

---

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Professor Dr. med. vet. Rüdiger Wanke

Angefertigt in der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Mentor: Professor Dr. med. Peter Boekstegers)

**Effekte der gentherapeutischen Inhibition der beta-Adrenorezeptor  
Kinase 1 ( $\beta$ ARK1 = GRK2) auf die kardiale Funktion in einem  
Schweinmodell der chronischen Herzinsuffizienz**

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

von

Michael Thormann  
aus Koblenz

München 2012

---

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Wess

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

**Meiner Familie  
und  
meinen Eltern  
in Dankbarkeit gewidmet**

---

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>11</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>13</b>
1.	Pathogenese der Herzinsuffizienz	13
2.	Adrenerges System	17
3.	Guanin-nukleotid-bindendes-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren)	22
4.	Mechanismen der Desensitivierung von heptahelikalen Rezeptoren	29
5.	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und $\beta$ -Arrestine	32
5.1.	Allgemeines	32
5.2.	Die Rolle von GRK2 bei Herz-Gefäß-Erkrankungen	35
5.3.	$\beta$ -Arrestine	37
6.	Gentherapeutische Inhibition der GRK2	39
7.	$\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten/ $\beta$ -Rezeptoren-Blocker ( $\beta$ -Adrenolytica/ $\beta$ -Sympatholytica)	42
8.	Adeno-assoziierte-Viren (AAV)	47
9.	Brain Natriuretic Peptide (BNP)	49
<b>III.</b>	<b>ZIELE DER STUDIE</b>	<b>52</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>53</b>
1.	Studiendesign	53
2.	Versuchsgrundlagen	54
2.1.	Versuchstiere	54
2.2.	OP-Vorbereitung – Kalibrierung der Hämodynamischen-Messgeräte	54
2.3.	Hämodynamische Grundlagen	55
2.3.1.	Arterielle Blutdruckmessung	55
2.3.2.	Ejektions-/Auswurfraction	55
2.3.3.	Messung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP)	56
2.3.4.	Systolische Anstiegsgeschwindigkeit des linksventrikulären Drucks nach der Zeit (dLVP/dt)	57
2.3.5.	Fluoreszierende Mikrosphären	57
2.4.	Selektive druckregulierte Retroinfusion und Absaugung (SSR)	62
2.5.	Sonomikrometrie	66

---

2.6.	BNP (Brain Natriuretic Peptide)	70
2.7.	Infarktgrößenbestimmung	71
2.8.	Gel- und Pufferzusammensetzungen für den Western Blot	73
2.9.	Western Blot (Molekulargenetischer Nachweis der Proteinsynthese nach erfolgreicher Transduktion)	74
2.9.1.	Gelherstellung	75
2.9.2.	Probenaufbereitung und Western Blot	75
2.10.	Narkoseeinleitung, Narkosefortführung und Überwachung	76
2.11.	Intraoperativ eingesetzte Medikamente	78
2.11.1.	Infusionen	78
2.11.2.	Antikoagulantien	78
2.11.3.	Dobutamin-Stressmessung (Dobutamin-Belastungstest)	78
2.11.4.	$\beta$ -Rezeptoren-Blocker ( $\beta$ -Adrenolytica/ $\beta$ -Sympatholytica)	79
2.11.5.	Antibiose	80
2.11.6.	Muskelrelaxantien	80
2.11.7.	Opioide	80
2.12.	Notfallmedikamente/Defibrillator	80
<b>3.</b>	<b>Versuchsbeschreibung und Protokoll</b>	<b>80</b>
3.1.	Chronisches Ischämie-/Reperusionsmodell	80
3.1.1.	Versuchstag 0: Hämodynamische Messungen und Infarktinduzierung	80
3.1.2.	Versuchstag 14: Hämodynamische Messungen, Druckregulierte Retroinfusion und Therapie mittels $\beta$ ARK-ct	83
3.1.3.	Therapie mit Betablockern	85
3.1.4.	Versuchstag 56: Hämodynamische Messungen, Sternotomie, Sonomikrometrie und Gewebeentnahme	85
<b>V.</b>	<b>STATISTIK</b>	<b>89</b>
<b>VI.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>90</b>
<b>1.</b>	<b>Verifizierung des Versuchsmodells</b>	<b>90</b>
1.1.	Infarktgröße	90
1.2.	Regionaler myokardialer Blutfluss am Versuchstag 14	90
1.3.	Brain Natriuretic Peptide (BNP)	91
1.4.	MRT Darstellung des Infarkts	92
1.5.	Nachweis der AAV2/9-lac-Z-Expression	93
1.6.	$\beta$ ARKct-Expressionsnachweis	93
<b>2.</b>	<b>Hämodynamische Parameter</b>	<b>95</b>
2.1.	Globale Myokardfunktion (LVEDP und EF)	95
2.1.1.	LVEDP	95

