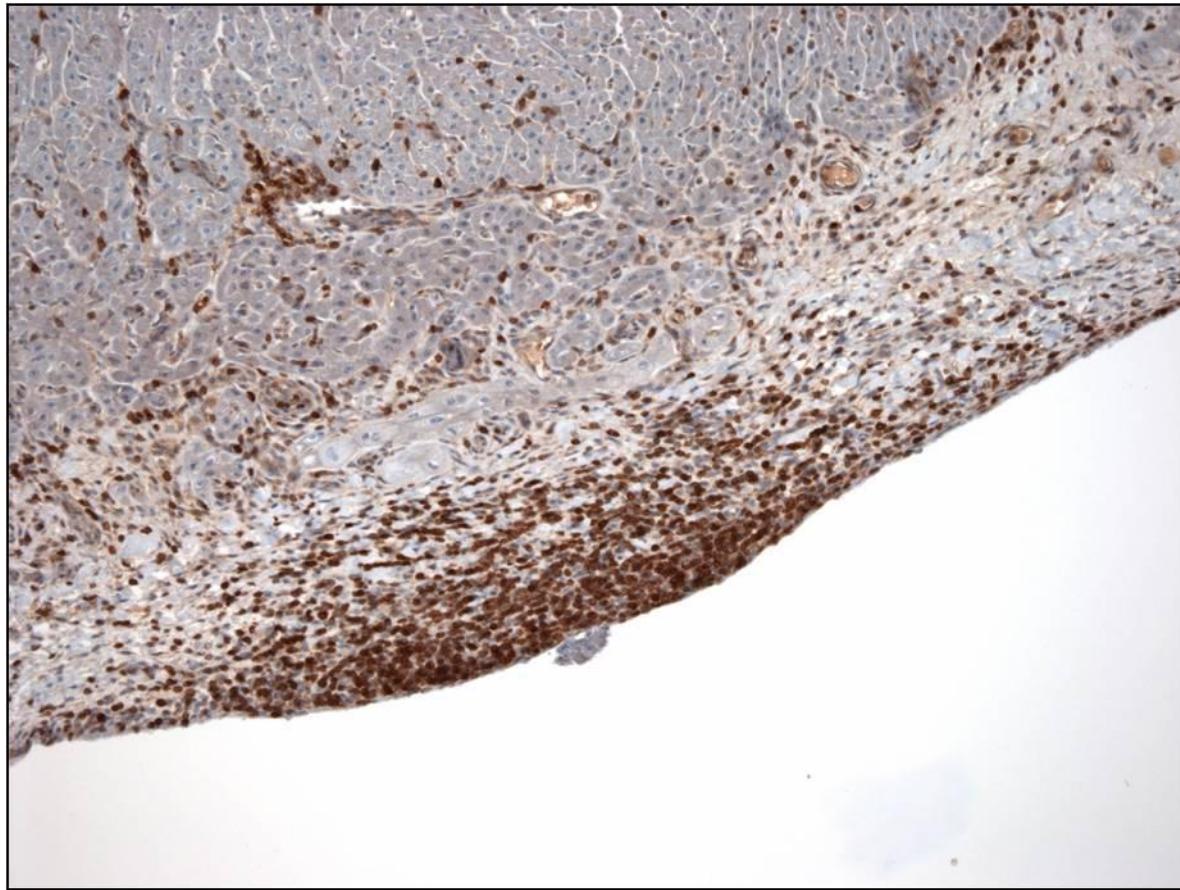
Um einen Einblick in den Bewertungsmaßstab der histopathologischen Präparate zu bekommen sind nachfolgend einige Beispiele aus der Versuchs- und Kontrollgruppe aufgeführt, welche zur Beurteilung der Vaskulopathie, des lymphozytären Infiltrats und des Quilty-Effekts angefertigt wurden.



**Abbildung 24:** Darstellung des lymphozytären Infiltrats anhand von Präparaten aus ISL 3, ISL 5, ISL 6 und ISL 7. Bei der verwendeten Hämatoxylin-Eosin-Färbung sind die Lymphozyten blau angefärbt. Die Präparate wurden angefertigt und beurteilt durch Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München.



**Abbildung 25:** Darstellung der Vaskulopathie in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG). Die oberen beiden Schnitte stammen aus ISL 3 und zeigen normale Gefäße ohne besondere pathologische Veränderungen. Die unteren beiden Präparate stammen aus ISL 7 und sind von starker Vaskulopathie geprägt. Die Präparate wurden angefertigt und beurteilt durch Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München.



**Abbildung 26:** Beispiel für den Quilty-Effekt (Endokardiale Lymphozyteninfiltration). Entnommen aus ISL 7. Das Präparat wurde angefertigt und beurteilt durch Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München.

Nach nur drei Versuchen mit PD-L1 beschlossen wir das Transgen zu ändern. Histopathologisch und immunhistochemisch zeichnete sich bereits ab, dass PD-L1 in unserem Versuchsmodell keine protektiven Effekte zeigt, tendenziell sogar eher negative Effekte haben könnte. Wir beschlossen deshalb, für die folgenden Versuche TB4 als Transgen zu verwenden.

Die ersten vier TB4 - Transduktionsversuche wurden weiterhin mit Schweinen der deutschen Landrasse als Empfängertiere durchgeführt. Zwei der Spendertiere waren CD46/Gal-KO - transgene Landrasseschweine. Hiermit sollte untersucht werden, ob die Transduktion auch bei bereits zweifach transgenen Herzen erfolgreich ist. Dies konnten wir anhand der Expression von LacZ in ISL 8 zeigen (siehe 3.1). Die entsprechenden Versuche sind nachfolgend tabellarisch dargestellt.

ERGEBNISSE

Versuch	Vektor	Ü-Zeit	Beendigungsgrund	Rasse Spender	Rasse Empfänger	MMF
<b>ISL 8</b>	AAV-2/9-LacZ	9	Keine Graft-Funktion	Gal-KO / CD46	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 9</b>	AAV-2/9-TB4	36	Versuchsabbruch, Tier wiegt über 60 kg	Deutsche Landrasse	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 10</b>	AAV-2/9-LacZ	12	Versuchsabbruch, Tier wiegt über 60 kg	Deutsche Landrasse	Deutsche Landrasse	Nein
<b>ISL 11</b>	AAV-2/9-TB4	20	Keine Graft-Funktion	Gal-KO / CD46	Deutsche Landrasse	Nein

**Tabelle 8:** Tabellarische Darstellung der Versuche ISL 8 - ISL 11. Ü-Zeit = Überlebenszeit, MMF = Behandlung mit Mycophenolat - Mofetil.

Bezüglich der histopathologischen Abstoßungszeichen und der Überlebenszeit im Vergleich zu den beiden Kontrolltieren erwarteten wir keinen positiven Effekt. Im Gegenteil: Da das übertragene hCD46 ein humaner komplementregulatorischer Faktor ist, könnte er eine stärkere Abstoßungsreaktion provoziert haben. Der Knockout des Gal-Epitops hatte beim Schwein keine immunologischen Auswirkungen, da die Tiere selber keine Anti-Gal Antikörper besitzen. Beide Versuche, in denen hCD46/Gal-KO - transgene Herzen verwendet wurden, mussten aufgrund nicht mehr nachweisbarer Graftfunktion beendet werden. Die histopathologische und immunhistochemische Auswertung ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

	ISL 8	ISL 9	ISL 10	ISL 11
<b>Lymphozytäres Infiltrat</b>	+	++	(+)	++
<b>Vaskulopathie</b>	-	-	-	+
<b>Quilty – Effekt</b>	+	+	(+)	+
<b>Entspricht ISHLT (2004)</b>	3R	1R	1R	2R
<b>Ig M</b>	++	++	+(+)	++
<b>C4d</b>	(+)	(+)	(+)	(+)
<b>Fibrin</b>	+	++	(+)	++
<b>CD 3</b>	+	++	(+)	++

**Tabelle 9:** Tabellarische Darstellung der histopathologischen und immunhistochemischen Auswertung der Versuche ISL 8 - ISL 11. Durchgeführt von Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München.

Um in unseren weiteren Versuchen eine stärkere Abstoßung zu provozieren, verwendeten wir ab ISL 12 ein diskonkordanteres Transplantationsmodell, indem wir als Empfängertiere Munich-Mini-Pigs einsetzten. Diese hatten zudem den Vorteil, dass sie zuchtbedingt ein geringeres Gewicht erreichen als Schweine der deutschen Landrasse, wodurch die tägliche Überprüfung der Graftfunktion deutlich vereinfacht werden konnte. Die ersten beiden Versuche wurden am selben Tag durchgeführt und die Munich-Mini-Pigs erhielten das gleiche immunsuppressive Schema wie die Landrasse-Schweine zuvor. Die beiden Versuche sind nachfolgend dargestellt.

ERGEBNISSE

Versuch	Vektor	Ü-Zeit	Beendigungsgrund	Rasse Spender	Rasse Empfänger	MMF
<b>ISL 12</b>	AAV-2/9-LacZ	4	Keine Graft-Funktion	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Nein
<b>ISL 13</b>	AAV-2/9-TB4	4	Keine Graft-Funktion	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Nein

**Tabelle 10:** Tabellarische Darstellung der Versuche ISL 12 und ISL 13. Erstmalig wurden hier Munich-Mini-Pigs als Empfängertiere eingesetzt, beide Versuche mussten bereits nach 4 Tagen beendet werden, weil keine Graft-Funktion mehr nachweisbar war. Ü-Zeit = Überlebenszeit, MMF = Behandlung mit Mycophenolat - Mofetil.

Sowohl ISL 12 als auch ISL 13 mussten bereits nach vier Tagen beendet werden, weil keine Graft-Funktion mehr nachgewiesen werden konnte. In beiden Herzen zeigte sich eine akute humorale bedingte Abstoßung mit betont in subendokardialen Abschnitten nachweisbarer Endothelitis mit frischen Thrombosen und in der Nachbarschaft kleinfleckigen Myokardnekrosen, mit einem z.T. ausgeprägten interstitiellen Ödem und vereinzelt auch kleinfleckigen Blutungen. Die histopathologische Auswertung nach bisherigem Schema ist nachfolgend tabellarisch dargestellt.

	ISL 12	ISL 13
<b>Lymphozytäres Infiltrat</b>	-	-
<b>Vaskulopathie</b>	-	-
<b>Quilty – Effekt</b>	-	-
<b>Nekrosen</b>	+	+
<b>Entspricht ISHLT (für zelluläre Abstoßung)</b>	keine	keine
<b>Zusätzlich Ödem</b>	++	++
<b>Zusätzlich Endothelitis</b>	++	++

**Tabelle 11:** Tabellarische Darstellung der histopathologischen Auswertung der Versuche ISL 12 und ISL 13. Beide Herzen zeigten Zeichen einer akuten humoralen Abstoßung. Durchgeführt von Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München.

Aufgrund der akuten humoralen Abstoßungsreaktion, durch welche beide Versuche vorzeitig beendet werden mussten, änderten wir fortan das immunsuppressive Schema. Die bisherige Medikation, bestehend aus einer Einmalgabe Methylprednisolon (1 mg/kg KG i.v.) intraoperativ, sowie Tacrolimus (0,3 mg/kg KG i.m.) täglich für zehn Tage, blieb erhalten. Zusätzlich verabreichten wir jetzt 500 mg Mycophenolat Mofetil (MMF) i.v. intraoperativ sowie zweimal täglich 1000 mg MMF oral für die ersten zehn postoperativen Tage zur Erhaltung eines therapeutischen Blutspiegels. Die restlichen zehn Versuche wurden mit diesem Schema erfolgreich durchgeführt, eine akute humorale Abstoßung wurde nicht mehr beobachtet. Da aufgrund der hohen Komplikationsrate sowie der geringen verbleibenden Tierversuchszahl keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe bezüglich der Überlebenszeiten mehr zu erwarten waren, legten wir die maximale Überlebenszeit der Empfängertiere auf 18 Tage fest, um die histopathologischen Abstoßungszeichen und die TB4-Expression anhand der Kapillardichte gezielt vergleichen zu können. Eine Übersicht über diese Versuche gibt die nachfolgende Tabelle.

ERGEBNISSE

Versuch	Vektor	Ü-Zeit	Beendigungsgrund	Rasse Spender	Rasse Empfänger	MMF
<b>ISL 14</b>	AAV-2/9-LacZ	16	Schlechter Allgemeinzustand	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja
<b>ISL 15</b>	AAV-2/9-TB4	11	Tier verstarb plötzlich	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja
<b>ISL 16</b>	AAV-2/9-TB4	13	Schlechter Allgemeinzustand	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja
<b>ISL 17</b>	AAV-2/9-LacZ	18	Versuchsdauer von 18 Tagen erreicht	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja
<b>ISL 18</b>	AAV-2/9-LacZ	18	Versuchsdauer von 18 Tagen erreicht	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja
<b>ISL 19</b>	AAV-2/9-TB4	18	Versuchsdauer von 18 Tagen erreicht	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja
<b>ISL 20</b>	AAV-2/9-TB4	6	Keine Graft-Funktion mehr nachweisbar	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja
<b>ISL 21</b>	AAV-2/9-TB4	5	Schlechter Allgemeinzustand	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja
<b>ISL 22</b>	AAV-2/9-TB4	18	Versuchsdauer von 18 Tagen erreicht	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja
<b>ISL 23</b>	AAV-2/9-TB4	11	Keine Graft-Funktion mehr nachweisbar	Deutsche Landrasse	Munich-Mini-Pig	Ja

**Tabelle 12:** Tabellarische Darstellung der Versuche ISL 14 - ISL 23, bei welchen wir als zusätzliches Immunsuppressivum MMF verwendeteten. Zusätzlich wurde bei diesen Versuchen die maximale Überlebenszeit auf 18 Tage festgelegt. Ü-Zeit = Überlebenszeit, MMF = Behandlung mit Mycophenolat - Mofetil.

Insgesamt wurden 10 Herzen mit TB4 transduziert. ISL 13 konnte nicht in die Auswertung eingeschlossen werden, da nach nur 4 Tagen nicht mit einer Transgenexpression zu rechnen war. Bei ISL 9 waren sowohl das Spender- als auch das Empfängertier Schweine der deutschen Landrasse. Bei ISL 11 wurde ein

CD46/Gal-KO - doppeltransgenes Schweineherz in ein Schwein der deutschen Landrasse implantiert. Für die Versuche ISL 15, ISL 16 und ISL 19 - ISL 23 verwendeten wir als Spendertiere Schweine der deutschen Landrasse, als Empfängertiere Munich-Mini-Pigs.

Um die Versuchs- und Kontrollgruppen vergleichen zu können, sollte zuerst festgestellt werden, ob in beiden Gruppen statistisch gesehen die gleichen Bedingungen herrschten. Wir erhoben hierfür bei allen durchgeführten Versuchen folgende Parameter:

- Gewicht der Spender- und Empfängertiere
- Zirkulationszeit des Vektors
- Gesamtischämiezeit der transplantierten Organe
- Herzfrequenz während der Perfusionsphase

Alle Versuche fanden unter physiologischen Bedingungen statt, Parameter wie die Temperatur und die Anreicherung mit Sauerstoff und Kohlenstoffmonoxid wurden voreingestellt und waren bei allen Versuchen gleich. Die Einhaltung des physiologischen Bereichs wurde mittels Blutgasanalysen überwacht. Als entscheidenden Versuchsabschnitt sahen wir die Perfusionsphase mittels des in-situ Langendorff Modells an. Nachdem ISL 1 aufgrund einer unstillbaren Blutung während dieser Phase verstarb, konnte bei den 22 folgenden Versuchen eine komplikationsfreie Perfusion der Herzen erreicht werden. Einige der gemessenen Parameter, welche näher betrachtet werden sollen, sind nachfolgend tabellarisch dargestellt.

ERGEBNISSE

---

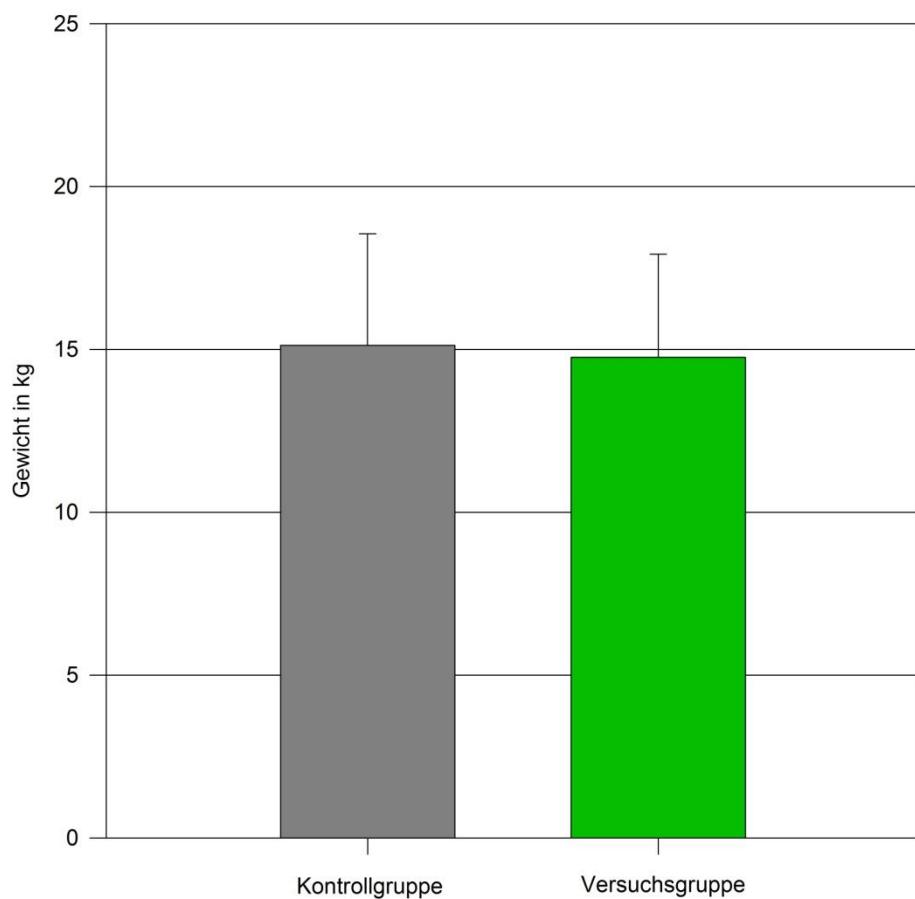
Versuch	Gen	Gewicht Spender (kg)	Gewicht Empfänger (kg)	Perfusions zeit (min)	Ischämie zeit (min)	Gewicht Spender herz (g)
<b>ISL 1</b>	#	19	#	#	#	#
<b>ISL 2</b>	LacZ	21,5	26,5	45	122	130
<b>ISL 3</b>	PD-L1	18,5	24	45	120	114
<b>ISL 4</b>	LacZ	18	26	52	127	116
<b>ISL 5</b>	PD-L1	13,2	29,5	46	95	89
<b>ISL 6</b>	PD-L1	16,5	37	45	102	102
<b>ISL 7</b>	LacZ	15,3	37,5	45	108	100
<b>ISL 8</b>	LacZ	12,5	20	45	200	85
<b>ISL 9</b>	TB4	14,5	18,5	43	202	94
<b>ISL 10</b>	LacZ	14,5	18,5	45	190	86
<b>ISL 11</b>	TB4	14,5	19,5	45	180	89
<b>ISL 12</b>	LacZ	13	21,3	51	132	70
<b>ISL 13</b>	TB4	18,5	26,5	45	250	128
<b>ISL 14</b>	LacZ	17,8	34,5	50	195	124
<b>ISL 15</b>	TB4	12,3	28,5	45	225	135
<b>ISL 16</b>	TB4	12,7	30	45	230	94
<b>ISL 17</b>	LacZ	10,5	24,5	45	231	76
<b>ISL 18</b>	LacZ	13	23,2	45	225	83
<b>ISL 19</b>	TB4	10,7	16,4	48	320	72
<b>ISL 20</b>	TB4	12,4	22	47	247	85
<b>ISL 21</b>	TB4	11	28	46	231	79
<b>ISL 22</b>	TB4	16	17,5	45	255	102
<b>ISL 23</b>	TB4	21	20,5	46	245	130

**Tabelle 13:** Darstellung einiger für den Versuchserfolg möglicherweise wichtiger Versuchsparameter, welche im Folgenden näher untersucht werden sollen.