---

2.1.2.	Ejektionsfraktion	96
2.2.	Regionale Myokardfunktion	98
2.3.	Regionaler myokardialer Blutfluss	100
2.4.	Kontraktilitätsindex dp/dt	102
<b>3.</b>	<b>Histopathologische Auswertungen</b>	<b>105</b>
<b>4.</b>	<b>MRT (Magnetresonanztomographie)</b>	<b>106</b>
4.1.	MRT Ejektionsfraktionsmessung	106
4.2.	Messung des enddiastolischen Volumens mittels MRT	108
4.3.	Bestimmung des Schlagvolumens mittels MRT	109
4.4.	MRT Verlaufsvergleich im 4-Kammerblick	110
<b>VII.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>111</b>
<b>1.</b>	<b>AAV2/9 medierte <math>\beta</math>ARKct-Gentherapie als potentielle Therapieform in der chronischen Herzinsuffizienz</b>	<b>111</b>
<b>2.</b>	<b>Anforderungen an das Versuchsmodell</b>	<b>113</b>
2.1.	Tierexperimentelles Modell der chronischen Herzinsuffizienz	113
2.2.	Grundlegende Anforderungen an eine erfolgreiche Gentherapie	114
<b>3.</b>	<b>Reliabilität und Validität des Versuchsmodells</b>	<b>115</b>
<b>4.</b>	<b>Gentransfer des ischämischen Myokards mittels Selektiver druckregulierter Retroinfusion</b>	<b>117</b>
<b>5.</b>	<b>AAV2/9-<math>\beta</math>ARKct-Gentherapie verbessert die kardiale Funktion in einem Modell der chronischen Herzinsuffizienz</b>	<b>118</b>
<b>6.</b>	<b>AAV2/9-<math>\beta</math>ARKct-Gentherapie und die Betablocker-Therapie verbessern die Anzeichen einer Herzinsuffizienz in vergleichbarem Ausmaß</b>	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>120</b>
<b>VIII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>124</b>
<b>IX.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>127</b>
<b>X.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>129</b>
<b>XI.</b>	<b>AUS TEILEN DIESER ARBEIT BEREITS HERVORGEANGENE PUBLIKATIONEN</b>	<b>145</b>
<b>XII.</b>	<b>WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN</b>	<b>146</b>

**XIII. DANKSAGUNG**

**149**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AAR	Area at risk/Gefährdetes Myokardareal
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AIV	anteriore interventrikuläre Vene
AK	Antikörper
AKT	Serin/Threonin Proteinkinase
AKT1/2/3	Gene der Proteinkinase-B
AMI	akuter Myokardinfarkt
ANOVA-Test	Analysis of Variance/univariate Varianzanalyse
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AT1A	Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1 A
APS	Ammoniumperoxidsulfat-Lösung
AMP	Adenosin-3',5'-monophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
A./V.	Arteria/Vena
AV-Blocks	atrioventrikulärer Block
$\beta$ ARK	Beta-adrenerge Rezeptorkinase
$\beta$ ARK-ct	Beta-adrenerge Rezeptorkinase-Carboxyl-Terminus
BNP	Brain Natriuretic Peptide/Hirn natriuretisches Peptid
Ca <sup>2+</sup>	intrazelluläre Calciumkonzentration
cAMP	Zyklisches Adenosin Monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
c-Src	Tyrosinkinase Src (zusammengesetztes Akronym aus cellular und sarcoma)
d	Tag
D1	erster Diagonalast der LAD
DAG	Diaglycerol
dLVP/dt	Ableitung des linksventrikulären Druckes nach der Zeit
dLVP/dt <sub>max</sub>	maximaler Anstieg des linksventrikulären Druckes
dLVP/dt <sub>min</sub>	maximaler Abfall des linksventrikulären Druckes
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDL	enddiastolische Länge
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
EKG	Elektrokardiogramm
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
ESL	Endsystolische Länge
Fr.	French (Maß für den Außendurchmesser von Kanülen und Kathetern)
gc	genome copies

GC-A	Guanylylcyclase-A
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein oder GTP-bindendes Protein
G <sub>s</sub>	G-Protein-Familie s
GRKs	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
[GRK(-/+)]	GRK2-Knockout
GTPase	Guaninnucleotid-bindendes Protein, das durch die alternierende Bindung der Nukleotide GDP oder GTP als molekularer „Schalter“ in Signaltransduktionsketten fungiert
h	Stunden/hours
HI	Herzinsuffizienz
hnRNA	heterogene nucleäre RNA
HRP Conjugate	Anti-Dioxigenin-Antikörper
HZV	Herzzeitvolumen
IgG	Immunglobulin G
IHK	ischämische Herzkrankheit
I <sub>K,Ach</sub> -Kanäle	Kalium-Kanäle am Herzen
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
ISA	intrinsische sympathomimetische Aktivität
J	Joule
JNK 3	c-Jun-Aminoterminal-Kinase 3
K	Kalium
KCL	Kalium-Chlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Knockout
lacZ-Gen	Gen, das für das Enzym $\beta$ -Galactosidase codiert
LAD	left anterior descending/Ramus interventricularis anterior (RIVA)
LV	linker Ventrikel
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVP	linksventrikulärer Druck
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MDM2	murine double minute oncogene 2
MEAN	Mittelwert
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumdichlorid
min.	minutes/Minuten
MLC	leichte Myosinketten
MLK	Myosin-Leichtketten-Kinase
mM	Millimol
MPO	Myeloperoxydase
MRT	Magnetresonanztomograph
mRNA	Boten-RNA
n	number/Anzahl

Na	Natrium
NaCl	Natrium-Chlorid (Kochsalz)
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
OP	Operationssaal
RCx	Ramus circumflexus (der linken Koronararterie)
ROI	reactive oxygen intermediates/reaktive Sauerstoffzwischenprodukte
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
pCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PDE	Phosphodiesterase
PDGFR β	Platelet-derived growth factor-Receptor β/Plättchen-stämmiger Wachstumsfaktor-Rezeptor β
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA	Protein-Kinase-A
PKB	Protein-Kinase-B
PKC	Protein-Kinase-C
PKG1	cGMP-abhängige Proteinkinase
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
R*	aktive Rezeptorkonformation
RAO	Right-Anterior-Oblique-Projektion
rtPCR	„real time“ Polymerasekettenreaktion
% SS	prozentuale Veränderung der Segmentlänge
SDR	age-standardized death rate
SDS	Sodium-Dodecylsulfat/Natrium-Dodecylsulfat
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase/ Calciumpumpe des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums
SES	Segmentshortening/Segmentverkürzung
SPUs	Sample Processing Unit/Materialproben-Aufbereitungseinheit
SSR	Selective suction and pressure-regulated retroinfusion/Selektive Absaugung und druckregulierte Retroinfusion
STABW	Standardabweichung
STEMI	ST-Hebungsinfarkt
Temed	Tetramethylethylendiamin
t-Test	beliebiger Hypothesentest mit t-verteilter Testprüfgröße
WHO	World Health Organisation
X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl-β-D-galaktosid