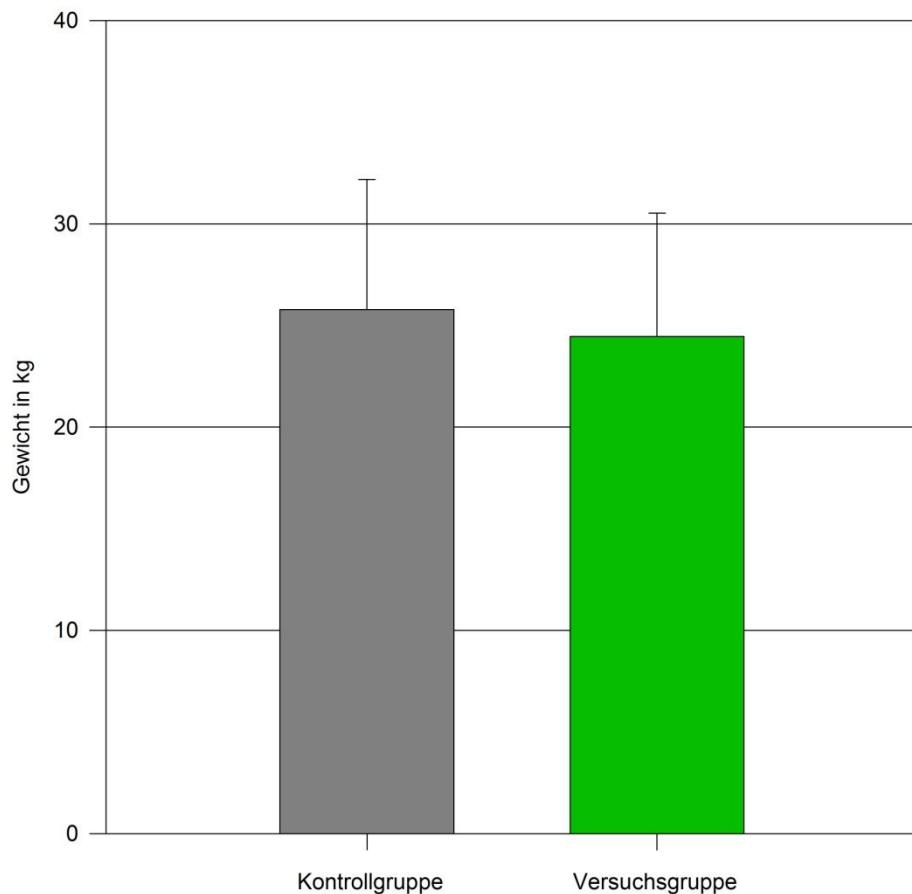
## Gewicht der Versuchstiere

Im Durchschnitt betrug das Körpergewicht der Spendertiere 15,08 kg ( $\pm 1,40$ ), die Empfängertiere wogen durchschnittlich 25,00 kg ( $\pm 2,70$ ) und damit deutlich mehr. Es sollten dadurch bessere operative Bedingungen erreicht werden, da aufgrund der etwas größeren abdominalen Empfängergefäße die Anastomosierung mit dem Spenderherz einfacher durchzuführen war.

Da sich durch die Auswahl geeigneter Spender- und Empfängertiere ein möglicherweise ein Vorteil ergeben kann, sollte untersucht werden, ob sich das Körpergewicht der Tiere in der Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant unterscheiden.



**Abbildung 27:** Darstellung des mittleren Körpergewichts der Spendertiere in Versuchs- und Kontrollgruppe. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,798$ ; T-Test).

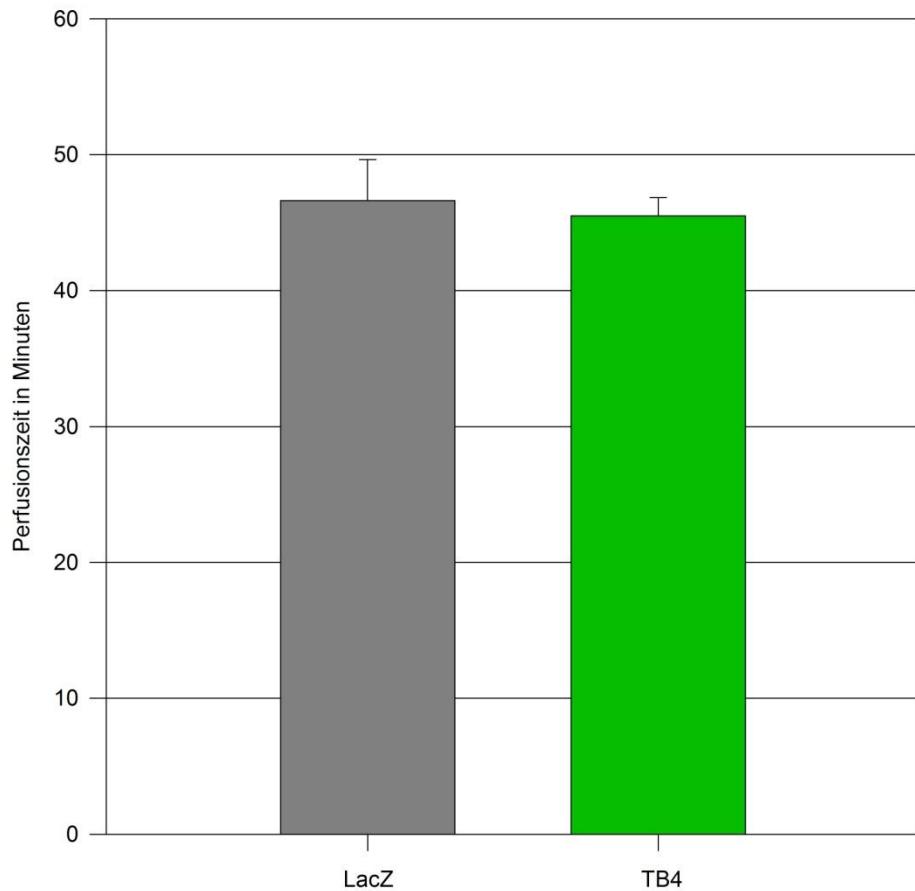


**Abbildung 28:** Darstellung des mittleren Körpergewichts der Empfängertiere in Versuchs- und Kontrollgruppe. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,628$ ; T-Test).

Sowohl bei den Spender- als auch bei den Empfängertieren konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Versuchsgruppe bezüglich des Körpergewichts festgestellt werden. Ein möglicher Vorteil einer Gruppe diesbezüglich konnte hiermit ausgeschlossen werden ( $p = 0,628$ ).

### Vektorperfusionszeit

Es sollte eine Mindestperfusionszeit der Vektoren von 45 Minuten erreicht werden. Da eine längere Perfusionszeit einen möglichen Vorteil darstellen könnte, sollte untersucht werden, ob diesbezüglich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht.

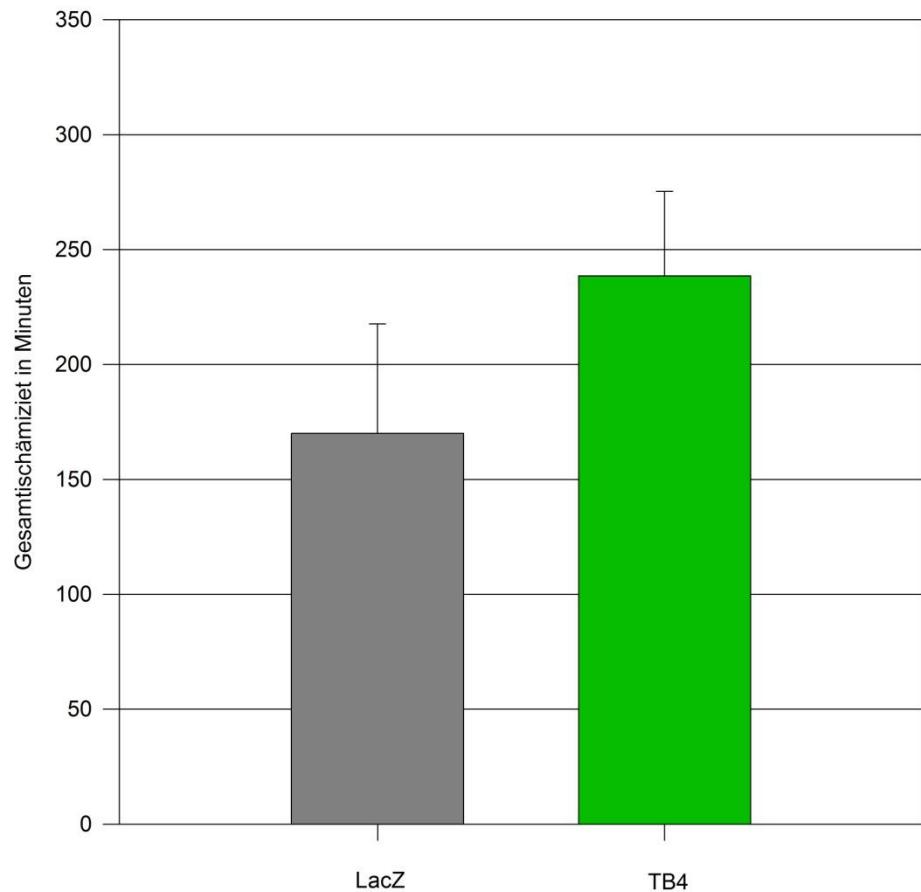


**Abbildung 29:** Darstellung des mittleren Körpergewichts der Spendertiere in Versuchs- und Kontrollgruppe. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,306$ ; T-Test).

Die mittlere Perfusionszeit betrug in der Kontrollgruppe 46,63 ( $\pm$  3,02) Minuten, in der Versuchsgruppe 45,50 ( $\pm$  1,35) Minuten. Statistisch gesehen unterscheiden sich beide Gruppen nicht ( $p = 0,306$ ).

### Gesamtischämiezeit der Spenderorgane

Die Gesamtischämiezeit der transplantierten Organe wurde gemessen als Zeit zwischen Kardioplegie und Reperfusion im Empfängerabdomen. Fraglich war, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen besteht.

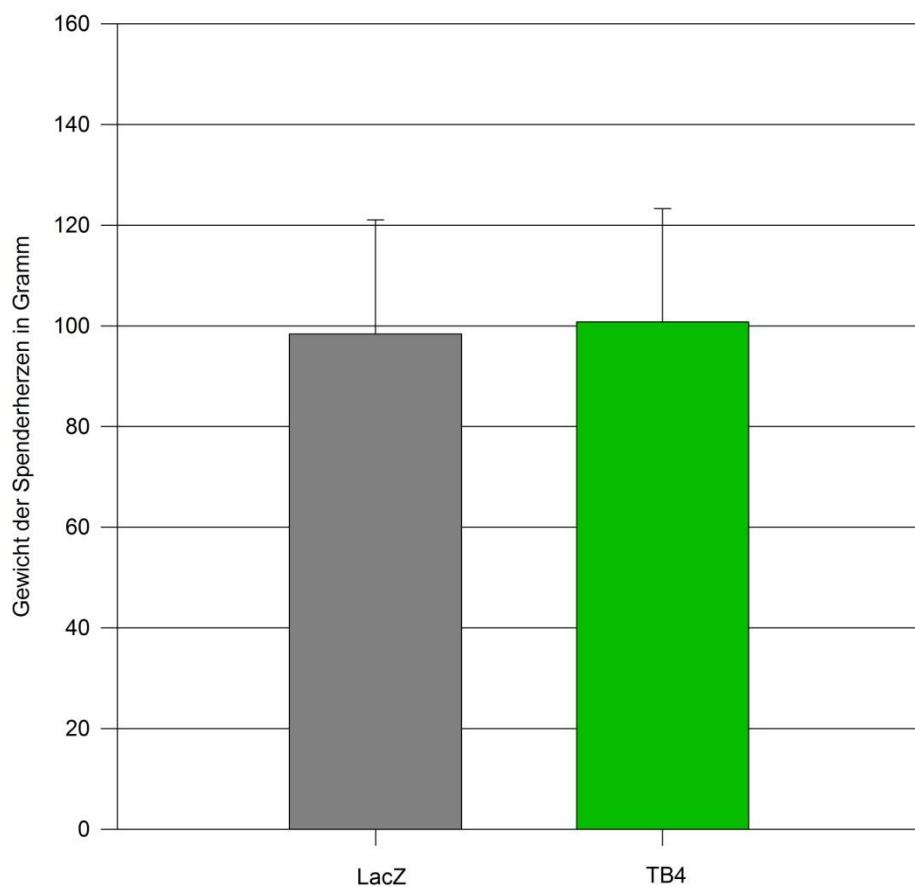


**Abbildung 30:** Darstellung der mittleren Gesamtischämiezeiten in Versuchs- und Kontrollgruppe. Im Schnitt waren die Herzen der Versuchsgruppe einer signifikant längeren Ischämiezeit ausgesetzt ( $p = 0,003$ ; T-Test)

Die mittlere Ischämiezeit der Spenderorgane betrug in der Kontrollgruppe 170,00 ( $\pm 47,58$ ) Minuten, in der Versuchsgruppe betrug die Ischämiezeit durchschnittlich 238,50 ( $\pm 36,86$ ) Minuten. Es besteht ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,003$ ) zwischen den beiden Gruppen zu Ungunsten der Versuchsgruppe.

## Gewicht der Spenderherzen

Die Größe des Spenderherzens könnte positive oder negative Effekte auf den Versuchsausgang haben. So stellt sich ein im Verhältnis zum Empfängerabdomen relativ großes Herz als schwieriger zu implantieren dar als ein entsprechend kleineres, jedoch wäre es denkbar, dass ein größeres Herz die neuen Blutdruckverhältnisse besser tolerieren kann. Es soll hiermit überprüft werden, ob bezüglich des Herzgewichts ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht.



**Abbildung 31:** Darstellung des mittleren Körpergewichts der Spendertiere in Versuchs- und Kontrollgruppe. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,824$ ; T-Test).

Das mittlere Spenderherzgewicht beträgt in der Kontrollgruppe 98,38 ( $\pm 22,70$ ) g, in der Versuchsgruppe 100,80 ( $\pm 22,48$ ) g. Es besteht kein signifikanter Unterschied.

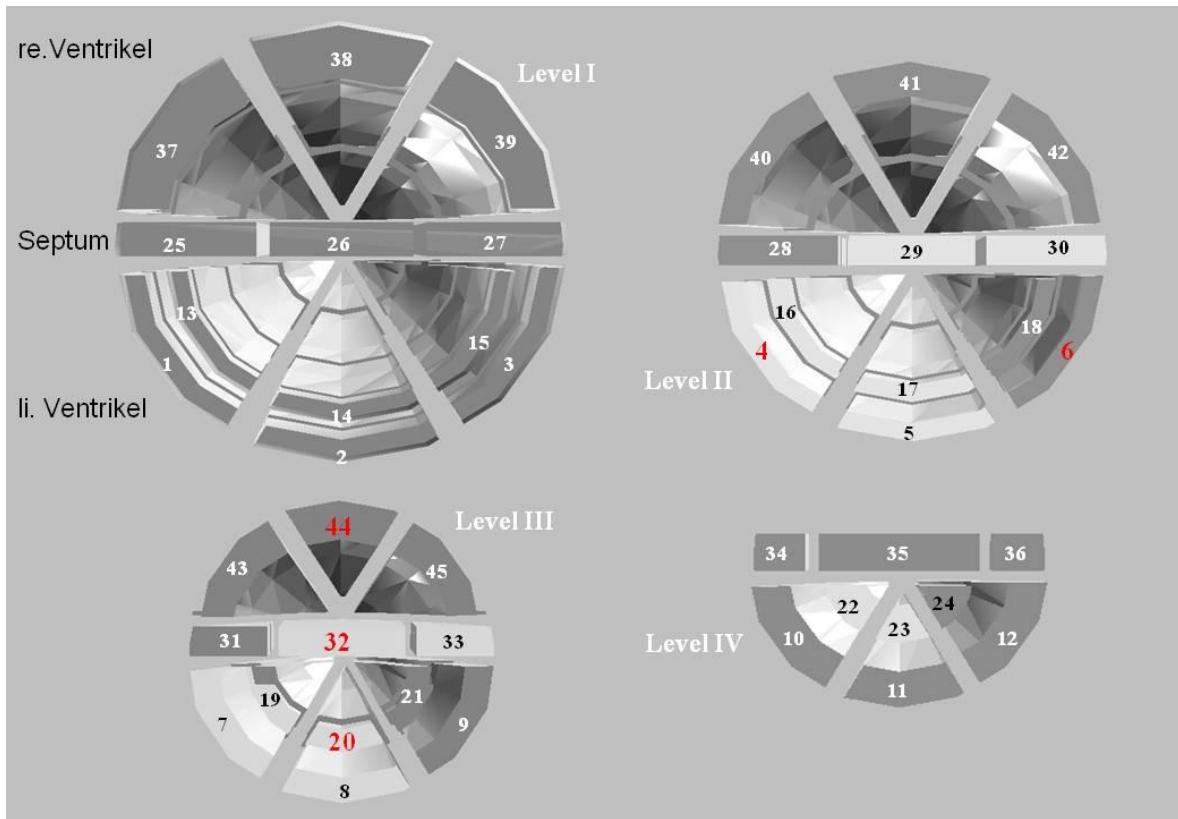
## **Fazit**

Die oben gezeigten Analysen zeigen, dass sich die LacZ-Kontrollgruppe und die TB4-Versuchsgruppe in fast allen Parametern statistisch nicht signifikant unterscheiden.

Die Gesamtischämiezeit der Spenderorgane jedoch war in der Versuchsgruppe signifikant länger (238,50 ( $\pm$  36,86) zu 170,00 ( $\pm$  47,58) Minuten), was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

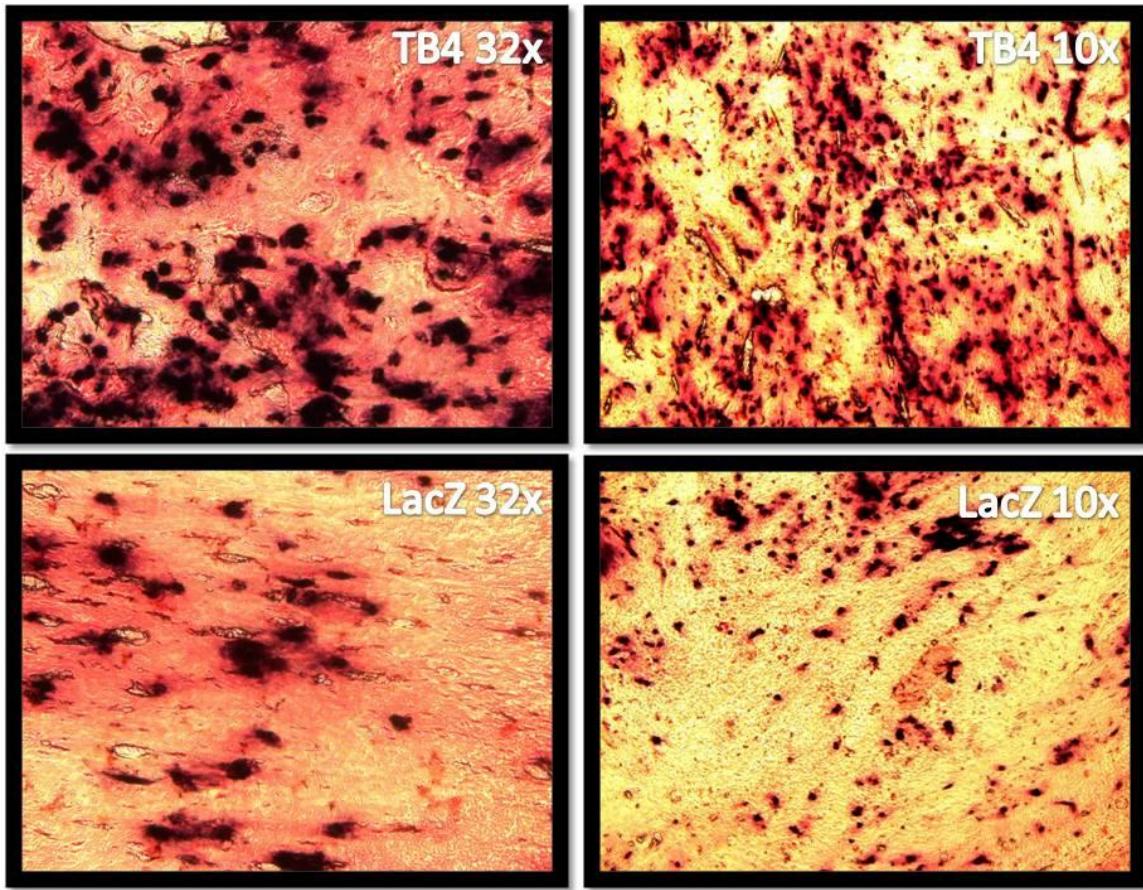
## **Untersuchung der Kapillardichte**

Zur Untersuchung der durch TB4 hervorgerufenen Neoangiogenese wurden aus jeweils fünf der 45 Herzsegmente Schnitte angefertigt und die Kapillaren mittels AP-Färbung sichtbar gemacht. Wir verwendeten hierzu die Segmente 4, 6 (linker Ventrikel, Epikard), 20 (linker Ventrikel, Endokard), 32 (Ventrikelseptum) und 44 (rechter Ventrikel).



**Abbildung 32:** Darstellung des Dissektionsschemas. Die für die Messung der Kapillaranzahl herangezogenen Segmente sind rot beschriftet.

Mikroskopisch wurden jeweils vier Bildausschnitte in 10- und 32-facher Vergrößerung begutachtet und die Anzahl der angeschnittenen Kapillaren gezählt. Um ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen, wurde die Kapillaranzahl der jeweiligen vier Bildausschnitte gemittelt und mit entsprechend ausgewerteten Schnitten aus der Kontrollgruppe verglichen. Unten dargestellt sind AP-Färbungen aus der Versuchs- und Kontrollgruppe, jeweils in 10- und 32-facher Vergrößerung abgelichtet.



**Abbildung 33:** Demonstration der AP-Färbung anhand von zwei Beispielen aus der Kontroll- und der Versuchsgruppe. Die beiden oberen Schnitte stammen aus ISL 19 (TB4), die beiden Unterer aus ISL 18 (LacZ), jeweils aus Segment 44.

Die Ergebnisse der Kapillarauszählung sind nachfolgend tabellarisch dargestellt.