## I. EINLEITUNG

Laut European health report 2009 der World Health Organisation (WHO), stellen Krankheiten des Herzkreislaufsystems immer noch die Todesursache Nummer eins in den europäischen Industrienationen dar<sup>1</sup>. Sie sind für 48 % aller Todesfälle in Europa verantwortlich. Insbesondere die chronische Herzinsuffizienz ist mit einer dramatischen Einschränkung der Lebensqualität vergesellschaftet. 5 Jahres Überlebensraten liegen bei etwa 5 %, was mit einer malignen Grunderkrankung vergleichbar ist. Trotz beachtlicher Fortschritte bei Therapie und Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen wie der koronaren Herzerkrankung oder dem akuten Myokardinfarkt, steigt die Inzidenz und Prävalenz der chronischen Herzinsuffizienz weiter an und stellt so auch ein zunehmendes sozioökonomisches Problem dar.

Per Definition der WHO von 1995 liegt eine Herzinsuffizienz dann vor, wenn eine myokardiale Funktionsstörung nachweisbar ist und durch die Herzmuskelschwäche ein Missverhältnis zwischen der aktuellen Herzauswurfleistung und dem Bedarf des Organismus vorliegt sowie dadurch typische Symptome entstehen. In den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) von 2001 geht zudem das Ansprechen auf eine medikamentöse Herzinsuffizienz-Therapie mit in die Definition ein.

Klinisch manifestiert sich die Herzinsuffizienz in einer verminderten körperlichen Belastbarkeit, Angina Pectoris, Dyspnoe sowie der Neigung zu Herzrhythmusstörungen. Abhängig von der Belastungsstufe, bei der erste Symptome auftreten kann man die Herzinsuffizienz in 4 Schweregrade nach den Kriterien der New York Heart Association einteilen (NYHA Klassifikation).

### New York Heart Association (NYHA-) Klassifikation:

- I Herzkrankheit ohne Beschwerden bei normaler körperlicher Belastung
- II Belastungsinsuffizienz, Beschwerden bei stärkerer körperlicher Belastung
- III Beginnende Ruheinsuffizienz, Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung, in Ruhe meist beschwerdefrei
- IV manifeste Ruheinsuffizienz, Beschwerden in Ruhe

Des Weiteren kann man zwischen akut und chronischer Herzinsuffizienz, Rechts- und Linksherzinsuffizienz sowie systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz unterscheiden.

Die häufigsten Ursachen für eine chronische Herzinsuffizienz stellen die koronare Herzerkrankung (KHK) gefolgt von der arteriellen Hypertonie dar. Weiterhin können angeborene oder erworbene Herzklappenfehler eine Herzinsuffizienz zur Folge haben. In der Gruppe der herzinsuffizienten Patienten ohne begleitende KHK spielen ein Diabetes mellitus, Infektionen sowie Äthyl- oder Medikamententoxische Effekte eine Rolle. Oft kann hier jedoch auch keine spezifische Ursache eruiert werden. Der Vollständigkeit halber sollen auch noch seltenere Ursachen wie Diffusionsstörungen durch pathologisch intramural verlaufende großlumige extramurale Koronarien, Transitstreckenblocks oder Kinking-Verläufe von Koronargefäßmuskelfasern erwähnt werden.