### Anzahl der Kapillaren, 32-fache Vergrößerung

	4	6	20	32	44
<b>ISL 4</b>	37,5	46	34	29,5	45,75
<b>ISL 7</b>	29,25	19,25	35,5	21	42,5
<b>ISL 8</b>	32	23,75	32,2	21,5	44,25
<b>ISL 9</b>	33,5	29,5	36	31	34,5
<b>ISL 10</b>	34,5	31	38	31	55
<b>ISL 11</b>	92,5	70,75	103	115	99,5
<b>ISL 14</b>	0	0	0	0	0
<b>ISL 15</b>	62,75	58,5	46	35,75	58,25
<b>ISL 16</b>	32	48,25	48,25	37,5	59,5
<b>ISL 17</b>	56,5	29,75	45	37,25	60,25
<b>ISL 18</b>	28,75	49,75	48,5	39	41,5
<b>ISL 19</b>	111,25	99	106	103	139,25
<b>ISL 20</b>	75	105,25	46,75	37,25	60,5
<b>ISL 21</b>	96,75	65,5	62,5	60,25	46
<b>ISL 22</b>	83,25	76,25	96,25	75	138,25
<b>ISL 23</b>	78,75	84	66,5	66	75

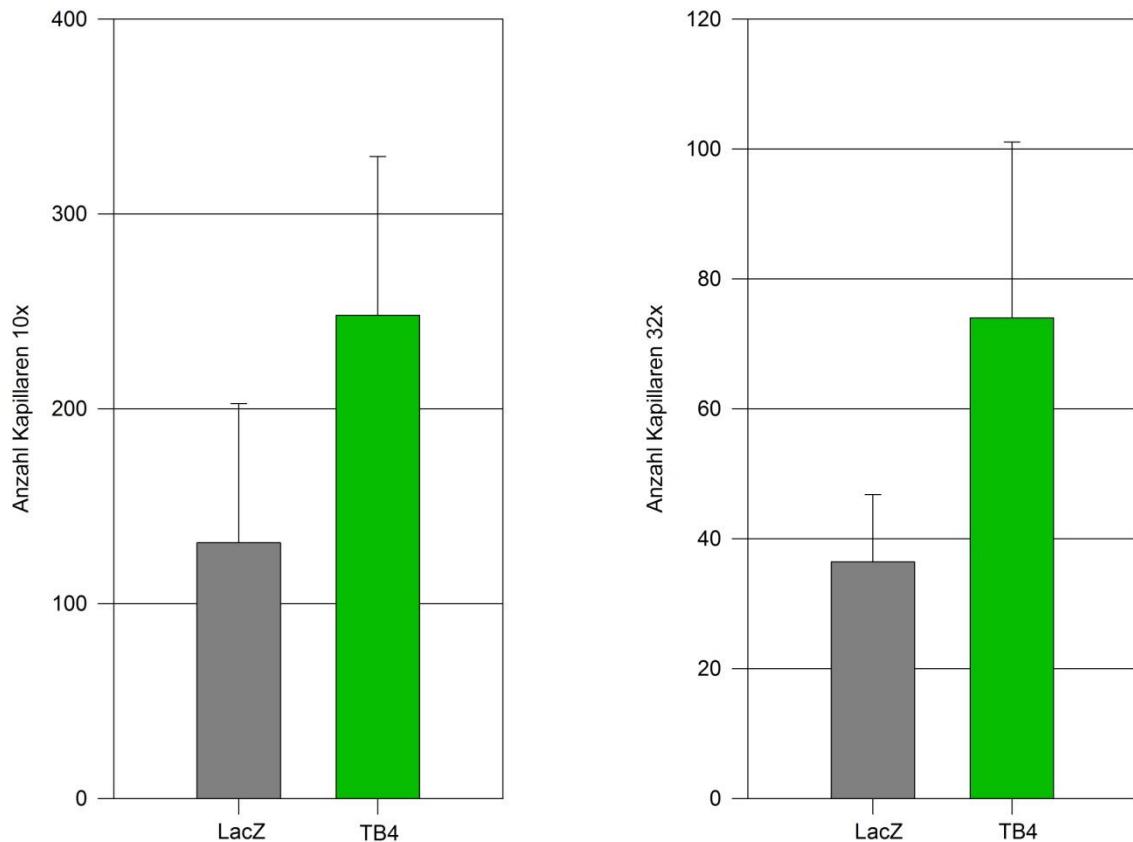
**Tabelle 14:** Darstellung der aus jeweils vier Schnitten gemittelten Kapillaranzahl in den Segmenten 4, 6, 20, 32 und 44 unter 32-facher Vergrößerung. Bei ISL 14 konnten aufgrund des vollkommen nekrotischen Grafts keine verwertbaren Färbungen angefertigt werden.

Anzahl Kapillaren 10-fache Vergrößerung					
	4	6	20	32	44
ISL 4	95,75	108	94	121	86,75
ISL 7	93,75	80,75	83,25	82,5	103,75
ISL 8	92,2	93,75	96	83	115,5
ISL 9	212,25	187	111,25	136	136,25
ISL 10	95	81,25	82,5	101	84,8
ISL 11	315,5	293,75	398,5	312	305,25
ISL 14	0	0	0	0	0
ISL 15	244,5	232	230,25	208,25	157,75
ISL 16	138	263,25	229,75	204,5	237,75
ISL 17	272,5	121,5	220,5	200,25	235,5
ISL 18	138	260	285,25	252	168,5
ISL 19	365	395	374,5	418	501,5
ISL 20	155,25	214,25	253,25	233,25	230,25
ISL 21	251,5	230	231,5	210	168,5
ISL 22	350,5	325	240	240	314
ISL 23	199,5	272,5	199	207,5	197

**Tabelle 15:** Darstellung der aus jeweils vier Schnitten gemittelten Kapillaranzahl in den Segmenten 4, 6, 20, 32 und 44 unter 10-facher Vergrößerung. Bei ISL 14 konnten aufgrund des vollkommen nekrotischen Grafts keine verwertbaren Färbungen angefertigt werden.

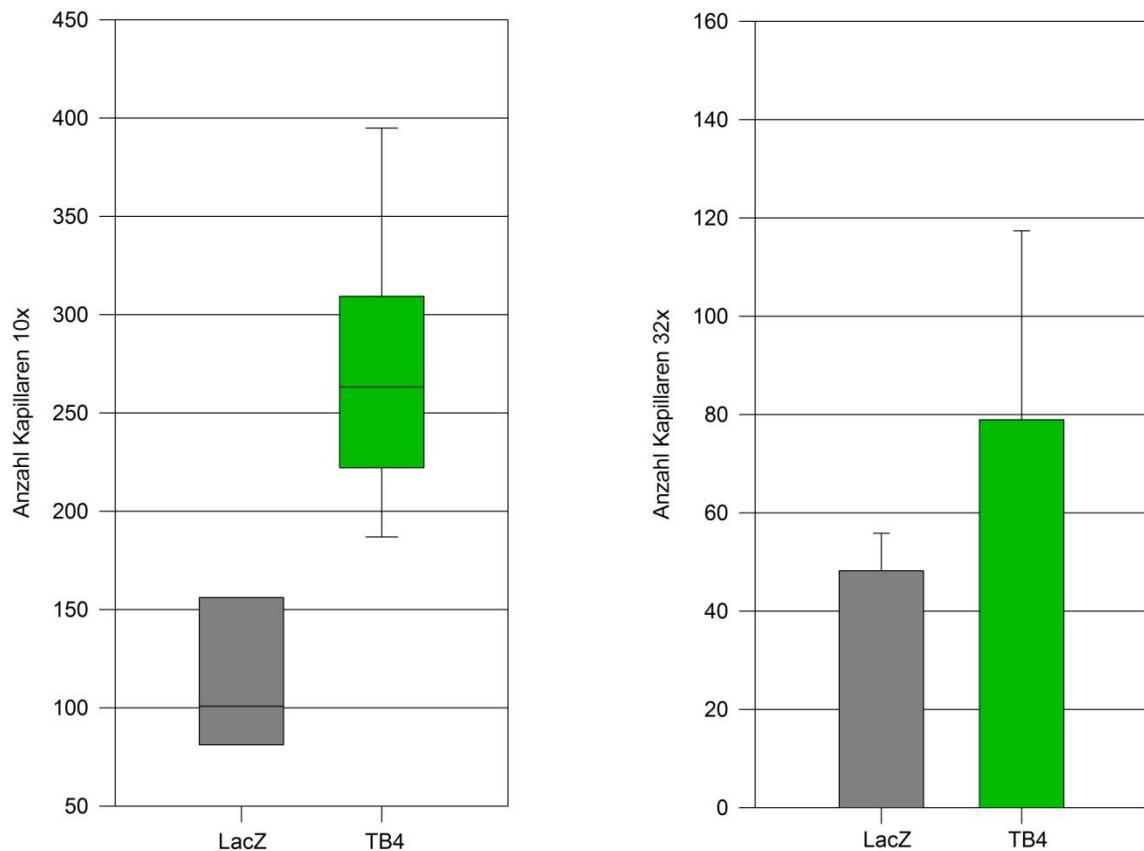
Bei der Versuchsauswertung von ISL 14 zeigte sich ein vollkommen nekrotisches Herz. Es konnten keine verwertbaren Schnitte angefertigt werden, weshalb es in die folgende Auswertung nicht mit einbezogen wird. Bei ISL 11 handelte es sich um ein CD46/Gal-KO - transgenes Spendertier. Unter 3.1 konnte anhand von ISL 9 gezeigt werden, dass auch hier eine Transduktion sicher möglich ist, weshalb dieser Versuch in die Auswertung eingeschlossen wurde. Wir nahmen zudem an, dass die Wahl des

Empfängertiers (Deutsche Landrasse oder Munich-Mini-Pig) keinen Einfluss auf die Transgenexpression hat, weshalb wir die jeweiligen Versuche zu einer Gruppe zusammenfassten.

**Mittlere Kapillaranzahl Segment 4**

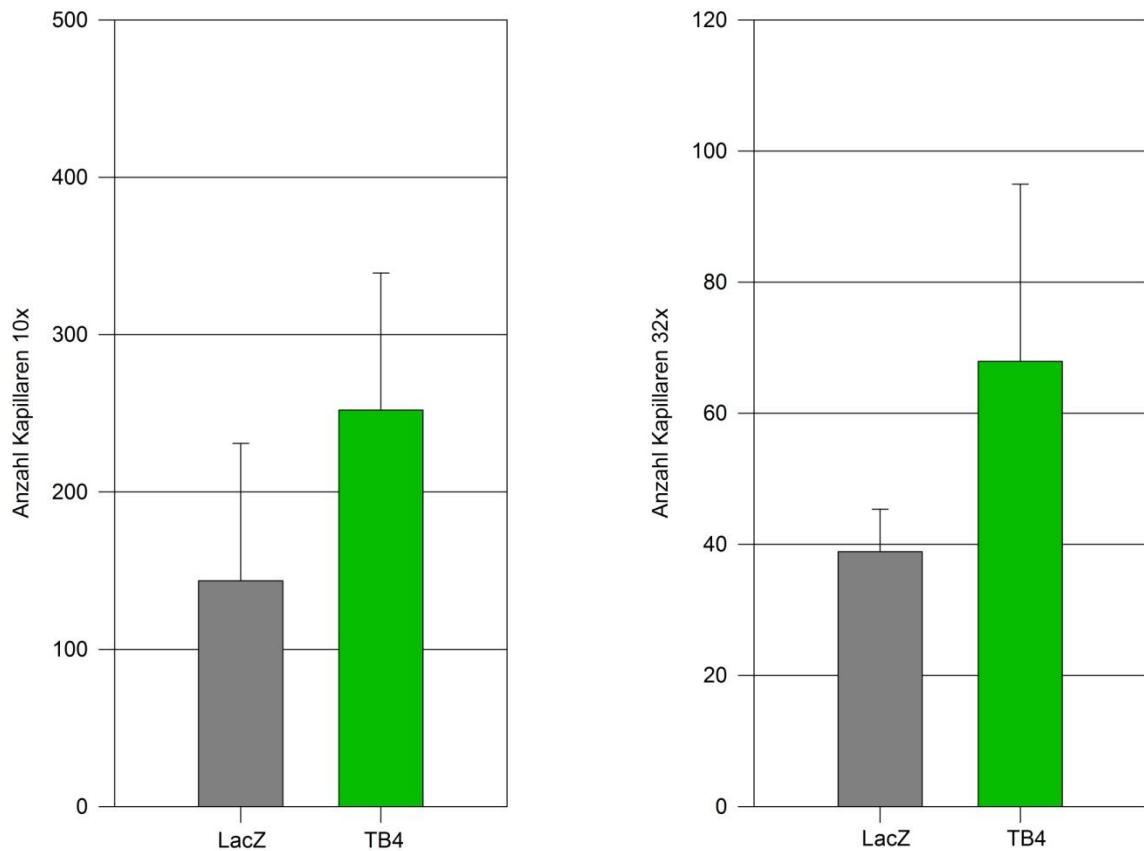
**Abbildung 34:** Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment vier. Sowohl unter 10-facher (links) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe ( $n = 9$ ) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe ( $n = 6$ ), T-Test.

Unter 10-facher Vergrößerung betrug die mittlere Kapillaranzahl in der Kontrollgruppe 131,20 ( $SD \pm 71,42$ ) und in der Versuchsgruppe 248,00 ( $SD \pm 81,48$ ). Unter 32-facher Vergrößerung konnten im Mittel in der Versuchsgruppe 73,97 ( $SD \pm 27,13$ ) und in der Kontrollgruppe 36,42 ( $SD \pm 10,37$ ) Kapillaren gezählt werden. Sowohl unter 10-facher ( $p = 0,014$ ) als auch unter 32-facher Vergrößerung ( $p = 0,007$ ) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe signifikant höher.

**Mittlere Kapillaranzahl Segment 6**

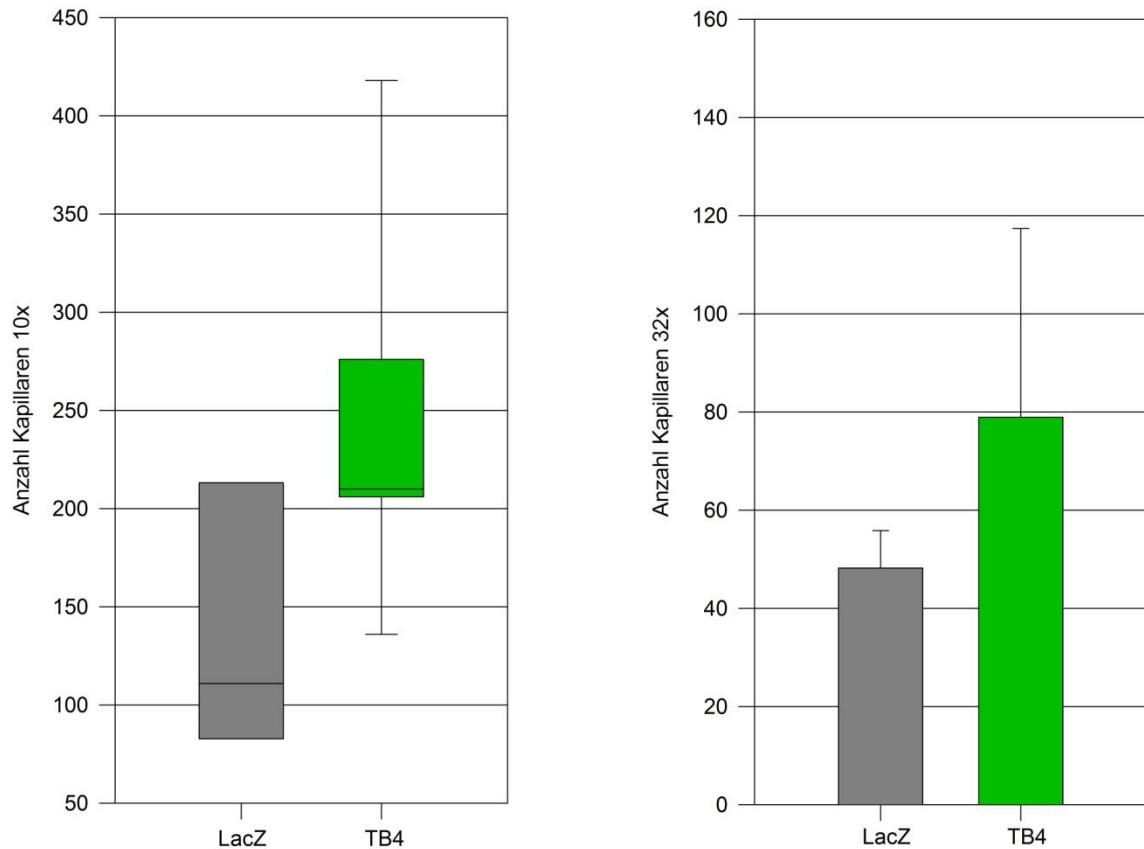
**Abbildung 35:** Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment 6. Sowohl unter 10-facher (links, Mann-Whitney Rank Sum Test) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts, T-Test) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe ( $n = 9$ ) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe ( $n = 6$ ).

Unter 10-facher Vergrößerung war die mittlere Kapillaranzahl nicht normalverteilt. Der Median lag in der Kontrollgruppe bei 100,88, in der Versuchsgruppe bei 263,25. Unter 32-facher Vergrößerung konnten im Durchschnitt in der Versuchsgruppe 70,78 ( $SD \pm 23,93$ ) und in der Kontrollgruppe 33,25 ( $SD \pm 12,15$ ) Kapillaren gezählt werden. Sowohl unter 10-facher ( $p = 0,008$ ) als auch unter 32-facher Vergrößerung ( $p = 0,004$ ) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe signifikant höher.

**Mittlere Kapillaranzahl Segment 20**

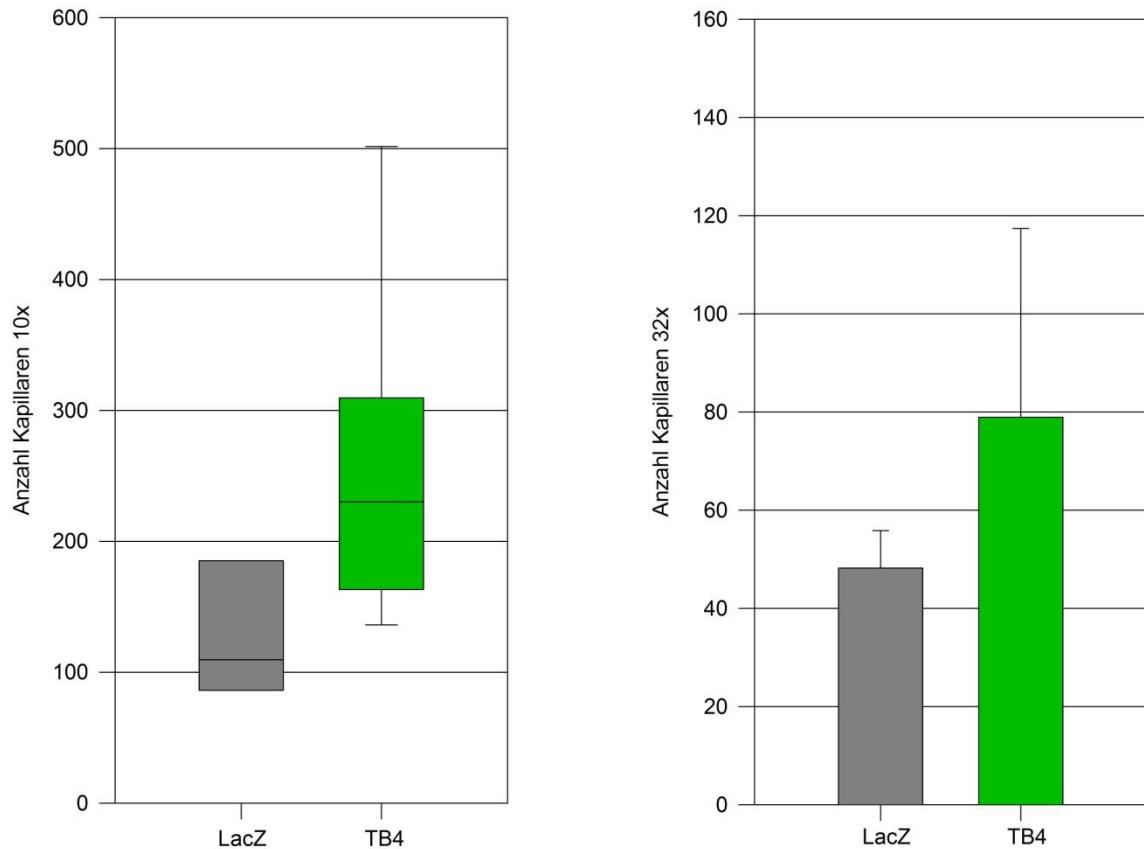
**Abbildung 36:** Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment 6. Sowohl unter 10-facher (links) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe ( $n = 9$ ) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe ( $n = 6$ ), T-Test.

Unter 10-facher Vergrößerung betrug die mittlere Kapillaranzahl in der Kontrollgruppe 143,58 ( $SD \pm 87,27$ ) und in der Versuchsgruppe 252,00 ( $SD \pm 87,05$ ). Unter 32-facher Vergrößerung konnten im Mittel in der Versuchsgruppe 67,92 ( $SD \pm 27,04$ ) und in der Kontrollgruppe 38,87 ( $SD \pm 6,49$ ) Kapillaren gezählt werden. Sowohl unter 10-facher ( $p = 0,035$ ) als auch unter 32-facher Vergrößerung ( $p = 0,024$ ) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe signifikant höher.