Da insbesondere bei der chronischen Herzinsuffizienz meist keine reversible Ursache mehr nachweisbar ist, basiert die weitergehende Therapie vorwiegend auf pharmakologischen Interventionen. Diese basieren auf der Prävention einer weitergehenden Verschlechterung der Herzfunktion durch  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten, ACE-Hemmer, AT1-Rezeptorantagonisten oder Aldosteronantagonisten<sup>2; 3; 4; 5; 6</sup>, für die in randomisierten Studien Prognose verbessernde Effekte nachgewiesen wurden (z.B. EPHEBUS; RALES, Val-HEFT, CAPRICORN, SOLVD, CONSENSUS). Zudem gilt die Therapie der Sekundärprophylaxe mit Optimierung der kardiovaskulären Risikofaktoren durch Behandlung einer Dyslipidämie oder eines Hypertonus und der Symptomlinderung durch Gabe von Diuretika oder Digitalispräparaten als Mittel der Wahl.

Die vorliegende Dissertation soll nun die Frage klären, ob eine gentherapeutische Inhibition der  $\beta$ -Adrenorezeptorkinase eine potentiell neue Therapieoption bei chronischer Herzinsuffizienz darstellt und zusätzlich deren Effekte mit denen einer medikamentösen Standardtherapie vergleichen.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Pathogenese der Herzinsuffizienz

Wie bereits dargestellt, liegt in 50-75 % der Fälle sowohl der akuten als auch der chronischen Herzinsuffizienz eine koronare Herzkrankheit (KHK) bzw. ein stattgehabter ST-Hebungsinfarkt (STEMI/ST-elevation myocardial infarction, akuter Myokardinfarkt AMI) zugrunde<sup>7</sup>. Als Hauptursache für einen AMI wird eine ausgeprägte Koronarsklerose mit erheblicher Lumeneinschränkung angesehen. Bei der Ruptur arteriosklerotischer Plaques können Endotheldefekte oder gar Koronarthrombosen entstehen<sup>8; 9</sup>. Der hierdurch verursachte Gefäßverschluss bedingt eine akute Myokardischämie und Gewebenekrose sowie bei länger als 30 Minuten andauerndem Verschluss die Ausbildung einer charakteristischen Infarkt Narbe<sup>8; 2</sup>. Das Ausmaß des Myokardinfarktes (MI) hängt dabei entscheidend von dem Versorgungsbereich der verschlossenen Koronararterie, der Verschlussdauer, dem Sauerstoffbedarf zum Zeitpunkt des Verschlusses, der Höhe der Koronardurchblutung, der ischämischen Toleranz des Myokards zu Infarktbeginn und von der anschließenden Reperfusion des Infarktareals ab<sup>8</sup>. Der akute oder plötzliche Herztod durch Herzrhythmusstörungen oder Kammerflimmern ist die häufigste akut letale Komplikation des MI. Die schnelle Revaskularisierung des Gefäßverschlusses mittels perkutaner transluminaler coronarer Angioplastie (PTCA) ist somit aktuell Therapie der Wahl<sup>10; 3</sup>. Bei zeitnaher Revaskularisierung kann hierdurch eine Reduktion des Myokardschadens und damit der Infarktgröße erzielt werden<sup>10</sup>. Die intrakoronare Einlage eines unbeschichteten oder auch medikamentenbeschichteten Stents (drug eluting stent) kann die Aufrechterhaltung eines adäquaten Lumendurchmessers unterstützen, Restenosen verhindern und die Bewahrung der endothelialen Gefäßfunktion gewährleisten.

Das myokardiale Remodeling post Infarkt ist ein komplexer Prozess, der zumeist mit der Ausbildung einer Narbe oder einem Aneurysma einhergeht. Die verminderte Kontraktilität des Infarktgebietes verändert die Form des linken Ventrikels, wodurch das Schlagvolumen reduziert wird.