**Mittlere Kapillaranzahl Segment 32**

**Abbildung 37:** Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment 32. Sowohl unter 10-facher (links, Mann-Whitney Rank Sum Test) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts, T-Test) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe ( $n = 9$ ) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe ( $n = 6$ ).

Unter 10-facher Vergrößerung war die mittlere Kapillaranzahl nicht normalverteilt. Der Median lag in der Kontrollgruppe bei 111,00 und in der Versuchsgruppe bei 210,00. Unter 32-facher Vergrößerung konnten im Mittel in der Versuchsgruppe 62,31 ( $SD \pm 30,70$ ) und in der Kontrollgruppe 29,88 ( $SD \pm 7,59$ ) Kapillaren gezählt werden. Sowohl unter 10-facher ( $p = 0,029$ ) als auch unter 32-facher Vergrößerung ( $p = 0,026$ ) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe signifikant höher.

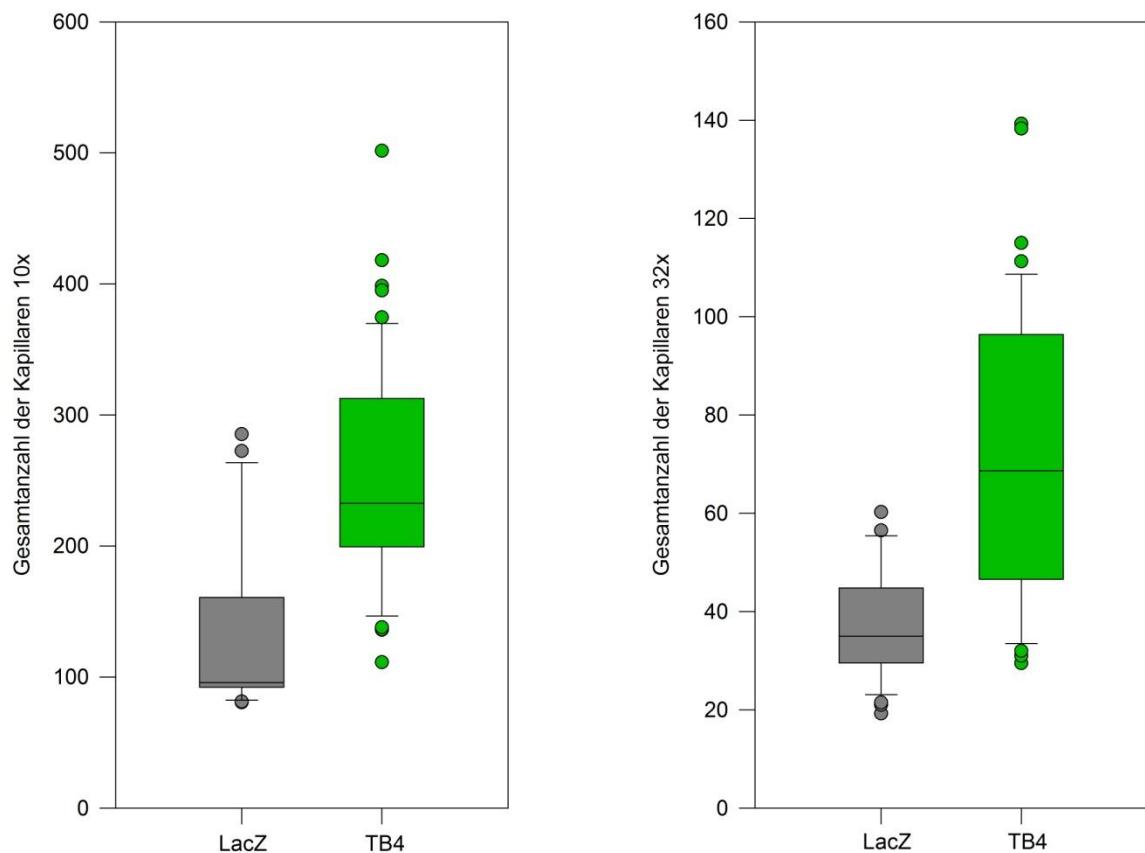
**Mittlere Kapillaranzahl Segment 44**

**Abbildung 38:** Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment 44. Unter 10-facher Vergrößerung (links, Mann-Whitney Rank Sum Test) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe ( $n = 9$ ) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe ( $n = 6$ ). Unter 32-facher Vergrößerung (rechts, T-Test) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

Unter 10-facher Vergrößerung war die mittlere Kapillaranzahl nicht normalverteilt. Der Median lag in der Kontrollgruppe bei 109,625 und in der Versuchsgruppe bei 230,25. Unter 32-facher Vergrößerung konnten im Mittel in der Versuchsgruppe 78,97 ( $SD \pm 38,40$ ) und in der Kontrollgruppe 48,21 ( $SD \pm 7,62$ ) Kapillaren gezählt werden. Unter 10-facher Vergrößerung konnte in der TB4-Gruppe eine signifikant höhere ( $p = 0,025$ ) Kapillaranzahl als in der LacZ-Gruppe gezählt werden, unter 32-facher Vergrößerung war dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,078$ ).

## Fazit Kapillarauswertung

Bis auf das Segment 44, betrachtet in 32-facher Vergrößerung, konnte in allen Segmenten der TB4-Gruppe eine signifikant höhere Kapillaranzahl als in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Fasst man alle Segmente der jeweiligen Gruppe zusammen, ergibt sich folgendes Bild:



**Abbildung 39:** Vergleich der Gesamtkapillaranzahl aus Versuchs- und Kontrollgruppe. Sowohl unter 10-facher (links) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts) waren die Daten nicht normalverteilt. In beiden Fällen war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe ( $n = 45$ ) im Vergleich zur LacZ-Gruppe ( $n = 30$ ) signifikant größer ( $p = 0,001$ ), Mann-Whitney Rank Sum Test.

Die Kapillaranzahl ist bei Zusammenfassung der jeweiligen Segmente innerhalb der Versuchs- und Kontrollgruppe nicht normalverteilt (Shapiro-Wilk Test). Der Median beträgt in der Versuchsgruppe unter 10-facher Vergrößerung 232,63, in der Kontrollgruppe liegt dieser bei 95,88 und ist damit hochsignifikant geringer ( $p = 0,001$ ). Unter 32-facher Vergrößerung beträgt der Median in der LacZ-Gruppe 35,00 und in der TB4-Gruppe 68,63. Auch hier ist die Kapillaranzahl in der Versuchsgruppe hochsignifikant größer ( $p = 0,001$ ). Mann-Whitney Rank Sum Test.

## 4. Diskussion

### 4.1 Erstes Hauptziel

Der erste Teil dieser Forschungsarbeit bestand darin, den rekombinanten Adeno-Assoziierten-Virus 2/9 als Vektor für unsere Transduktionsversuche zu etablieren. Dabei wurden an den Vektor folgende Anforderungen gestellt:

- Sehr hohe Transduktionsrate
- Kardioselektivität
- Apathogenität
- Keine Immunreaktion

Das *in-situ* Langendorff-Perfusionssystem, welches wir für die Transduktionsversuche verwendeten, wurde in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und von A. Schulz im Rahmen Ihrer Dissertation etabliert und erstmalig beschrieben [Schulz, 2009]. Damals wurde AAV-2 als Vektor verwendet. Die für diese Arbeit durchgeführten Transduktionen fanden ebenfalls unter Normoxämie, Normothermie, Normotonie und Normokapnie statt, da nach aktuellem Stand der Wissenschaft hierunter die besten Ergebnisse zu erwarten waren. Aufgrund der stabilen Funktionsweise der Herzen in der Perfusions- und Transduktionsphase konnten wir in allen Versuchen eine Vektorzirkulationszeit von mindestens 45 Minuten erreichen. In den vorherigen Versuchen waren es lediglich 30 Minuten. Es ist davon auszugehen, dass durch eine längere Zirkulationszeit eine höhere Transduktionsrate erreicht wird. Des Weiteren wurde in einem der von Schulz et al. durchgeführten Experimente versucht, die Vektoraufnahme durch die Zugabe von Histamin zu erhöhen. Da dies der einzige Versuch war, bei dem hinterher eine Genexpression nachgewiesen werden konnte, wurde empfohlen, zukünftig vor jeder Vektorgabe Histamin zu verabreichen, da es durch die Erhöhung der Endothelzellpermeabilität eine effektivere Endozytose des Vektors ermöglicht. Wir verwendeten anstelle von

Histamin jedoch VEGF, welches eine deutlich größere Potenz besitzt, die Permeabilität mikrovaskulärer Endothelzellen zu erhöhen [Matsune *et al.*, 2010; Orlova *et al.*, 2006]. Wir konnten in allen Versuchen der Kontrollgruppe  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität nachweisen, wobei wir allerdings keine Versuche ohne eine VEGF-Gabe durchführten und somit unklar bleibt, inwieweit die von uns erreichte sehr gute Transduktion durch den rAAV-2/9 von VEGF beeinflusst wird. Die Entscheidung, einen rekombinanten Virus-Vektor, bestehend aus den AAV-2 ITRs und dem AAV-9 Kapsid, zu verwenden, begründete sich auf den Ergebnissen verschiedener Studien, welche Hinweise darauf lieferten, dass mit diesem Vektor der beste Kardiomyotropismus zu erreichen ist [Bish *et al.*, 2008; Inagaki *et al.*, 2006; Pacak *et al.*, 2006]. Mittlerweile wurden zahlreiche Studien publiziert, in welchen über ähnlich gute Ergebnisse bezüglich der Transduktion von Herzgewebe bei Verwendung des AAV-9 Kapsids berichtet werden. Prasad *et al.* konnten bei der systemischen Gabe von lediglich  $3,15 \times 10^{10}$  Viruspartikeln in junge Mäuse eine 96%ige Transduktionsrate des Myokards erzielen. Zusammen mit dem verwendeten cTnT-Promoter (kardiales Troponin T) war der AAV-9 zudem extrem kardioselektiv: In den Herzen fand sich eine bis zu 640-fach höhere Genexpression als im am zweitbesten transduzierten Organ, der Leber [Prasad *et al.*, 2011]. In einem heterotopen Rattenherz-Transplantationsmodell konnten LacZ-Expressionsraten von immerhin über 70 % erreicht werden, allerdings wurden die Herzen mit AAV-9-CMV und 4°C kalter Lösung perfundiert [Miyagi *et al.*, 2008].

Es werden zudem immer neuere Methoden und Modifikationen getestet, welche eine spezifischere und höhere Transgenexpression ermöglichen sollen. Wenn die Transduktion mittels Adeno-Assoziierter-Virus-Vektoren erfolgen soll, besteht die einfachste Möglichkeit in der Wahl des für den gewünschten Gewebetyp effektivsten Serotyps. Wir haben in unserem Modell mit dem rAAV-2/9 sehr gute Ergebnisse bei der Transgenexpression in porcinen Kardiomyozyten erreichen können, andere Arbeitsgruppen berichten neuerdings, dass sie mit scAAV-2/6 und scAAV-2/8 bessere Ergebnisse als mit scAAV-2/9 erzielen konnten [Gao *et al.*, 2011; McCarty, 2008; White *et al.*, 2011]. Als scAAV (self-complimentary AAV) bezeichnet man doppelsträngige Vektorgenome, welche im Vergleich zu ssAAV (single-stranded AAV) den Vorteil haben, dass sie eine frühere und stärkere Transgenexpression

---

aufweisen [Hirsch et al., 2010]. Nachteilig hingegen ist, dass durch die Doppelsträngigkeit der für das Transgen zur Verfügung stehende Platz nur noch halb so groß ist [McCarty, 2008]. Eine mögliche Lösung für dieses Problem publizierten vor kurzem Ma et al.: Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich Hepatozyten 5-10-fach stärker mit ssAAV-2 transduzieren ließen, wenn zeitgleich scAAV-2-PP5 im Verhältnis 10:1 hinzugegeben wurde. Es wird postuliert, dass sich diese Technik auf jeden ssAAV anwenden lässt, der zu groß ist, um ihn als scAAV herzustellen [Ma et al., 2011]. Eine weitere Möglichkeit auf die Gewebespezifität und Transduktionsrate der AAV-Vektoren Einfluss zu nehmen besteht in der Wahl eines geeigneten Promotors. Als derzeit am Geeignetsten scheint cardiales Troponin T (cTnT) zu sein [Prasad et al., 2011]. Durch das sogenannte Detargeting lässt sich die Transgenexpression in nicht gewünschtem Gewebe bei systemischer Vektorapplikation deutlich verringern. So war nach Implementierung der leberspezifischen microRNA-122 in die 3'-UTR (untranslated region) von AAV ein Rückgang der LacZ-Expression in der Leber um den Faktor 70 zu beobachten [Qiao et al., 2011]. An der Berliner Charité kam man zu ähnlichen Ergebnissen, zudem ermögliche diese Technik bei Verwendung des AAV-9 eine höhere Kardiospezifität als ein CMV-Promotor [Geisler et al., 2011]. Eine andere Möglichkeit des Detargeting stellt die Verwendung von AAV-Kapsid Mutationen dar. Laut Pulicherla et al. weisen die AAV-9 Mutationsvarianten 9.45 und 9.61 eine um 10-25-fach geringere Expression in der Leber bei gleichbleibender Expression im Herzmuskelgewebe auf [Pulicherla et al., 2011]. Einen ganz anderen Ansatz wählten Müller et al.: Sie verpackten AAV-9-Vektoren in kleinen Bläschen, sogenannten „microbubbles“, injizierten diese den als Versuchstiere verwendeten Ratten intravenös und brachten die Bläschen mittels speziellem Ultraschall über den Herzen zum platzen. Die so herbeigeführte hohe Vektorkonzentration in der Herzregion führte zu einer 6-20-fach höheren Markergenexpression verglichen mit der Kontrollgruppe [Muller et al., 2008].

Einen negativen Effekt auf die Transgenexpression könnte Mycophenolat - Mofetil haben, welches wir ab dem Versuch ISL 14 als Immunsuppressivum einsetzten. Wie erst kürzlich veröffentlicht wurde, verhindert MMF eine effektive Transduktion mittels ssAAV, indem es durch die Hemmung der de-novo-Purinsynthese die Bildung von

---

Doppelstrang-DNA blockiert. Der Effekt konnte durch die Gabe von Guanosin rückgängig gemacht werden [Montenegro-Miranda *et al.*, 2011]. Es ist fraglich, ob das MMF auch unsere Transduktionen beeinflusst haben könnte, da die erste Gabe intravenös während der Implantationen stattfand, der Vektor zuvor jedoch im in-situ Langendorff-Perfusionssystem für mindestens 45 Minuten durch die Herzen zirkulieren konnte. Um eine Beeinflussung durch Mycophenolatmofetil zu verhindern, sollte in den folgenden Versuchen bei Verwendung von ssAAV-Vektoren den Empfängertieren zusätzlich zum MMF Guanosin gegeben werden bzw. möglichst doppelsträngige AAV verwendet werden.

### **Fazit**

Obwohl wir mit dem AAV-2/9 sehr gute Ergebnisse erzielen konnten, existieren mittlerweile zahlreiche Möglichkeiten, seine Spezifität und seine Transduktionspotenz zu verbessern. Insbesondere doppelsträngige Vektoren scheinen hier einige Vorteile zu bringen. Die Spezifität sollte insoweit verbessert werden, dass ein gezielter Gentransfer z.B. in das Herz bei systemischer Vektorapplikation auch im Großtierversuch möglich ist.

## **4.2 Zweites Hauptziel**

Nachdem wir nachgewiesen hatten, dass mit dem AAV-2/9 in unserem Modell ein effektiver Gentransfer möglich ist, untersuchten wir, ob durch die Expression sogenannter therapeutischer Gene in den Spenderherzen eine Verlängerung des Transplantatüberlebens oder eine Verminderung der Transplantatabstoßung ermöglicht wird. Zuerst verwendeten wir PD-L1 (Programmed-Death-Ligand 1) als ein zu diesem Zeitpunkt sehr vielversprechendes Transgen. Auf Gewebeoberflächen exprimierte PD-L1 und PD-L2 wirken inhibitorisch auf den PD-1-Rezeptor, welcher auf T-Zellen vorkommt. PD-1 fungiert als Transmembranrezeptor, bestehend aus einer einzelnen variablen immunglobulin-ähnlichen Domäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Diese wiederum enthält die beiden Rezeptor-Tyrosinkinasen ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) und ITSM

(immunoreceptor tyrosine-based switch motif), wobei eine hemmende Wirkung vor allem über den ITSM ausgeht [del Rio *et al.*, 2008]. Eine hemmende Wirkung von PD-1 in Bezug auf die Immunantwort und eine Rolle in der Selbst-Toleranz lassen auch einige Versuche vermuten, in welchen PD-1-defiziente Mäuse Lupus-like-Disease und Kardiomyopathie entwickelten [Nishimura and Honjo, 2001; Nishimura *et al.*, 1999; Okazaki *et al.*, 2003]. Der PD-Ligand 1 wird sowohl auf hämatopoetischen (T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen), als auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert und kann durch Interferon- $\gamma$  hochreguliert werden, was vermuten lässt, dass der PD-1/PD-L1 Signalweg eine Rolle in der Immunantwort in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen einnimmt [del Rio *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 1999; Loke and Allison, 2003; Nakazawa *et al.*, 2004; Yamazaki *et al.*, 2002]. Da im Mausmodell eine beschleunigte Abstoßung transplantierter PD-L1-defizienter Herzen beobachtet wurde [Yang *et al.*, 2008], nahmen wir an, dass eine Überexpression von PD-L1 zu einem längeren Graftüberleben führen könnte. Dies konnten wir in unseren Versuchen jedoch nicht feststellen. Es ließen sich bezüglich der Überlebenszeit keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe nachweisen. Histopathologisch wurden tendenziell in der PD-L1-Gruppe vermehrte Abstoßungszeichen beschrieben, was uns dazu veranlasste, bereits nach sieben Versuchen ein neues Transgen zu verwenden. Im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung war der Ansatz, die T-Zell-vermittelte Immunantwort zu unterdrücken, zwar vielversprechend, aber durch eine Überexpression von PD-L1 in unseren Versuchen nicht durchführbar. In Zukunft wird dieser Ansatz vermutlich keine größere Bedeutung haben, da zum einen die genauen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind und zum anderen zunehmend neue Rezeptoren beschrieben werden, welche in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen [Butte *et al.*, 2007; Keir *et al.*, 2008]. In neueren Veröffentlichungen wird PD-L1 zudem in Zusammenhang gebracht mit einer erhöhten Mortalität nach Sepsis [Guignant *et al.*, 2011; Y Zhang *et al.*, 2010] und einer Hemmung der Angiogenese [Jin *et al.*, 2011], aber einer verminderten Entstehung von Arteriosklerose und einer Verringerung des kardiovaskulären Risikos [Bu *et al.*, 2011].

Ab dem Versuch ISL 8 verwendeten wir Thymosin  $\beta$ 4 (TB4) als Transgen, welches uns durch die Zusammenarbeit mit der AG um Prof. Kupatt bereitgestellt wurde. In dieser Forschungsgruppe wurden zu diesem Zeitpunkt bereits vielversprechende Ergebnisse mit TB4 erzielt, vor allem in Bezug auf seine kardioprotektiven Eigenschaften und die Verminderung des Ischämie-Reperfusionschadens [*Hinkel et al.*, 2010; *Hinkel et al.*, 2008; *Kupatt et al.*, 2008]. Die genauen Funktionsmechanismen wurden bereits in Kapitel 1.3.4 ausführlich beschrieben. Seine antiinflammatorischen, antiapoptotischen und angiogenetischen Eigenschaften und die Tatsache, dass bis zu diesem Zeitpunkt keine Studien veröffentlicht wurden, welche eine mögliche protektive Funktion von TB4 im Rahmen der (Xeno)Transplantation beschreiben, veranlasste uns dazu, ab ISL 8 dieses Transgen für die restlichen Versuche zu verwenden.

Das ursprüngliche Ziel bestand darin zu zeigen, dass die Tiere bzw. die transplantierten Herzen in der Versuchsgruppe signifikant länger überleben als in der Kontrollgruppe. Dieser Beweis konnte nicht erbracht werden, da oftmals Komplikationen zu einem Versuchsabbruch führten und somit das tatsächliche Graftüberleben nicht ermittelt werden konnte. Für die so verbleibende Anzahl an ordentlich beendeten Versuchen war der Transgeneffekt zu gering, um eine Signifikanz bezüglich der Überlebenszeit erzielen zu können. Von 23 durchgeföhrten Transplantationen überlebten 22 Empfängertiere den Operationstag. Von diesen 22 Tieren mussten 8 aufgrund von Komplikationen vorzeitig euthanasiert werden. Die Gründe hierfür sind zum einen in der nötigen immunsuppressiven Medikation zu sehen, welche wir für Nierenversagen und schwere Infektionen verantwortlich machen, begünstigt auch durch die artgerechte, nicht-sterile Tierhaltung. Zum anderen führte das erhebliche intraabdominelle Trauma einer heterotopen Herzimplantation zu zum Teil starken Verwachsungen und konsekutiven mechanischen Darmverschlüssen.

Bis ISL 11 verwendeten wir als Empfängertiere ebenso wie als Spendertiere Schweine der deutschen Landrasse. Durch die potente Immunsuppression mittels Tacrolimus wurde eine Graft-Abstoßung soweit minimiert, dass Überlebenszeiten von über 60 Tagen erreicht wurden. Problematisch hierbei war, dass dadurch das

Gewicht der Empfängertiere auf deutlich über 60 kg ansteigen konnte. Die täglich vorgesehene Überprüfung der Graftfunktion mittels Palpation war nicht mehr durchführbar und auch mittels Sonographie konnten keine zuverlässigen Aussagen diesbezüglich mehr getroffen werden, weshalb die Versuche zu diesem Zeitpunkt abgebrochen werden mussten.

Ab ISL 12 verwendeten wir deshalb Munich-Mini-Pigs als Empfängertiere. Diese erreichen zuchtbedingt ein deutlich geringeres Maximalgewicht als Schweine der deutschen Landrasse und sollten durch die größere phylogenetische Diskrepanz eine stärkere Graft-Abstoßung provozieren. Hierdurch sollte die Versuchsdauer verkürzt werden und mögliche protektive Effekte durch Thymosin  $\beta$ 4 stärker dargestellt werden. Wir behielten zunächst das bisher verwendete immunsuppressive Schema, bestehend aus einer Einmalgabe Methylprednisolon (1 mg/kg KG i.v.) am Operationstag und 10 Tage Tacrolimus (initial 0,3 mg/kg KG i.m., Reduzierung entsprechend gemessenem Serum-Tacrolimusspiegel), bei. Die ersten beiden Versuche führten wir am selben Tag durch, jeweils eine Transduktion wurde mit TB4 (Versuchsgruppe) und mit LacZ (Kontrollgruppe) durchgeführt. Beide Versuche mussten bereits am vierten postoperativen Tag beendet werden, da keine Graftfunktion mehr nachweisbar war. Die histopathologische Auswertung zeigte eine akute, humorale bedingte Abstoßung, was uns dazu veranlasste, ab ISL 14 eine potentere Immunsuppression zu verwenden, um die für eine suffiziente Genexpression benötigte minimale Versuchsdauer von ca. 9 Tagen zu erreichen. Wir verabreichten hierfür zusätzlich zum Tacrolimus für 10 Tage das vor allem durch Nierentransplantationen bekannte Mycophenolat - Mofetil (MMF, 500 mg i.v.). Am Operationstag war dies noch problemlos intravenös möglich. Da dieses Medikament für eine intramuskuläre Injektion nicht geeignet ist, wurde es in Form von zerstoßenen Tabletten (1000 mg), verteilt in Nuss-Nougat-Creme, oral verabreicht. Über diesen Weg war eine konstante Bioverfügbarkeit selbstverständlich nicht zu erreichen, ebenso war es uns auch nicht möglich, einen therapeutischen Wirkspiegel im Blut zu bestimmen. Der Effekt war jedoch ausreichend hoch, sodass nun kein Versuch mehr aufgrund vorzeitiger Graftabstoßung beendet werden musste. Da die restlichen Versuche nicht ausreichten, um signifikante Ergebnisse bezüglich des Transplantatüberlebens zu erzielen, begrenzten wir die Überlebenszeit auf 18 Tage

und verglichen die explantierten Grafts anhand der histopathologischen Abstoßungszeichen und des Geneffekts, also im Falle von TB4 durch die Anzahl der myokardialen Kapillaren. Bis auf eine Ausnahme zeigten alle der untersuchten Herzsegmente in der TB4-Gruppe eine signifikant höhere Kapillaranzahl als die der LacZ-Gruppe. Dieser Tatsache ist umso höheren Stellenwert beizumessen wenn man beachtet, dass die Grafts der Versuchsgruppe einer signifikant längeren Ischämiezeit ausgesetzt waren als die Herzen der Kontrollgruppe.

Um darüber hinaus Aussagen in Bezug auf die verbliebene Graftfunktion treffen zu können, verwendeten wir ab ISL 16 die subendokardiale Segmentverkürzung (SES), bei der mittels zweier in das Myokard gesteckter Piezo-Kristalle die Kontraktilität gemessen werden kann. Wir konnten zeigen, dass die mit TB4 transduzierten Herzen bei Versuchsende tendenziell eine höhere Kontraktilität aufwiesen als die Herzen der Kontrollgruppe. Die Auswertung erwies sich mitunter als sehr problematisch, da die zum Teil sehr starken intraabdominalen Verwachsungen die Grafts in ihrer Kontraktilität beeinträchtigten.

## Fazit

Wir konnten zeigen, dass mit Thymosin  $\beta$ 4 transduzierte Schweineherzen signifikant mehr Kapillaren aufweisen ( $p = 0,001$ ) und tendenziell geringere histopathologische Abstoßungszeichen sowie eine bessere Kontraktilität zeigen als die mit LacZ transduzierten Herzen. Eine PD-L1 Überexpression hingegen zeigte in unseren Versuchen eher negative Effekte. Durch die dem Erkenntnisprozess geschuldete mehrmalige Änderung des Versuchsprotokolls und die relativ hohe Komplikationsrate waren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Überlebenszeiten feststellbar. In zukünftigen Versuchen sollte angestrebt werden die Komplikationsrate weiter zu senken, zum einen durch eine Verminderung der durch die Immunsuppressiva entstehenden Nebenwirkung, zum anderen durch eine Reduktion der postoperativen abdominalen Verwachsungen. Hier sollte insbesondere die Möglichkeit eines nicht-resorbierbaren künstlichen Herzbeutels in Betracht gezogen werden. Um trotz möglicher Komplikationen oder notwendiger Protokolländerungen

signifikante Ergebnisse erzielen zu können, sind größere Versuchsgruppen empfehlenswert.

### 4.3 Nebenziel

Unsere Studien und eine umfassende Literaturrecherche zeigen, dass nach heutigen Erkenntnissen eine einzige genetische Veränderung, sei es durch die Entfernung oder das Hinzufügen eines Gens, nicht ausreicht, um ein suffizientes Transplantatüberleben im Rahmen der Xenotransplantation zu ermöglichen. Andererseits ist die Züchtung von mehrfach genetisch veränderten Tieren sehr schwierig und ist nur in einem geringen Prozentsatz der Versuche erfolgreich. Oftmals wird dann nur ein oder nicht alle Transgene exprimiert. Denkt man an einen möglichen klinischen Einsatz, könnte somit ein multitransgenes, xenogenes Spenderorgan nicht rechtzeitig zur Verfügung gestellt werden. Wir wollten deshalb herausfinden, ob ein Gentransfer mittels des in-situ Langendorff Perfusionssystems durch den AAV-2/9 auch bei bereits mehrfach transgenen Herzen möglich ist. Wir verwendeten hierzu CD46/Gal-KO - transgene Landrasseschweine als Spendertiere. CD46 (Membran Ko-Faktor Protein, MCP) ist ein Kofaktor von Faktor I, welcher C3 spaltet, und wirkt dadurch modulierend auf die Komplementsystemkaskade und somit auf die Entstehung des MAC (membrane attack complex), womit es einen Einfluss auf die Verhinderung einer hyperakuten Abstoßungsreaktion (HAR) hat [Adams *et al.*, 2001]. Alpha 1,3 Galactosyltransferase heißt das Enzym, welches verantwortlich ist für die Expression von spezifischen Gal-Epitopen (Galaktose Alpha 1,3 Galaktose Verbindungen) auf Bakterien und allen Säugetieren, mit Ausnahme von Menschen und Primaten. Diese besitzen präformierte Antikörper gegen diese Gal-Epitope, vermutlich durch den vorherigen Kontakt mit Bakterien, welche entsprechende Zuckerverbindungen an ihrer Oberfläche exponieren.

Die Erzeugung von xenogenen Spenderorganen, welche keine Gal-Epitope mehr aufweisen (GalTKO), stellt eine probate Möglichkeit dar, die HAR stark zu reduzieren. Selbstverständlich ließen sich dazu in unserem Modell keine Aussagen

treffen, da Spender- und Empfängertiere allogene Schweine waren und somit jeweils Gal-Epitope aufwiesen. Wir konnten jedoch zeigen, dass sich mit Hilfe des in-situ Langendorff Perfusionssystem und dem AAV-2/9 bereits zweifach transgene Herzen nochmals zuverlässig transduzieren lassen [Schmidt et al., 2010]. Diese Ergebnisse sind wichtig für Versuche, welche mehr Bezug zu einer möglichen klinischen Anwendung haben und ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt werden. Hierbei werden transgene Schweineherzen heterotop thorakal in Paviane implantiert und erzielen bisher vielversprechende Ergebnisse [Bauer et al., 2010]. Da für eine lange Überlebenszeit und eine beständig gute Graftfunktion multitransgene Spenderorgane nötig sind, welche eine komplizierte und immer noch langwierige Zucht von ungefähr einem Jahr erfordern [Gock et al., 2011], könnte ein fehlendes Transgen mit Hilfe unseres Modells nachträglich, kurz vor dessen Implantation, in das Spenderherz eingebracht werden. Bezuglich der Wirksamkeit von CD46/Gal-KO - transgenen Landrasse-Schweineherzen lassen sich bei Implantation in Munich-Mini-Pigs keine Aussagen treffen, da diese ebenfalls Gal-Epitope aufwiesen und somit keine Anti-Gal Antikörper produzieren und CD46 ein humanes komplementregulatorisches Protein ist. Es ist derzeit nicht abzusehen, wie viele transgene Modifikationen benötigt werden, um in der experimentellen Versuchsphase ausreichend gute Ergebnisse erzielen zu können, damit eine klinische Anwendung gewagt werden kann. Je aufwendiger jedoch die Produktion der entsprechenden Organe wird, desto wahrscheinlicher kann die Situation auftreten, dass zum geplanten Transplantationszeitpunkt kein vollständig gentechnisch verändertes Tier zur Verfügung steht. Unsere Methode bietet an dieser Stelle die Möglichkeit, unter geeigneten Umständen kurzfristig ein zusätzliches Gen, z.B. TB4, in das Herz einzubringen.

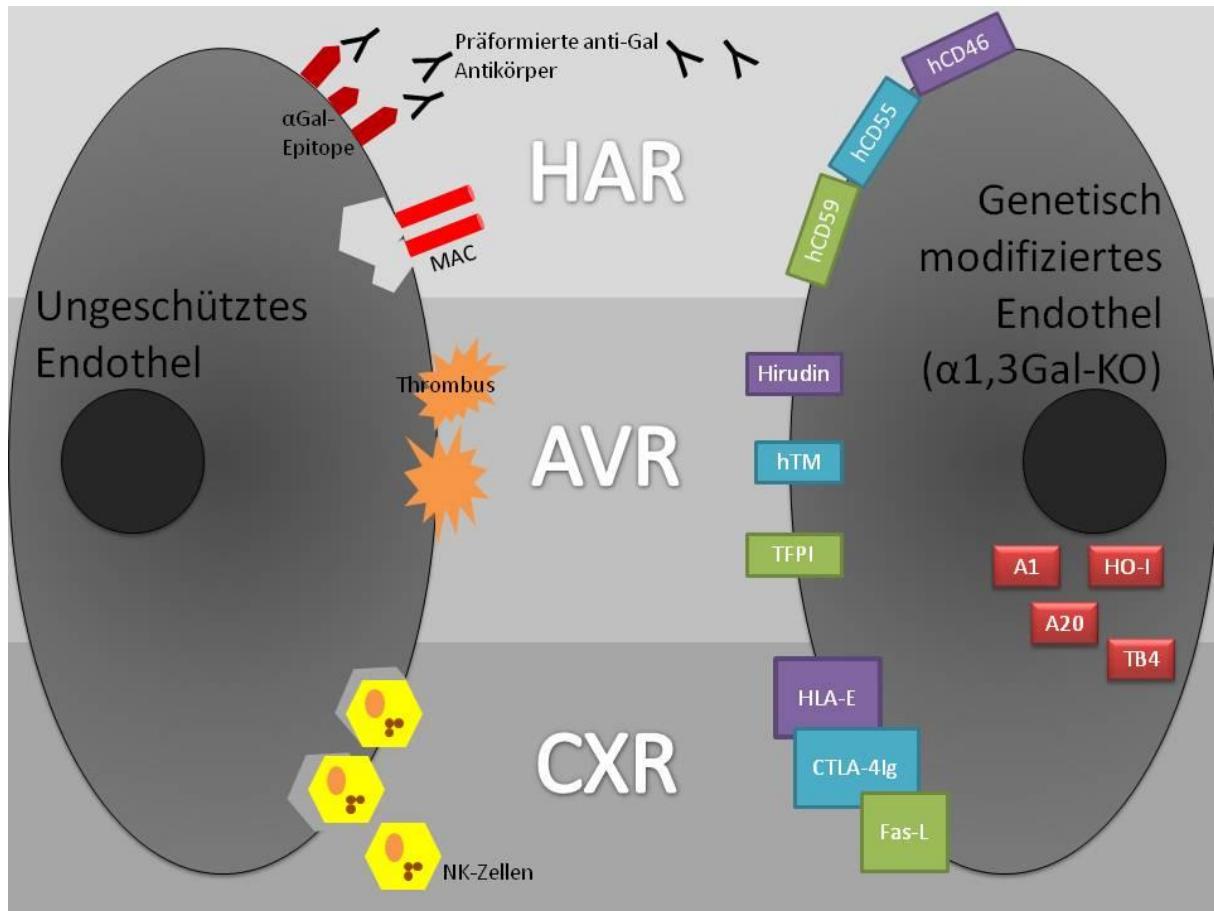
## 4.4 Ausblick

Das *in-situ* Langendorff Perfusionssystem zur Transduktion von Schweineherzen im heterotopen, abdominalen Transplantationsmodell hat sich als eine zuverlässige und relativ einfach verfügbare Methode erwiesen, mit welcher auch in Zukunft transgene

---

Spenderorgane zuerst getestet werden können, bevor sie im heterotop-thorakalen Schwein-zu-Pavian Modell eingesetzt werden. Die Verwendung von Pavianen als Versuchstiere ist stark reglementiert und verlangt eine hohe wissenschaftliche Evidenz, so dass vorherige intensive Erfahrungen mit den dort verwendeten Spenderherzen in einem anderen Transplantationsmodell von Vorteil sind. Hier sollte bei zukünftigen Versuchsplanungen darauf geachtet werden, dass die Gruppengrößen ausreichend sind, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Dies war bei unseren jetzigen Versuchen nur schwer möglich, was zum einen an der zwischenzeitlichen Änderung des Transgens und der Empfängerrasse, aber auch an der relativ hohen postoperativen Komplikationsrate lag.

Mittlerweile herrscht Einigkeit darüber, dass eine klinische Anwendung der xenogenen Herztransplantation nur mit multipel genetisch veränderten Organen erfolgreich sein kann und als Basis der weiteren Entwicklung das  $\alpha$ 1,3Gal-KO Schweineherz dient, weil mit diesem die hyperakute Abstoßungsreaktion zuverlässig verhindert werden kann [Gock *et al.*, 2011]. Die aktuelle Forschung beschäftigt sich mit den noch verbleibenden Problemen, v.a. die akute vaskuläre (AVR) und die zelluläre Abstoßungsreaktion betreffend. Eine Übersicht über die möglichen genetischen Veränderungen und deren Rolle im Rahmen der Xenotransplantation geben die Abbildung 40 und die nachfolgenden Kapitel.



**Abbildung 40:** Schematische Darstellung des Schweineendothels, an welchem die Abstoßungsreaktionen primär ablaufen. Links dargestellt ist ein unverändertes Endothel, rechts auf  $\alpha 1,3\text{Gal-KO}$  Basis die vielfältigen Ansätze, gentechnisch die hyperakute (HAR), die akute vaskuläre (AVR) und die zelluläre (CXR) Abstoßungsreaktion zu beeinflussen. Modifiziert nach [Petersen *et al.*, 2009].

#### 4.4.1 Vermeidung der hyperakuten Abstoßung (HAR)

Die Verwendung von  $\alpha 1,3\text{Gal-KO}$  Spenderorganen stellt einen Meilenstein in der Beherrschung der hyperakuten Abstoßung im Rahmen der Xenotransplantation dar und gilt mittlerweile als Grundlage für weitere Modifikationen [Gock *et al.*, 2011]. Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der HAR besteht in der Überexpression sogenannter komplementregulatorischer Faktoren (CRF), insbesondere von CD46, CD55 und/oder CD59, welche jeweils an verschiedenen Stellen inhibitorisch auf die humane Komplementkaskade wirken [Cowan and d'Apice, 2009]. Die Funktionsweise

des auch von uns verwendeten CD46 (Membran-Kofaktor-Protein, MCP), einem essentiellen Kofaktor bei der Spaltung von C3 durch Faktor I, wurde weiter oben schon erwähnt. CD55 (Decay-accelerating factor, DAF) wirkt als Abbaubeschleuniger der C3- und C5-Konvertase und CD59 inhibiert direkt den am Ende der Komplementkaskade stehenden MAC (Membrane attack complex). Schmöckel et al. zeigten schon 1998, dass durch die Verwendung von CD55-transgenen Schweineherzen bei der orthotopen Transplantation in Primaten eine hyperakute Abstoßungsreaktion verhindert werden kann [Schmoeckel et al., 1998]. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit entsprechend veränderten Nieren [Cozzi et al., 2000; Schuurman et al., 2002; Zaidi et al., 1998] und Lebern [Sanchez et al., 2003] erzielt werden. Folgend wurden CD46 - monotransgene Schweineherzen hergestellt, welche im Primatenmodell ebenfalls in der Lage waren, die HAR zu unterdrücken [Adams et al., 2001; Diamond et al., 2001]. CD55/CD59 doppeltransgene Herzen konnten ebenfalls erfolgreich die HAR unterdrücken, brachten im Vergleich zu CD55 oder CD46 monotransgenen Herzen keinen weiteren Vorteil [Chen et al., 1999; Gock et al., 2011]. Bei Versuchen, CD46/CD55/CD59 - dreifachtransgene Organe herzustellen konnten bisher immer nur zwei der drei CRFs stark exprimiert werden [Zhou et al., 2005]. Es scheint jedoch, als ob jedes der drei CRF, sofern es in hohem Maße exprimiert wird, in der Lage ist effektiv die HAR zu verhindern, ohne dass eines dem Anderen überlegen wäre [Cowan and d'Apice, 2009]. Jedoch bringt die Kombination eines CRF mit der Deletion von  $\alpha$ Gal-Epitopen einen zusätzlichen Nutzen auf die HAR und einen vermuteten Langzeiteffekt. Brenner et al. zeigten in einem working-heart Modell, bei dem Schweineherzen mit humanem Blut perfundiert wurden, dass bei Zugabe von Hirudin im Vergleich zu Heparin eine signifikante längere Schlagdauer durch Reduktion der HAR erreicht werden kann [Brenner et al., 2010]. Ob mit Hirudin bei Anwendung der oben genannten Modifikationen einen zusätzlichen Nutzen bringt, bleibt noch zu untersuchen.

#### 4.4.2 Vermeidung der akuten vaskulären Abstoßung (AVR)

Zwar konnten bei der Bewältigung der hyperakuten Abstoßung bereits große Erfolge erzielt werden. Die akute vaskuläre Abstoßung, bei der es durch die Immunantwort und der molekularen Inkompatibilität zu einer disseminierten Gerinnungsstörung mit konsekutiver thrombotischer Mikroangiopathie und letztendlich einem Organversagen kommt, stellt jedoch immer noch eine unüberwindbare Hürde dar. Mögliche Ansätze sind, Oberflächenmoleküle zu exprimieren, welche modulierend auf die Gerinnungskaskade wirken, ähnlich wie die CRFs das Komplementsystem beeinflussen. Zu nennen sind hier insbesondere der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), Thrombomodulin, Antithrombin und der endothiale Protein C Rezeptor (EPCR). TFPI ist ein endothelständiges Protein, welches die Gerinnungskaskade am Anfang hemmt, indem es mit Faktor Xa, Faktor VIIa und dem Tissue Factor einen Komplex bildet und diese somit inaktiviert. An Zelloberflächen exprimierte Thrombomodulin bindet an Thrombin, welches seinerseits die Wirkung von Heparin um ein Vielfaches potenziert. Der Thrombin-Thrombomodulin-Komplex aktiviert zirkulierndes Protein C, welches zusammen mit seinem Kofaktor Protein S die Gerinnungsfaktoren Va und VIIa inaktiviert. Der endothiale Protein C Rezeptor kann diesen Effekt noch verstärken und wirkt durch seinen intrazellulären Signalweg zudem antiinflammatorisch [Gock *et al.*, 2011]. Bisher gibt es noch keine Veröffentlichungen zu möglichen positiven Effekten im Schwein-auf-Pavian Modell, in unserer Arbeitsgruppe werden jedoch zur Zeit Gal-KO/CD46/Thrombomodulin - transgene Schweineherzen mit ermutigenden Zwischenergebnissen im Pavianmodell getestet (bisher unveröffentlichte Studien). Obwohl es nicht direkt in die Gerinnungskaskade eingreift, könnte CD39 protektive und indirekt antithrombotische Effekte aufweisen. Es konvertiert Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosinmonophosphat (AMP), welches durch CD73 zu Adenosin katabolisiert wird. Adenosin wirkt vasodilatatorisch und hemmt die Thrombozytenaggregation. Antagonistisch dazu wirkt ADP, mit welchem es im Gleichgewicht steht. Da Schweineendothelzellen deutlich weniger CD73 aufweisen als humanes Endothel, wurde untersucht, ob durch eine Überexpression von CD39 positive Effekte zu beobachten sind. Im Kleintierversuch konnte bereits eine

antiinflammatorische und plättchenhemmende Wirkung nachgewiesen werden [Crikis et al., 2010], Ergebnisse zu entsprechend veränderten Herzen im Großtiersversuch liegen derzeit noch nicht vor. Ob das im Zusammenhang mit CD39 mehrfach beschriebene erhöhte Auftreten von Tumoren [Feng et al., 2011; Sun et al., 2010] auch bei selektiver Veränderung eines Organs eine Rolle spielt, bleibt abzuwarten. Zudem ist bisher nicht geklärt, ob durch die potente lokale Gerinnungshemmung eine ausreichende Wundheilung der Herzen nach z.B. einer Biopsie oder Verletzung gewährleistet ist.