Der Organismus ist in der Lage durch drei verschiedene Mechanismen die Kontraktilität des Herzens zu steigern:

### 1. *Frank Starling Mechanismus (Kraft-Längen-Beziehung)*

Durch die verminderte Auswurfleistung des Herzens kommt es zu einem erhöhten linksventrikulären endsystolischen Volumen. Dieser Rückstau bedingt wiederum einen Anstieg des enddiastolischen Volumen sowie des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP), der normalerweise zwischen 8 und 12 mmHg liegt. Innerhalb gewisser Grenzen ermöglicht der erhöhte LVEDP eine Optimierung der Vorspannung der Sarkomere und damit eine verbesserte Kontraktilität. Ab einem LVEDP > 30 mmHg kommt es hingegen zur Dekompensation und zum Lungenödem;

### 2. *Bowditch Effekt (Kraft-Frequenz-Beziehung)*

Am gesunden Herzen kommt es mit zunehmender Herzfrequenz zu einer zunehmenden Kontraktilität. Pathophysiologisch scheinen hier eine verkürzte Diastolendauer sowie eine intrazelluläre Calcium-Akkumulation zu Grunde zu liegen. Dieser Mechanismus ist bei Herzinsuffizienz abgeschwächt oder ganz außer Kraft gesetzt;