#### **4.4.3 Verhinderung einer zellulären Abstoßung**

Um die zelluläre Abstoßung eines Xenografts kontrollieren zu können, sind ohne gentechnische Modifikationen sehr hohe Dosen immunsuppressiver Medikamente notwendig, welche aufgrund ihrer Toxizität nicht langfristig toleriert werden. Um diese systemischen Nebenwirkungen zu umgehen, wird derzeit erforscht, ob durch die selektive Expression immunmodulatorischer Oberflächenmoleküle eine lokale Immunsuppression erreicht werden kann. Dazu könnte sich z.B. PD-L1 eignen, welches wir zu Beginn unserer Versuche einsetzen, das jedoch in unserem Transplantationsmodell keinen messbaren protektiven Effekt zeigte. Eine weitere Möglichkeit zur Verminderung der zellulären Abstoßung könnte die Expression von TRAIL (TNF- $\alpha$  related apoptosis inducing factor) darstellen. TRAIL fungiert als Zellzyklus-Inhibitor von T-Zellen [Lunemann et al., 2002] und konnte bereits erfolgreich die T-Zell vermittelte Abstoßung von Kornea-Transplantaten verhindern [Xie et al., 2003]. Eine Überexpression von CTLA4-Ig wirkt ebenfalls hemmend auf T-Zellen und die T-Zell vermittelte Antikörperproduktion. Dabei handelt es sich um ein rekombinantes Genprodukt aus humanem CTLA4, welches T-Zellen inhibiert, kombiniert mit einer Region des humanen Immunglobulins [Aigner et al., 2010]. Viele weitere Transgene, wie z.B. HLA-E, beta-2-Mikroglobulin, LEA29Y und CD47, sind ebenfalls Gegenstand der aktuellen Forschung und sollen hier nicht näher erläutert werden. Inwieweit eine lokale Immunsuppression des Herzens Endokarditiden und

Myokarditiden begünstigt und wie sich diese dann behandeln ließen, bleibt abzuwarten.

#### 4.4.4 Sonstige organprotektive Veränderungen

Allen Anstrengungen zum Trotz wird vermutlich immer eine gewisse Immunreaktion gegen das implantierte Transplantat - insbesondere Xenotransplantat - bestehen bleiben. Es erscheint daher sinnvoll, das Graft nicht nur mit immunsuppressiven Transgenen zu verändern, sondern auch solche Gene vermehrt zu exprimieren, welche antiinflammatorische, antiapoptotische und zellprotektive Eigenschaften vermitteln. Als sehr geeignet und zusätzlich neoangiogenetisch wirkend hat sich TB4 erwiesen, wie wir in unseren Versuchen zeigen konnten. Vor allem die erhöhte Neubildung von Kapillaren könnte sich im Hinblick auf die Transplantatvaskulopathie, welche bereits in der Allotransplantation ein großes Problem darstellt, als nützlich erweisen. Hämoxygenase-1 (HO-1) und A20 stellen weitere vielversprechende Transgene dar und entsprechend veränderte Schweine konnten schon erfolgreich hergestellt werden [Oropeza *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2010]. HO-1 ist ein Enzym, welches den Abbau von Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid katalysiert. Es besitzt dadurch v.a. eine neoangiogenetische, antiinflammatorische, antifibrotische und antioxidative Wirkung. Zusätzlich hemmt es die Apoptose, auch von Tumorzellen, was deren Wachstum beschleunigen kann [Ollinger and Pratschke, 2010; Shen *et al.*, 2011]. Bezuglich der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie (TVP) scheint A20 einen protektiven Effekt zu haben. Endothelzellen schützt es vor einer Apoptose durch TNF, Fas und NK-Zellen, wohingegen es diese in glatten Muskelzellen fördert. Dadurch konnte in verschiedenen Versuchen eine signifikante Reduktion der TVP erreicht werden [Daniel *et al.*, 2006; Oropeza *et al.*, 2009].

#### **4.4.5 Fazit und zukünftige Transduktionsversuche**

Obwohl wir in unseren Versuchen bereits eine hohe Transduktionseffizienz der Herzen nachweisen konnten, könnte mit den unter 4.1 genannten Vektormodifikationen eine solche Kardioselektivität und Spezifität erreicht werden, dass bei z.B. einer systemischen Injektion eines Adenovirus-assoziierten-Virus-Vektors in junge Landrasseschweine nach wenigen Tagen Latenz eine befriedigende Transgenexpression im Herzen zu erreichen wäre. Dies soll in folgenden Versuchen untersucht werden und hätte den großen Vorteil gegenüber einer Transduktion mittels des *in-situ* Langendorff Perfusionssystems, dass die Wirkung des Transgens bereits direkt bei der Implantation zur Verfügung stünde, was vor allem im Hinblick auf die akuten Abstoßungsreaktionen von hoher Relevanz ist. Diese Methode könnte eine Möglichkeit sein, den kurzfristigen Bedarf multitransgener Tiere zu decken, welche in ihrer Herstellung sehr aufwendig sind und nicht immer alle Transgene voll exprimieren, so dass eventuell fehlende Transgene nachträglich eingebracht werden könnten. Zudem sollten weitere Versuche mit dem *in-situ* Langendorff Perfusionssystem durchgeführt werden. Da hiermit Herzen vor einer Transplantation genetisch modifiziert werden können, stellt dieses System eine potentielle Möglichkeit dar, auch in der Allotransplantation Verwendung zu finden, um z.B. durch eine lokale Immunsuppression die systemischen Nebenwirkungen für den Patienten zu senken und somit möglicherweise in der Zukunft Retransplantationen und medikamentös bedingte Komplikationen zu vermeiden.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Ziele der Studie

#### 5.1.1 Erstes Hauptziel

##### **Effektive Transduktion porciner Kardiomyozyten mittels rAAV 2/9**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des *in-situ* Langendorff Perfusionssystem den rAAV 2/9 als Vektor für einen effektiven Gentransfer porciner Kardiomyozyten zu etablieren. Dabei wurden an den Vektor folgende Anforderungen gestellt:

- Sehr hohe Transduktionsrate
- Kardioselektivität
- Apathogenität
- Keine Immunreaktion

Um die Transduktionseffizienz zu überprüfen wurde ein Markergen, das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen (LacZ), mit dem Vektor gekoppelt und dessen Expression in jeweils 45 Segmenten der Herzen untersucht.

#### 5.1.2 Zweites Hauptziel

##### **Verlängerung des Transplantatüberlebens durch Einbringen von therapeutischen Genen**

Nach Beweisen der Transduktionseffizienz sollte das Einbringen verschiedener therapeutischer Gene (PD-L1 und T $\beta$ 4) in das Myokard mittels rAAV 2/9 eine Verlängerung des Transplantatüberlebens bzw. eine Verringerung der makroskopischen und mikroskopischen Abstoßungszeichen bewirken.

### 5.1.3 Nebenziel

#### **Transduktion von bereits mehrfach transgenen Spenderherzen.**

Im Hinblick auf andere Projekte in der Xenotransplantationsforschung und eine mögliche klinische Anwendung sollte untersucht werden, ob auch eine Transduktion bereits zweifach transgener Herzen sicher möglich ist.

## 5.2 Methodik

Es wurden heterotop-abdominelle Herztransplantationen durchgeführt. Die Spenderherzen wurden nach Eröffnung der Thoraces entsprechend präpariert, kanüliert und *in-situ* und *ex-vivo* mittels des *in-situ*-Langendorff Perfusionssystems mit Eigenblut unter physiologischen Bedingungen und unter Zugabe von entweder jeweils  $10^{13}$  AAV-2/9-PD-L1, AAV-2/9-TB4 oder AAV-2/9-LacZ für mindestens 45 Minuten perfundiert. Nach erfolgter Kardioplegie mittels retrograd applizierter kalter Custodiol-Lösung bereiteten wir den abdominalen Situs des Empfängertieres auf die Implantation vor und anastomosierten die Spender-Aorta mit der Aorta abdominalis und die Spender-Vena cava mit der Vena cava inferior des Empfängertieres. Die Immunsuppression bestand aus Methylprednisolon (1 mg/kg KG einmalig intraoperativ i.v.), Tacrolimus (bis 10 Tage postoperativ, Anfangsdosis 0,3 mg/kg KG i.m. / Tag, im weiteren Verlauf nach Blutspiegel) und bei einigen Versuchen zusätzlich aus Mycophenolat-Mofetil (intraoperativ einmalig 500 mg i.v., anschließend 2 x täglich 1000 mg p.o.). Postoperativ wurde das Graftüberleben täglich überprüft sowie alle 3 Tage eine Blutentnahme zur Bestimmung der Medikamentenspiegel und relevanter Laborparameter als auch eine abdominelle Sonographie durchgeführt. Nach Versuchsende wurden die Herzen explantiert und in 45 Segmente unterteilt, in welchen dann die Transgenexpression (LacZ), das Transgenprodukt (TB4) und die histopathologischen Abstoßungszeichen untersucht wurden.

## 5.3 Ergebnisse

### Ad 5.1.1 und 5.1.3

Es konnten insgesamt 23 Versuche durchgeführt werden. 9 Herzen wurden mit LacZ transduziert, wovon 8 in die Auswertung zur Ermittlung des Kardiomyotropismus mit einbezogen werden konnten. Ein Herz zeigte sich nach der Explantation vollkommen nekrotisch, hier konnte keine Transgenexpression mehr nachgewiesen werden. In den weiteren Herzen zeigte sich eine gute bis sehr gute Transgenexpression, welche anhand der prozentualen Blaufärbung in der X-Gal-Färbung quantifiziert wurde.

Von den beiden CD46/Gal-KO-transgenen Spenderherzen wurde eins mit LacZ transduziert. Auch hier konnte mittels Immunhistochemie eine sehr gute Transduktion der Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Das zweite doppeltransgene Tier wurde mit TB4 transduziert. Hier konnte der indirekte Transgennachweis mittels Bestimmung der Kapillardichte nicht erbracht werden, da die Versuchsdauer nur 9 Tage betrug.

### Ad 5.1.2

In diesem zweiten Versuchsabschnitt sollte festgestellt werden, ob durch die Expression potentiell therapeutischer Gene eine Organprotektion erreicht werden kann. Dazu verwendeten wir als erstes Transgen PD-L1. Nach drei durchgeführten Versuchen stellten wir histopathologisch eine tendenziell eher höhere Abstoßung fest, weshalb wir die restlichen Herzen mit TB4 transduzierten. Um eine höhere Abstoßung zu provozieren, verwendeten wir zudem ab ISL 12 mit den Munich-Mini-Pigs als Empfängertiere ein diskonkordanteres Transplantationsmodell. Ein Effekt von TB4 stellt die Neubildung von Kapillaren dar, welche wir zur Auswertung in jeweils 6 Herzsegmenten auszählten. Der Median betrug in der TB4-Gruppe ( $n = 9$ ) bei Auszählung unter 10-facher Vergrößerung 232,63, in der Kontrollgruppe ( $n = 6$ ) lag dieser bei 95,88. Der Unterschied ist hochsignifikant ( $p = 0,001$ ). Unter 32-facher Vergrößerung betrug der Median in der Kontrollgruppe 35,00 und in der TB4-Gruppe 68,63. Auch hier ist die Kapillaranzahl in der Versuchsgruppe hochsignifikant größer ( $p = 0,001$ ). Mann-Whitney Rank Sum Test.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams, D. H., A. Kadner, R. H. Chen, and R. S. Farivar (2001), Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates, *Xenotransplantation*, 8(1), 36-40.

Aigner, B., N. Klymiuk, and E. Wolf (2010), Transgenic pigs for xenotransplantation: selection of promoter sequences for reliable transgene expression, *Curr Opin Organ Transplant*, 15(2), 201-206.

Atchison, R. W., B. C. Casto, and W. M. Hammon (1965), ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES, *Science*, 149, 754-756.

Badamchian, M., M. O. Fagarasan, R. L. Danner, A. F. Suffredini, H. Damavandy, and A. L. Goldstein (2003), Thymosin beta(4) reduces lethality and down-regulates inflammatory mediators in endotoxin-induced septic shock, *Int Immunopharmacol*, 3(8), 1225-1233.

Badamchian, M., A. A. Damavandy, H. Damavandy, S. D. Wadhwa, B. Katz, and A. L. Goldstein (2007), Identification and quantification of thymosin beta4 in human saliva and tears, *Ann N Y Acad Sci*, 1112, 458-465.

Ballweber, E., E. Hannappel, T. Huff, H. Stephan, M. Haener, N. Taschner, D. Stoffler, U. Aebi, and H. G. Mannherz (2002), Polymerisation of chemically cross-linked actin:thymosin beta(4) complex to filamentous actin: alteration in helical parameters and visualisation of thymosin beta(4) binding on F-actin, *J Mol Biol*, 315(4), 613-625.

Bantel-Schaal, U., and H. zur Hausen (1984), Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site, *Virology*, 134(1), 52-63.

Bauer, A., et al. (2010), First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation, *Xenotransplantation*, 17(3), 243-249.

Berns, K. I. (1990), Parvovirus replication, *Microbiol Rev*, 54(3), 316-329.

Berns, K. I., R. M. Kotin, and M. A. Labow (1988), Regulation of adeno-associated virus DNA replication, *Biochim Biophys Acta*, 951(2-3), 425-429.

Bish, L. T., K. Morine, M. M. Sleeper, J. Sanmiguel, D. Wu, G. Gao, J. M. Wilson, and H. L. Sweeney (2008), Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat, *Hum Gene Ther*, 19(12), 1359-1368.

Blacklow, N. R., M. D. Hoggan, and W. P. Rowe (1967), Isolation of adenovirus-associated viruses from man, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58(4), 1410-1415.

---

Blouin, V., N. Brument, E. Toublanc, I. Raimbaud, P. Moullier, and A. Salvetti (2004), Improving rAAV production and purification: towards the definition of a scaleable process, *J Gene Med*, 6 Suppl 1, S223-228.

Bock-Marquette, I., A. Saxena, M. D. White, J. M. Dimaio, and D. Srivastava (2004), Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair, *Nature*, 432(7016), 466-472.

Bodendorf, S., G. Born, and E. Hannappel (2007), Determination of thymosin beta4 and protein in human wound fluid after abdominal surgery, *Ann N Y Acad Sci*, 1112, 418-424.

Brenner, P., M. Keller, A. Beiras-Fernandez, S. Uchita, F. Kur, E. Thein, C. Wimmer, C. Hammer, M. Schmoeckel, and B. Reichart (2010), Prevention of hyperacute xenograft rejection through direct thrombin inhibition with hirudin, *Ann Transplant*, 15(4), 30-37.

Bu, D. X., M. Tarrio, E. Maganto-Garcia, G. Stavrakis, G. Tajima, J. Lederer, P. Jarolim, G. J. Freeman, A. H. Sharpe, and A. H. Lichtman (2011), Impairment of the programmed cell death-1 pathway increases atherosclerotic lesion development and inflammation, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(5), 1100-1107.

Buning, H., M. Braun-Falco, and M. Hallek (2004), Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy, *Cells Tissues Organs*, 177(3), 139-150.

Buning, H., L. Perabo, O. Coutelle, S. Quadt-Humme, and M. Hallek (2008), Recent developments in adeno-associated virus vector technology, *J Gene Med*, 10(7), 717-733.

Buning, H., M. U. Ried, L. Perabo, F. M. Gerner, N. A. Huttner, J. Enssle, and M. Hallek (2003), Receptor targeting of adeno-associated virus vectors, *Gene Ther*, 10(14), 1142-1151.

Burdorf, L., N. Schuhmann, A. Schulz, M. Koehn, E. Thein, M. Hallek, B. Reichart, H. Buening, and M. Schmoeckel (2007), The in situ Langendorff perfusion system: A new method for viral mediated gene transfer to porcine hearts, *Xenotransplantation*, 14(5), 375-448.

Butte, M. J., M. E. Keir, T. B. Phamduy, A. H. Sharpe, and G. J. Freeman (2007), Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses, *Immunity*, 27(1), 111-122.

Carter, P. J., and R. J. Samulski (2000), Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles, *Int J Mol Med*, 6(1), 17-27.

Cavasin, M. A. (2006), Therapeutic potential of thymosin-beta4 and its derivative N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (Ac-SDKP) in cardiac healing after infarction, *Am J Cardiovasc Drugs*, 6(5), 305-311.

- Cha, H. J., M. J. Jeong, and H. K. Kleinman (2003), Role of thymosin beta4 in tumor metastasis and angiogenesis, *J Natl Cancer Inst*, 95(22), 1674-1680.
- Chen, R. H., S. Naficy, J. S. Logan, L. E. Diamond, and D. H. Adams (1999), Hearts from transgenic pigs constructed with CD59/DAF genomic clones demonstrate improved survival in primates, *Xenotransplantation*, 6(3), 194-200.
- Cooley, D. A., D. Liotta, G. L. Hallman, R. D. Bloodwell, R. D. Leachman, and J. D. Milam (1969), Orthotopic cardiac prosthesis for two-staged cardiac replacement, *Am J Cardiol*, 24(5), 723-730.
- Cooper, D. K., M. Ezzelarab, H. Hara, and D. Ayares (2008), Recent advances in pig-to-human organ and cell transplantation, *Expert Opin Biol Ther*, 8(1), 1-4.
- Cowan, P. J., and A. J. d'Apice (2009), Complement activation and coagulation in xenotransplantation, *Immunol Cell Biol*, 87(3), 203-208.
- Cozzi, E., et al. (2000), Long-term survival of nonhuman primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts, *Transplantation*, 70(1), 15-21.
- Crespo-Leiro, M. G. (2005), Calcineurin inhibitors in heart transplantation, *Transplant Proc*, 37(9), 4018-4020.
- Crikis, S., B. Lu, L. M. Murray-Segal, C. Selan, S. C. Robson, A. J. D'Apice, H. H. Nandurkar, P. J. Cowan, and K. M. Dwyer (2010), Transgenic overexpression of CD39 protects against renal ischemia-reperfusion and transplant vascular injury, *Am J Transplant*, 10(12), 2586-2595.
- Dandel, M., and R. Hetzer (2010), Impact of immunosuppressive drugs on the development of cardiac allograft vasculopathy, *Curr Vasc Pharmacol*, 8(5), 706-719.
- Daniel, S., V. I. Patel, G. V. Shrikhande, S. T. Scali, H. E. Ramsey, E. Csizmadia, N. Benhaga, M. D. Fisher, M. B. Arvelo, and C. Ferran (2006), The universal NF-kappaB inhibitor a20 protects from transplant vasculopathy by differentially affecting apoptosis in endothelial and smooth muscle cells, *Transplant Proc*, 38(10), 3225-3227.
- del Rio, M. L., L. Buhler, C. Gibbons, J. Tian, and J. I. Rodriguez-Barbosa (2008), PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation, *Transpl Int*, 21(11), 1015-1028.
- Diamond, L. E., C. M. Quinn, M. J. Martin, J. Lawson, J. L. Platt, and J. S. Logan (2001), A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation, *Transplantation*, 71(1), 132-142.
- Dong, H., G. Zhu, K. Tamada, and L. Chen (1999), B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion, *Nat Med*, 5(12), 1365-1369.

Eustice, D. C., P. A. Feldman, A. M. Colberg-Poley, R. M. Buckery, and R. H. Neubauer (1991), A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells, *Biotechniques*, 11(6), 739-740, 742-733.

Feng, L., X. Sun, E. Csizmadia, L. Han, S. Bian, T. Murakami, X. Wang, S. C. Robson, and Y. Wu (2011), Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate, *Neoplasia*, 13(3), 206-216.

Fine, J. D. (2007), Epidermolysis bullosa: a genetic disease of altered cell adhesion and wound healing, and the possible clinical utility of topically applied thymosin beta4, *Ann N Y Acad Sci*, 1112, 396-406.

Fritz, P., H. V. Tuczak, J. G. Saal, and G. Wegner (1984), Two further alkaline phosphatase staining methods for immunohistochemistry, *J Clin Pathol*, 37(9), 1078-1079.

Gao, G., L. T. Bish, M. M. Sleeper, X. Mu, L. Sun, Y. Lu, J. Duan, C. Hu, L. Wang, and H. L. Sweeney (2011), Percutaneous transendocardial delivery of AAV6 results in highly efficient and global cardiac gene transfer in rhesus macaques, *Hum Gene Ther.*

Geisler, A., A. Jungmann, J. Kurreck, W. Poller, H. A. Katus, R. Vetter, H. Fechner, and O. J. Muller (2011), microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors, *Gene Ther.*, 18(2), 199-209.

Gock, H., M. Nottle, A. M. Lew, A. J. d'Apice, and P. Cowan (2011), Genetic modification of pigs for solid organ xenotransplantation, *Transplant Rev (Orlando)*, 25(1), 9-20.

Goldstein, A. L., F. D. Slater, and A. White (1966), Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 56(3), 1010-1017.

Goldstein, A. L., E. Hannappel, and H. K. Kleinman (2005), Thymosin beta4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues, *Trends Mol Med*, 11(9), 421-429.

Golla, R., N. Philp, D. Safer, J. Chintapalli, R. Hoffman, L. Collins, and V. T. Nachmias (1997), Co-ordinate regulation of the cytoskeleton in 3T3 cells overexpressing thymosin-beta4, *Cell Motil Cytoskeleton*, 38(2), 187-200.

Grant, D. S., J. L. Kinsella, M. C. Kibbey, S. LaFlamme, P. D. Burbelo, A. L. Goldstein, and H. K. Kleinman (1995), Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells, *J Cell Sci*, 108 ( Pt 12), 3685-3694.

Guignant, C., et al. (2011), Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients, *Crit Care*, 15(2), R99.

Hacker, U. T., et al. (2005), Adeno-associated virus serotypes 1 to 5 mediated tumor cell directed gene transfer and improvement of transduction efficiency, *J Gene Med*, 7(11), 1429-1438.

Hannappel, E., and W. Leibold (1985), Biosynthesis rates and content of thymosin beta 4 in cell lines, *Arch Biochem Biophys*, 240(1), 236-241.

Hannappel, E., and M. van Kampen (1987), Determination of thymosin beta 4 in human blood cells and serum, *J Chromatogr*, 397, 279-285.

Hinkel, R., I. Bock-Marquette, A. K. Hatzopoulos, and C. Kupatt (2010), Thymosin beta4: a key factor for protective effects of eEPCs in acute and chronic ischemia, *Ann N Y Acad Sci*, 1194, 105-111.

Hinkel, R., et al. (2008), Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection, *Circulation*, 117(17), 2232-2240.

Hirsch, M. L., L. Green, M. H. Porteus, and R. J. Samulski (2010), Self-complementary AAV mediates gene targeting and enhances endonuclease delivery for double-strand break repair, *Gene Ther*, 17(9), 1175-1180.

Houser, S. L., K. Kuwaki, C. Knosalla, F. J. Dor, B. Gollackner, J. Cheng, A. Shimizu, H. J. Schuurman, and D. K. Cooper (2004), Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons, *Xenotransplantation*, 11(5), 416-425.

<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=thymosin> (2011), Clinical Trials, edited.

Huang, L. C., D. Jean, R. J. Proske, R. Y. Reins, and A. M. McDermott (2007), Ocular surface expression and in vitro activity of antimicrobial peptides, *Curr Eye Res*, 32(7-8), 595-609.

Huff, T., C. S. Muller, A. M. Otto, R. Netzker, and E. Hannappel (2001), beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions, *Int J Biochem Cell Biol*, 33(3), 205-220.

Huff, T., A. M. Otto, C. S. Muller, M. Meier, and E. Hannappel (2002), Thymosin beta4 is released from human blood platelets and attached by factor XIIIa (transglutaminase) to fibrin and collagen, *FASEB J*, 16(7), 691-696.

Im, D. S., and N. Muzyczka (1992), Partial purification of adeno-associated virus Rep78, Rep52, and Rep40 and their biochemical characterization, *J Virol*, 66(2), 1119-1128.

Inagaki, K., S. Fuess, T. A. Storm, G. A. Gibson, C. F. McTiernan, M. A. Kay, and H. Nakai (2006), Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8, *Mol Ther*, 14(1), 45-53.

Inzitari, R., et al. (2009), HPLC-ESI-MS analysis of oral human fluids reveals that gingival crevicular fluid is the main source of oral thymosins beta(4) and beta(10), *J Sep Sci*, 32(1), 57-63.

Iwai, Y., M. Ishida, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Honjo, and N. Minato (2002), Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(19), 12293-12297.

Jin, Y., S. K. Chauhan, J. E. Annan, P. T. Sage, A. H. Sharpe, and R. Dana (2011), A novel function for programmed death ligand-1 regulation of angiogenesis, *Am J Pathol*, 178(4), 1922-1929.

Kashiwakura, Y., K. Tamayose, K. Iwabuchi, Y. Hirai, T. Shimada, K. Matsumoto, T. Nakamura, M. Watanabe, K. Oshimi, and H. Daida (2005), Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection, *J Virol*, 79(1), 609-614.

Keir, M. E., M. J. Butte, G. J. Freeman, and A. H. Sharpe (2008), PD-1 and its ligands in tolerance and immunity, *Annu Rev Immunol*, 26, 677-704.

Kobayashi, T., et al. (2002), Thymosin-beta4 regulates motility and metastasis of malignant mouse fibrosarcoma cells, *Am J Pathol*, 160(3), 869-882.

Kolber-Simonds, D., et al. (2004), Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7335-7340.

Kupatt, C., I. Bock-Marquette, and P. Boekstegers (2008), Embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection requires Thymosin beta4, *Trends Cardiovasc Med*, 18(6), 205-210.

Kuwaki, K., et al. (2005), Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience, *Nat Med*, 11(1), 29-31.

Li, X., L. Zheng, F. Peng, C. Qi, X. Zhang, A. Zhou, Z. Liu, and S. Wu (2007), Recombinant thymosin beta 4 can promote full-thickness cutaneous wound healing, *Protein Expr Purif*, 56(2), 229-236.

Lloyd-Jones, D., et al. (2010), Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association, *Circulation*, 121(7), e46-e215.

Loke, P., and J. P. Allison (2003), PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5336-5341.

---

Low, T. L., S. K. Hu, and A. L. Goldstein (1981), Complete amino acid sequence of bovine thymosin beta 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(2), 1162-1166.

Low, T. L., G. B. Thurman, M. McAdoo, J. McClure, J. L. Rossio, P. H. Naylor, and A. L. Goldstein (1979), The chemistry and biology of thymosin. I. Isolation, characterization, and biological activities of thymosin alpha1 and polypeptide beta1 from calf thymus, *J Biol Chem*, 254(3), 981-986.

Lunemann, J. D., S. Waiczies, S. Ehrlich, U. Wendling, B. Seeger, T. Kamradt, and F. Zipp (2002), Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells, *J Immunol*, 168(10), 4881-4888.

Ma, W., B. Li, C. Ling, G. R. Jayandharan, A. Srivastava, and B. J. Byrne (2011), A simple method to increase the transduction efficiency of single-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo, *Hum Gene Ther*, 22(5), 633-640.

Malinda, K. M., A. L. Goldstein, and H. K. Kleinman (1997), Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells, *FASEB J*, 11(6), 474-481.

Mannherz, H. G., and E. Hannappel (2009), The beta-thymosins: intracellular and extracellular activities of a versatile actin binding protein family, *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(10), 839-851.

Matsune, S., J. Ohori, K. Yoshifuku, and Y. Kurono (2010), Effect of vascular endothelial growth factor on nasal vascular permeability, *Laryngoscope*, 120(4), 844-848.

McCarty, D. M. (2008), Self-complementary AAV vectors; advances and applications, *Mol Ther*, 16(10), 1648-1656.

McCarty, D. M., T. H. Ni, and N. Muzyczka (1992), Analysis of mutations in adeno-associated virus Rep protein in vivo and in vitro, *J Virol*, 66(7), 4050-4057.

McLaughlin, S. K., P. Collis, P. L. Hermonat, and N. Muzyczka (1988), Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures, *J Virol*, 62(6), 1963-1973.

Mendelson, E., J. P. Trempe, and B. J. Carter (1986), Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide, *J Virol*, 60(3), 823-832.

Miyagi, N., V. P. Rao, D. Ricci, Z. Du, G. W. Byrne, K. R. Bailey, H. Nakai, S. J. Russell, and C. G. McGregor (2008), Efficient and durable gene transfer to transplanted heart using adeno-associated virus 9 vector, *J Heart Lung Transplant*, 27(5), 554-560.

- Monahan, P. E., and R. J. Samulski (2000), Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons?, *Mol Med Today*, 6(11), 433-440.
- Montenegro-Miranda, P. S., L. ten Bloemendaal, C. Kunne, D. R. de Waart, and P. J. Bosma (2011), Mycophenolate mofetil impairs transduction of single-stranded adeno-associated viral vectors, *Hum Gene Ther*, 22(5), 605-612.
- Moon, H. S., S. Even-Ram, H. K. Kleinman, and H. J. Cha (2006), Zyxin is upregulated in the nucleus by thymosin beta4 in SiHa cells, *Exp Cell Res*, 312(17), 3425-3431.
- Muller, O. J., S. Schinkel, J. A. Kleinschmidt, H. A. Katus, and R. Bekeredjian (2008), Augmentation of AAV-mediated cardiac gene transfer after systemic administration in adult rats, *Gene Ther*, 15(23), 1558-1565.
- Muzyczka, N. (1992), Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158, 97-129.
- Nakazawa, A., I. Dotan, J. Brimnes, M. Allez, L. Shao, F. Tsushima, M. Azuma, and L. Mayer (2004), The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells, *Gastroenterology*, 126(5), 1347-1357.
- Nishimura, H., and T. Honjo (2001), PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance, *Trends Immunol*, 22(5), 265-268.
- Nishimura, H., M. Nose, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo (1999), Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor, *Immunity*, 11(2), 141-151.
- Okazaki, T., et al. (2003), Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice, *Nat Med*, 9(12), 1477-1483.
- Olesen, C. E., Y. X. Yan, B. Liu, D. Martin, B. D'Eon, R. Judware, C. Martin, J. C. Voyta, and I. Bronstein (2000), Novel methods for chemiluminescent detection of reporter enzymes, *Methods Enzymol*, 326, 175-202.
- Ollinger, R., and J. Pratschke (2010), Role of heme oxygenase-1 in transplantation, *Transpl Int*, 23(11), 1071-1081.
- Orlova, V. V., M. Economopoulou, F. Lupu, S. Santoso, and T. Chavakis (2006), Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts, *J Exp Med*, 203(12), 2703-2714.
- Oropeza, M., et al. (2009), Transgenic expression of the human A20 gene in cloned pigs provides protection against apoptotic and inflammatory stimuli, *Xenotransplantation*, 16(6), 522-534.
- Pacak, C. A., C. S. Mah, B. D. Thattaliyath, T. J. Conlon, M. A. Lewis, D. E. Cloutier, I. Zolotukhin, A. F. Tarantal, and B. J. Byrne (2006), Recombinant adeno-associated

virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo, *Circ Res*, 99(4), e3-9.

Palomeque, J., E. R. Chemaly, P. Colosi, J. A. Wellman, S. Zhou, F. Del Monte, and R. J. Hajjar (2007), Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo, *Gene Ther*, 14(13), 989-997.

Petersen, B., J. W. Carnwath, and H. Niemann (2009), The perspectives for porcine-to-human xenografts, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 32(2), 91-105.

Petersen, B., A. Lucas-Hahn, E. Lemme, A.-L. Queisser, M. Oropeza, D. Herrmann, W. Kues, B. Barg-Kues, and H. Niemann (2010), Generation and characterization of pigs transgenic for human hemeoxygenase-1 (hHO-1), *Xenotransplantation*, 17, 102-103.

Phelps, C. J., et al. (2003), Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs, *Science*, 299(5605), 411-414.

Philp, D., and H. K. Kleinman (2010), Animal studies with thymosin beta, a multifunctional tissue repair and regeneration peptide, *Ann N Y Acad Sci*, 1194, 81-86.

Philp, D., A. L. Goldstein, and H. K. Kleinman (2004a), Thymosin beta4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development, *Mech Ageing Dev*, 125(2), 113-115.

Philp, D., M. Badamchian, B. Scheremeta, M. Nguyen, A. L. Goldstein, and H. K. Kleinman (2003), Thymosin beta 4 and a synthetic peptide containing its actin-binding domain promote dermal wound repair in db/db diabetic mice and in aged mice, *Wound Repair Regen*, 11(1), 19-24.

Philp, D., M. Nguyen, B. Scheremeta, S. St-Surin, A. M. Villa, A. Orgel, H. K. Kleinman, and M. Elkin (2004b), Thymosin beta4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells, *FASEB J*, 18(2), 385-387.

Popoli, P., et al. (2007), Neuroprotective effects of thymosin beta4 in experimental models of excitotoxicity, *Ann N Y Acad Sci*, 1112, 219-224.

Prasad, K. M., Y. Xu, Z. Yang, S. T. Acton, and B. A. French (2011), Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: in vivo gene delivery follows a Poisson distribution, *Gene Ther*, 18(1), 43-52.

Pulicherla, N., S. Shen, S. Yadav, K. Debbink, L. Govindasamy, M. Agbandje-McKenna, and A. Asokan (2011), Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer, *Mol Ther*, 19(6), 1070-1078.

Qiao, C., Z. Yuan, J. Li, B. He, H. Zheng, C. Mayer, and X. Xiao (2011), Liver-specific microRNA-122 target sequences incorporated in AAV vectors efficiently inhibits transgene expression in the liver, *Gene Ther*, 18(4), 403-410.

Qing, K., C. Mah, J. Hansen, S. Zhou, V. Dwarki, and A. Srivastava (1999), Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2, *Nat Med*, 5(1), 71-77.

Qiu, P., M. Kurpakus-Wheater, and G. Sosne (2007), Matrix metalloproteinase activity is necessary for thymosin beta 4 promotion of epithelial cell migration, *J Cell Physiol*, 212(1), 165-173.

Roy, P., Z. Rajfur, D. Jones, G. Marriott, L. Loew, and K. Jacobson (2001), Local photorelease of caged thymosin beta4 in locomoting keratocytes causes cell turning, *J Cell Biol*, 153(5), 1035-1048.

Safer, D., M. Elzinga, and V. T. Nachmias (1991), Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable, *J Biol Chem*, 266(7), 4029-4032.

Sanchez, A., et al. (2003), Immunopathology of an hDAF transgenic pig model liver xenotransplant into a primate, *Transplant Proc*, 35(5), 2041-2042.

Schmidt, M., et al. (2010), P688 - Das AAV 2/9 als potenter Vektor zur Transfektion porciner Kardiomyozyten mit Hilfe des in situ Langendorff Systems im heterotopen Herztransplantationsmodell, paper presented at Clin Res Cardiol 99, Suppl 1, April 2010, Schmidt M, Mannheim.

Schmoeckel, M., et al. (1998), Orthotopic heart transplantation in a transgenic pig-to-primate model, *Transplantation*, 65(12), 1570-1577.

Schulz, A. (2009), AAV2 vermittelte Transduktion von porcinem Myokard im Transplantationsmodell, 115 pp, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Schuurman, H. J., G. Pino-Chavez, M. J. Phillips, L. Thomas, D. J. White, and E. Cozzi (2002), Incidence of hyperacute rejection in pig-to-primate transplantation using organs from hDAF-transgenic donors, *Transplantation*, 73(7), 1146-1151.

Seisenberger, G., M. U. Ried, T. Endress, H. Buning, M. Hallek, and C. Brauchle (2001), Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus, *Science*, 294(5548), 1929-1932.

Shen, Z., X. Teng, X. Qian, M. He, Y. Hu, W. Ye, H. Huang, Y. Yu, and Y. Chen (2011), Immunoregulation effect by overexpression of heme oxygenase-1 on cardiac xenotransplantation, *Transplant Proc*, 43(5), 1994-1997.

Smart, N., C. A. Risebro, A. A. Melville, K. Moses, R. J. Schwartz, K. R. Chien, and P. R. Riley (2007), Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization, *Nature*, 445(7124), 177-182.

Sosne, G., A. Siddiqi, and M. Kurpakus-Wheater (2004a), Thymosin-beta4 inhibits corneal epithelial cell apoptosis after ethanol exposure in vitro, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(4), 1095-1100.

- Sosne, G., P. Qiu, and M. Kurpakus-Wheater (2007), Thymosin beta 4: A novel corneal wound healing and anti-inflammatory agent, *Clin Ophthalmol*, 1(3), 201-207.
- Sosne, G., S. Hafeez, A. L. Greenberry, 2nd, and M. Kurpakus-Wheater (2002a), Thymosin beta4 promotes human conjunctival epithelial cell migration, *Curr Eye Res*, 24(4), 268-273.
- Sosne, G., P. L. Christopherson, R. P. Barrett, and R. Fridman (2005), Thymosin-beta4 modulates corneal matrix metalloproteinase levels and polymorphonuclear cell infiltration after alkali injury, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(7), 2388-2395.
- Sosne, G., E. A. Szliter, R. Barrett, K. A. Kernacki, H. Kleinman, and L. D. Hazlett (2002b), Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury, *Exp Eye Res*, 74(2), 293-299.
- Sosne, G., A. R. Albeiruti, B. Hollis, A. Siddiqi, D. Ellenberg, and M. Kurpakus-Wheater (2006), Thymosin beta4 inhibits benzalkonium chloride-mediated apoptosis in corneal and conjunctival epithelial cells in vitro, *Exp Eye Res*, 83(3), 502-507.
- Sosne, G., C. C. Chan, K. Thai, M. Kennedy, E. A. Szliter, L. D. Hazlett, and H. K. Kleinman (2001), Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators in vivo, *Exp Eye Res*, 72(5), 605-608.
- Sosne, G., L. Xu, L. Prach, L. K. Mrock, H. K. Kleinman, J. J. Letterio, L. D. Hazlett, and M. Kurpakus-Wheater (2004b), Thymosin beta 4 stimulates laminin-5 production independent of TGF-beta, *Exp Cell Res*, 293(1), 175-183.
- Srivastava, A., E. W. Lusby, and K. I. Berns (1983), Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome, *J Virol*, 45(2), 555-564.
- Summerford, C., and R. J. Samulski (1998), Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions, *J Virol*, 72(2), 1438-1445.
- Sun, X., Y. Wu, W. Gao, K. Enjyoji, E. Csizmadia, C. E. Muller, T. Murakami, and S. C. Robson (2010), CD39/ENTPD1 expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice, *Gastroenterology*, 139(3), 1030-1040.
- Swindle, M. M. (1984), Swine as replacements for dogs in the surgical teaching and research laboratory, *Lab Anim Sci*, 34(4), 383-385.
- Tobiasch, E., M. Rabreau, K. Geletneky, S. Larue-Charlus, F. Severin, N. Becker, and J. R. Schlehofer (1994), Detection of adeno-associated virus DNA in human genital tissue and in material from spontaneous abortion, *J Med Virol*, 44(2), 215-222.
- Tseng, Y. L., et al. (2005), alpha1,3-Galactosyltransferase gene-knockout pig heart transplantation in baboons with survival approaching 6 months, *Transplantation*, 80(10), 1493-1500.

- Weaver, M. E., G. A. Pantely, J. D. Bristow, and H. D. Ladley (1986), A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man, *Cardiovasc Res*, 20(12), 907-917.
- Weber, A., V. T. Nachmias, C. R. Pennise, M. Pring, and D. Safer (1992), Interaction of thymosin beta 4 with muscle and platelet actin: implications for actin sequestration in resting platelets, *Biochemistry*, 31(27), 6179-6185.
- White, J. D., et al. (2011), Myocardial gene delivery using molecular cardiac surgery with recombinant adeno-associated virus vectors in vivo, *Gene Ther*, 18(6), 546-552.
- Xie, L., W. Shi, and P. Guo (2003), Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in corneal transplantation, *Transplantation*, 76(11), 1556-1559.
- Yamazaki, T., et al. (2002), Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC, *J Immunol*, 169(10), 5538-5545.
- Yang, J., et al. (2008), Critical role of donor tissue expression of programmed death ligand-1 in regulating cardiac allograft rejection and vasculopathy, *Circulation*, 117(5), 660-669.
- Young, J. D., A. J. Lawrence, A. G. MacLean, B. P. Leung, I. B. McInnes, B. Canas, D. J. Pappin, and R. D. Stevenson (1999), Thymosin beta 4 sulfoxide is an anti-inflammatory agent generated by monocytes in the presence of glucocorticoids, *Nat Med*, 5(12), 1424-1427.
- Zaidi, A., et al. (1998), Life-supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors, *Transplantation*, 65(12), 1584-1590.
- Zarbock, J., H. Oschkinat, E. Hannappel, H. Kalbacher, W. Voelter, and T. A. Holak (1990), Solution conformation of thymosin beta 4: a nuclear magnetic resonance and simulated annealing study, *Biochemistry*, 29(34), 7814-7821.
- Zentilin, L., and M. Giacca (2008), Adeno-associated virus vectors: versatile tools for in vivo gene transfer, *Contrib Nephrol*, 159, 63-77.
- Zhang, J., Z. G. Zhang, D. Morris, Y. Li, C. Roberts, S. B. Elias, and M. Chopp (2009), Neurological functional recovery after thymosin beta4 treatment in mice with experimental auto encephalomyelitis, *Neuroscience*, 164(4), 1887-1893.
- Zhang, Y., Y. Zhou, J. Lou, J. Li, L. Bo, K. Zhu, X. Wan, X. Deng, and Z. Cai (2010), PD-L1 blockade improves survival in experimental sepsis by inhibiting lymphocyte apoptosis and reversing monocyte dysfunction, *Crit Care*, 14(6), R220.
- Zhou, C. Y., E. McInnes, L. Copeman, G. Langford, N. Parsons, R. Lancaster, A. Richards, C. Carrington, and S. Thompson (2005), Transgenic pigs expressing human CD59, in combination with human membrane cofactor protein and human decay-accelerating factor, *Xenotransplantation*, 12(2), 142-148.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der Warteliste und der durchgeführten Herztransplantationen von 1991 – 2009. Die Daten beziehen sich auf die an Eurotransplant teilnehmenden Länder. (Quelle: Eurotransplant Jahresbericht 2010) .....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Genoms von AAV-2, modifiziert nach [Buning et al., 2008] .....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise von AAV-Vektoren. Lediglich die für die Verpackung und Replikation benötigten ITRs werden belassen, REP und CAP werden durch das gewünschte Gen ersetzt. ....	13
Abbildung 4: Infektionsbiologie am Beispiel von AAV-2. Modifiziert nach [Buning et al., 2008] .....	17
Abbildung 5: TB4-Struktur. A und B nach [Zarbock et al., 1990], C nach [Ballweber et al., 2002]. Modifiziert nach [Mannherz and Hannappel, 2009] .....	19
Abbildung 6: Schematische Darstellung der insbesondere für die Wundheilung wichtigen intra- und extrazellulären Funktionen von T $\beta$ 4. Im Zellkern fungiert T $\beta$ 4 als Transkriptionsfaktor und reguliert so v.a. wichtige Zellstrukturproteine. Diese werden benötigt für Funktionen wie z.B. die Migration, welche durch die Aktin-Bindungsfähigkeit von T $\beta$ 4 im Zellplasma beeinflusst wird. Extrazellulär hat Thymosin $\beta$ 4 unter anderem antientzündliche Eigenschaften und unterstützt mit Hilfe des Gerinnungsfaktors XIIIa die Bildung von Fibrinmonomeren. ....	22
Abbildung 7: Schematischer Aufbau des <i>in-situ</i> Langendorff Perfusionssystem. Über die venöse Kanüle gelangt das Blut in ein gewärmtes Reservoir, bevor es mittels einer Rollerpumpe durch einen Oxygenator geführt wird und letztendlich unter normothermen, normoxämen und normotonen Bedingungen die Aorta erreicht.	31
Abbildung 8: Operationssitus nach Kanülierung und Klemmen der Aorta ascendens und des Truncus pulmonalis. Zu sehen sind die aortale Kanüle, fixiert mit dem roten Tourniquet (1), das blaue Tourniquet kennzeichnet die venöse Kanüle (2). Erkennbar sind zudem die ligierte Vena cava inferior (3) und die beiden 120°-Klemmen distal der Kanülen (4) .....	35
Abbildung 9: In-situ Langendorff Perfusionssystem in Betrieb.....	36

---

Abbildung 10: Schematische Darstellung der abdominellen Verhältnisse nach Implantation des Spenderherzens .....	38
Abbildung 11: Operationssitus nach Anastomosierung und vollständiger Reperfusion des implantierten Herzens .....	40
Abbildung 12: Dissektionsschema der entommenen Grafts. Zur besseren Vergleichbarkeit verwendeten wir das gleiche Schema und das gleiche Computerprogramm (Organ 3D, B. Thein), welche schon in den zuvor durchgeführten in-situ Langendorff Versuchen verwendet wurden [Schulz, 2009]. .....	43
Abbildung 13: Beispiel für eine sehr gute Transduktion, erkennbar an der fast durchgehenden Blauverfärbung des Präparates in der x-Gal Färbung. Entnommen aus ISL 4, Segment 38 (rechter Ventrikel).....	50
Abbildung 14: Transgenexpression in ISL 2. Besonders im oberen rechten Ventrikel konnte eine gute bis sehr gute Transgenexpression erreicht werden. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein. .....	51
Abbildung 15: Transgenexpression in ISL 4. Gute bis sehr gute Transgenexpression in den meisten Segmenten des rechten und linken Ventrikels, an der Herzspitze teilweise keine Expression. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein. ....	51
Abbildung 16: Transgenexpression in ISL 7. Gute bis sehr gute Transgenexpression in den meisten Segmenten beider Ventrikel, Im Ventrikelseptum findet sich eine geringere Expression. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein .....	52
Abbildung 17: Transgenexpression in ISL 8. Gute bis sehr gute Transgenexpression in den meisten Segmenten des rechten und, noch stärker, des linken Ventrikels, im Ventrikelseptum teilweise keine Expression. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein.....	52
Abbildung 18: Transgenexpression in ISL 10. Homogene Verteilung, jedoch höchstens gute Transgenexpression in den meisten Segmenten des rechten und linken Ventrikels. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein .....	53

---

Abbildung 19: Transgenexpression in ISL 14. Wenig oder keine Transgenexpression in den meisten Segmenten. In nur drei Segmenten fand sich eine gute oder sehr gute Expression. Die Ursache sind in großflächigen Nekrosen des Herzens zu sehen (siehe Abb. 20). Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein. ....	53
Abbildung 20: Explantiertes und aufgeschnittenes Graft aus Versuch ISL 14. Zu erkennen ist überwiegend nekrotisch/hämorrhagisch verändertes Gewebe. ....	54
Abbildung 21: Transgenexpression in ISL 17. Gleichmäßig gute Transgenexpression in den Ventrikeln, etwas geringere Expression im Septum. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein. ....	55
Abbildung 22: Transgenexpression in ISL 18. Gute bis sehr gute Transgenexpression in den meisten Segmenten, vor allem in den oberen Anteilen des rechten Ventrikels. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein. ....	55
Abbildung 23: Mittlere LacZ-Expression. Dargestellt sind für jedes Segement jeweils der mittlere Expression Score. ISL 14 wurde aufgrund des vollkommen nekrotischen Grafts nicht mit einbezogen. Zu sehen ist, dass im Mittel eine gute bis sehr gute Transgenexpression der Ventrikel, vor allem des rechten Ventrikels, zu erreichen ist. Im Septum konnte im Durchschnitt nur eine mittlere bis geringe Transgenexpression erreicht werden. Zur Erklärung des Expression Scores siehe Tabelle 5. Software: Organ 3D, B. Thein. ....	56
Abbildung 24: Darstellung des lymphozytären Infiltrats anhand von Präparaten aus ISL 3, ISL 5, ISL 6 und ISL 7. Bei der verwendeten Hämatoxylin-Eosin-Färbung sind die Lymphozyten blau angefärbt. Die Präparate wurden angefertigt und beurteilt durch Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München. ....	59
Abbildung 25: Darstellung der Vaskulopathie in Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) und Elastika-van-Gieson-Färbung (EvG). Die oberen beiden Schnitte stammen aus ISL 3 und zeigen normale Gefäße ohne besondere pathologische Veränderungen. Die unteren beiden Präparate stammen aus ISL 7 und sind von starker Vaskulopathie geprägt. Die Präparate wurden angefertigt und beurteilt durch Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München. ..	60

Abbildung 26: Beispiel für den Quilty-Effekt (Endokardiale Lymphozyteninfiltration). Entnommen aus ISL 7. Das Präparat wurde angefertigt und beurteilt durch Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München. ....	61
Abbildung 27: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Spendertiere in Versuchs- und Kontrollgruppe. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,798$ ; T-Test).....	69
Abbildung 28: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Empfängertiere in Versuchs- und Kontrollgruppe. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,628$ ; T-Test).....	70
Abbildung 29: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Spendertiere in Versuchs- und Kontrollgruppe. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,306$ ; T-Test).....	71
Abbildung 30: Darstellung der mittleren Gesamtischämiezeiten in Versuchs- und Kontrollgruppe. Im Schnitt waren die Herzen der Versuchsgruppe einer signifikant längeren Ischämiezeit ausgesetzt ( $p = 0,003$ ; T-Test) .....	72
Abbildung 31: Darstellung des mittleren Körpergewichts der Spendertiere in Versuchs- und Kontrollgruppe. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen ( $p = 0,824$ ; T-Test).....	73
Abbildung 32: Darstellung des Dissektionsschemas. Die für die Messung der Kapillaranzahl herangezogenen Segmente sind rot beschriftet. ....	75
Abbildung 33: Demonstration der AP-Färbung anhand von zwei Beispielen aus der Kontroll- und der Versuchsgruppe. Die beiden oberen Schnitte stammen aus ISL 19 (TB4), die beiden Unteren aus ISL 18 (LacZ), jeweils aus Segment 44.....	76
Abbildung 34: Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment vier. Sowohl unter 10-facher (links) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe ( $n = 9$ ) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe ( $n= 6$ ), T-Test .....	80
Abbildung 35: Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment 6. Sowohl unter 10-facher (links, Mann-Whitney Rank Sum Test) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts, T-Test) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe ( $n = 9$ ) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe ( $n = 6$ ).....	81

Abbildung 36: Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment 6. Sowohl unter 10-facher (links) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe (n = 9) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe (n= 6), T-Test. ....	82
Abbildung 37: Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment 32. Sowohl unter 10-facher (links, Mann-Whitney Rank Sum Test) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts, T-Test) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe (n = 9) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe (n = 6). ....	83
Abbildung 38: Darstellung der mittleren Kapillaranzahl im Segment 44. Unter 10-facher Vergrößerung (links, Mann-Whitney Rank Sum Test) war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe (n = 9) signifikant höher als in der LacZ-Gruppe (n = 6). Unter 32-facher Vergrößerung (rechts, T-Test) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.....	84
Abbildung 39: Vergleich der Gesamtkapillaranzahl aus Versuchs- und Kontrollgruppe. Sowohl unter 10-facher (links) als auch unter 32-facher Vergrößerung (rechts) waren die Daten nicht normalverteilt. In beiden Fällen war die Kapillaranzahl in der TB4-Gruppe (n = 45) im Vergleich zur LacZ-Gruppe (n = 30) signifikant größer (p = 0,001), Mann-Whitney Rank Sum Test. ....	85
Abbildung 40: Schematische Darstellung des Schweineendothels, an welchem die Abstoßungsreaktionen primär ablaufen. Links dargestellt ist ein unverändertes Endothel, rechts auf $\alpha$ 1,3Gal-KO Basis die vielfältigen Ansätze, gentechnisch die hyperakute (HAR), die akute vaskuläre (AVR) und die zelluläre (CXR) Abstoßungsreaktion zu beeinflussen. Modifiziert nach [Petersen et al., 2009]. .	98

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TB4 Schlüsselfunktionen, Modifiziert nach [Philp and Kleinman, 2010] ...	20
Tabelle 2: Auflistung der Abstoßungsformen sortiert nach ihrem zeitlichen Auftreten .....	24
Tabelle 3: Stadieneinteilung (vereinfacht) der ISHLT zur akuten und chronischen Transplantatabstoßung, modifiziert nach [Nakazawa et al., 2004; Yamazaki et al., 2002] .....	25
Tabelle 4: Übersicht über die Versuche, bei denen das Markerprotein LacZ verwendet wurde. ISL 12 wurde nicht in die Auswertung zur Ermittlung des Kardiomyotropismus einbezogen, da nach nur 4 Tagen eine Transgenexpression nicht zu erwarten war. ....	48
Tabelle 5: Darstellung der dem Grad der Blaufärbung zugeordnete numerische Wert, welcher in der 3D-Darstellung jeweils eine bestimmte Farbe zugeordnet wurde. ....	49
Tabelle 6: Übersicht über die Versuche, bei welchen AAV-2/9-PD-L1 verwendet wurde. Alle 3 Versuche wurden nach zwei Monaten beendet, weil die Versuchstiere über 60 kg wogen.....	57
Tabelle 7: Tabellarische Darstellung der histopathologischen und immunhistochemischen Auswertung der Versuche ISL 2 – ISL 7 durch Prof. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München. Der Quilty – Effekt konnte in ISL 5 – ISL 7 nicht untersucht werden, da kein Endothel angeschnitten war. ISL 2, ISL 4 und ISL 7 bildeten die Kontrollgruppe.....	58
Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der Versuche ISL 8 - ISL 11 .....	62
Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der histopathologischen und immunhistochemischen Auswertung der Versuche ISL 8 - ISL 11. Durchgeführt von Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München.....	63
Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Versuche ISL 12 und ISL 13. Erstmals wurden hier Munich-Mini-Pigs als Empfängertiere eingesetzt, beide Versuche mussten bereits nach 4 Tagen beendet werden, weil keine Graft-Funktion mehr nachweisbar war. ....	64

---

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der histopathologischen Auswertung der Versuche ISL 12 und ISL 13. Beide Herzen zeigten Zeichen einer akuten humoralen Abstoßung. Durchgeführt von Prof. Dr. Sotlar und Dr. Faber, Pathologisches Institut, LMU München. ....	64
Tabelle 12: Tabellarische Darstellung der Versuche ISL 14 - ISL 23, bei welchen wir als zusätzliches Immunsuppressivum MMF verwendeten. Zusätzlich wurde bei diesen Versuchen die maximale Überlebenszeit auf 18 Tage festgelegt. ....	66
Tabelle 13: Darstellung einiger für den Versuchserfolg möglicherweise wichtiger Versuchsparameter, welche im Folgenden näher untersucht werden sollen. ....	68
Tabelle 14: Darstellung der aus jeweils vier Schnitten gemittelten Kapillaranzahl in den Segmenten 4, 6, 20, 32 und 44 unter 32-facher Vergrößerung. Bei ISL 14 konnten aufgrund des vollkommen nekrotischen Grafts keine Verwertbaren Färbungen angefertigt werden. ....	77
Tabelle 15: Darstellung der aus jeweils vier Schnitten gemittelten Kapillaranzahl in den Segmenten 4, 6, 20, 32 und 44 unter 10-facher Vergrößerung. Bei ISL 14 konnten aufgrund des vollkommen nekrotischen Grafts keine Verwertbaren Färbungen angefertigt werden. ....	78

## 9. Abkürzungsverzeichnis

°C:	Grad Celsius
µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer
3D:	dreidimensional
A.:	Arteria
A1:	Transkriptionsfaktor
A20:	Transkriptionsfaktor
a5β1:	Korezeptor AAV-2
Aa:	Arteriae
AAV:	Adeno(virus) - Assoziierter - Virus(vektor)
AAV-9-CMV:	AAV Serotyp 9 mit CMV-Promotor
AAV-mo.1:	Serotyp des Adenovirus-assoziierten Virusvektors
AAV-ra.1:	Serotyp des Adenovirus-assoziierten Virusvektors
Abb.:	Abbildung
ADP:	Adenosindiphosphat
AG:	Arbeitsgemeinschaft
AMP:	Adenosinmonophosphat
AP:	Alkalische Phosphatase
APC:	antigenpräsentierende Zellen
Aqua dest.:	destilliertes Wasser
ATP:	Adenosintriphosphat
AVR:	akute vaskuläre Abstoßungsreaktion
avβ5:	Integrin (Korezeptor AAV-2)
AAV - 2/9:	Adeno-Assoziierter-Virus - 2/9
AZ:	Allgemeinzustand
BE:	Base Excess
bFGF:	Fibroblast Growth Factor

bzw.:	beziehungsweise
C4d:	Complementfaktor 4d
ca.:	circa
CAP:	Für das Kapsid kodierende Region des AAV-Genoms
CD3:	Cluster of Differentiation 3
CD39:	Cluster of Differentiation 39
CD46:	Membran Kofaktor Protein, MCP
CD46:	Membran Ko-Faktor Protein, MCP
CD47:	Cluster of Differentiation 47
CD55:	Decay Accelerating Factor, DAF
CD73:	Cluster of Differentiation 73
CF:	Cystische Fibrose
c-met:	Korezeptor AAV-2
CMV:	Cytomegalievirus (Promotor)
CO <sub>2</sub> :	Kohlendioxyd
CRF:	komplementregulatorische Faktoren
CRP:	C-reaktives Protein
CTLA4:	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CTLA-4Ig:	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4-Immunglobulin
cTnT:	kardiales Troponin T
CXR:	zelluläre Abstoßungsreaktion
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EDTA:	Ethyldiamintetraacetat
EKG:	Elektrokardiogramm
EMT:	Epithelial to Mesenchymal Transition
EPCR:	endothelialer Protein C Rezeptor
EPDC:	Epicardium-derived Progenitor Cells = Vorläuferzellen epikardialen Ursprungs
EvG:	Elastika-van-Gieson-Färbung

Fas:	Transmembranrezeptor der TNF-Familie
FGFR-1:	Fibroblast-Growth-Factor-Receptor (Korezeptor AAV-2)
g:	Gramm
Gal-KO:	$\alpha$ 1,3-Galaktosyltransferase knock-out
Gal $\alpha$ 1,3Gal:	Produkt der $\alpha$ 1,3 Galaktosyltransferase
GmbH:	Gemeinschaft mit begrenzter Haftung
h:	Stunde
HAES:	Hydroxyethylstärke
HAR:	hyperakuten Abstoßungsreaktion
hCD46:	Humanes Membran-Kofaktor-Protein (MCP)
hCD55:	Humaner Decay Accelerating Factor (DAF)
hCD59:	Humanes Cluster of Differentiation 59
HE:	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGFR:	Hepatocyte-Growth-Factor-Rezeptor (Korezeptor AAV-2)
HHV-6:	Humane Herpes Viren Typ 6
HIF-1 $\alpha$ :	Hypoxia-Inducible-Factor-1 $\alpha$
HLA:	Human Leukocyte Antigen
HLA-E:	Transgen
HO-1:	Hämoxygenase-1
HSPG:	Heparan Sulfat Proteoglykan (Primärrezeptor AAV-2, AAV-3, AAV-7)
HSV:	Herpes Simplex Virus
hTM:	Humanes Thrombomodulin
HTX:	Hertransplantation
i. m.	intramuskulär
I.E.:	Internationale Einheiten
i.v.:	intravenös
IgM:	Immunglobulin M
ILK:	Integrin-linked Kinase

IMPDH:	Inosinmonophosphat Dehydrogenase
Inc:	Incorporated
ISHLT:	International Society for Heart and Lung Transplantation
ISL:	In-situ Langendorff
ITIM:	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
ITR:	Invertierte Terminale Repetitionen
ITSM:	immunoreceptor tyrosine-based switch motif
Kb:	Kilobasen
kg:	Kilogramm
KG:	Körpergewicht
l:	Liter
LacZ:	β-Galaktosidase-Gen
LCA:	Left coronary artery
LEA29Y:	CTLA4-Ig Variante (belatacept)
LMU:	Ludwig-Maximilians-Universität
Ltd.:	Limited
LVAD:	Left Ventricular Assist Device
M.:	Musculus
MAC:	Membrane attack complex
mg:	Milligramm
MHC:	Major Histocompatibility Complex
microRNA:	Mikrорибонуклеинсäure
ml:	Milliliter
mm:	Millimeter
mM:	Millimol
MMF:	Mycophenolatmofetil
MMPs:	Matrix Metalloproteininasen
mRNA:	messengerRibonukleinsäure

ng:	Nanogramm
NK-Zellen:	Natürliche Killerzellen
nm:	Nanometer
NMR:	Nuklear Magnet Resonace
N-Terminus:	Polypeptidende mir freier Aminogruppe
ORF:	Open Reading Frames
p:	p-Wert
p19:	Promotor “p19”
p40:	Promotor “p40”
p5:	Promotor “p5”
PD-1:	Programmed Death Receptor 1
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor
PD-L1:	Programmed Death Ligand 1
PINCH:	Particularly Interesting Cys-His-rich Protein
rAAV-2/9:	rekombinanter Adeno-Assoziierter-Virus
REP:	Für die Replikationsproteine kodierende Region d. AAV-Genoms
Rep40:	Spleißvariante des Proteins “Rep52”
Rep52:	Protein “Rep52”
Rep68:	Spleißvariante des Proteins “Rep78”
Rep78:	Protein “Rep78”
S.:	Seite
S1:	Risikogruppe 1
scAAV:	self-complimentary Adeno-Associated Virus
SES:	Subendokardiale Segmentverkürzung
ssAAV:	single-stranded Adeno-Associated Virus
STEMI:	ST-Hebungs-Infarkt
TAH:	Total Artificial Heart

TFPI:	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGF $\beta$ :	Transforming Growth Factor
TNF:	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF- $\alpha$ :	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TRAIL:	TNF- $\alpha$ related apoptosis inducing factor
T $\beta$ 4:	Thymosin- $\beta$ -4
TVP:	Transplantatvaskulopathie

u. a.:	unter anderem
UK:	United Kingdom
USA:	United States of America
UTR:	untranslated region

v.a.	vor allem
VAD:	Ventricular Assist Device
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VP1:	Viruskapsidprotein1
VP2:	Viruskapsidprotein2
VP3:	Viruskapsidprotein3

X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

z. B.:	zum Beispiel
z. T.:	zum Teil
ZKBS:	Zentrale Kommission für biologische Sicherheit

## 10. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass ich diese Arbeit erfolgreich durchführen konnte.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Bruno Reichart für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit in dem spannenden Gebiet der Xenotransplantationsforschung mitzuwirken. Besonderer Dank gilt auch meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Michael Schmoekel, der mich insbesondere auch beim Schreiben von Abstracts für Kongresse und Veröffentlichungen unterstützte, sowie Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl für die Möglichkeit, in den Räumen des Walter-Brendel-Zentrums für chirurgische Forschung zu arbeiten.

Großer Dank gebührt dem gesamten Team der herzchirurgischen Forschung, insbesondere Herrn Dr. med. Lars Burdorf, dem Betreuer meiner Arbeit, Herrn Dr. med. vet. Michael Thormann, Herrn Dr. med. vet. Eckart Thein und vor allem auch Johannes Postrach, der mir mittlerweile auch ein guter Freund geworden ist. Der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Kupatt und Dr. med. vet. Rabea Hinkel danke ich für die gute Kooperation.

Privat danken möchte ich meinen Freunden, welche mir in schwierigen Phasen den nötigen Ausgleich zum wissenschaftlichen Arbeiten boten und mich zur Fertigstellung dieser Arbeit zu motivierten. Mein Dank gilt insbesondere auch cand. med. Henrike Rieger, welche mir in den letzten Jahren privat wie auch beruflich unterstützend zur Seite stand. Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie danken, durch die dieser Ausbildungsweg erst möglich wurde.

Danke.