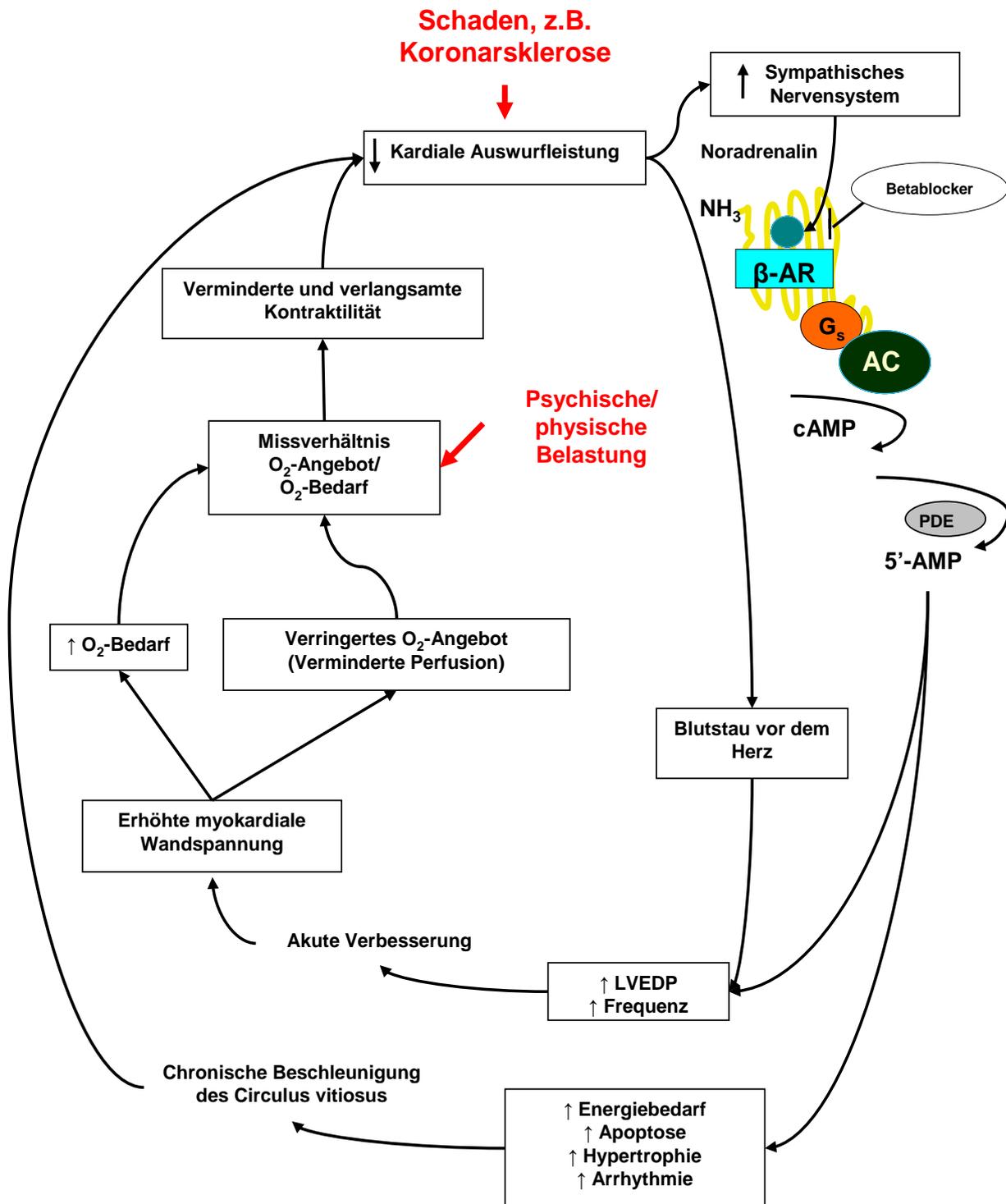
### 3. *Neurohumorale Mechanismen*

Hier spielt neben dem sympathischen Nervensystem mit der vermehrten Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin, auch die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, der Endothelinkaskade, des Natriuretischen Peptids und des Gewebekrosefaktors eine entscheidende Rolle. Die erhöhten Catecholaminspiegel führen zu einer Mobilisation der chrono- und inotropen Reserve des Herzens. Chronisch führt der damit verbundene Nachlastanstieg, wie auch der erhöhte Energieverbrauch sowie hypertrophe und apoptotische Prozesse der Kardiomyozyten zu einer progredienten Verschlechterung der kardialen Funktion (> Abb. 1) <sup>11</sup>. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass erhöhte Noradrenalin-, Renin- und Endothelin-Plasmaspiegel umgekehrt proportional mit der Prognose der Herzinsuffizienz korrelieren <sup>12; 13; 14</sup>. Die starke adrenerge Stimulation des

insuffizienten Herzens geht zudem im Verlauf mit einer Abnahme der Anzahl der  $\beta_1$ -Rezeptoren im Myokard von z.T. mehr als 50 % einher. Daneben kommt es zu einer Abnahme der funktionellen Kopplung zwischen Rezeptor und Adenylylcyclase sowie einer vermehrten Expression inhibitorischer G-Proteine. Zeitgleich erhöht ein Anstieg der  $\beta$ -Rezeptor-Kinase ( $\beta$ ARK) die homologe Desensibilisierung<sup>15</sup>.

In der Summe kommt es durch diese Kompensationsmechanismen zur Tachykardie, Steigerung der Kontraktilität des Herzens und Vergrößerung der Wandspannung. Dies wiederum führt erneut zu einem höheren Sauerstoffbedarf<sup>8</sup>. Es besteht also ein Circulus vitiosus bei steigendem intrazellulärem Energiebedarf und reduziertem Energieangebot (> Abb. 1)<sup>8</sup>.

### Circulus vitiosus der ischämischen Herzinsuffizienz



**Abb. 1** Cirulus vitiosus der ischämischen Herzinsuffizienz modifiziert nach Zwiener 1993<sup>8</sup> und El-Armouche 2009<sup>11</sup>. Eine Schädigung des Herzens, die zu einer Verringerung der Kontraktionskraft führt, geht mit der Aktivierung des Sympathikus und der vermehrten Freisetzung von Catecholaminen wie z.B. Noradrenalin einher. Noradrenalin stimuliert die Herzfrequenz und führt zu einem Druckanstieg im Herzen. Bleibt diese Überstimulation des Herzens über einen längeren Zeitraum bestehen, kommt es zu peripherer Vasokonstriktion,

die eine weitere Reduktion der Auswurfleistung zur Folge hat. Durch den erhöhten Energieverbrauch, Zelluntergang, Fibrose, Hypertrophie und Arrhythmien steigt die toxische Wirkung auf die Kardiomyozyten. Noradrenalin wirkt dabei auf die  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta$ -ARs), die durch die Aktivierung von G-Proteinen (Gs) auf die Adenylylcyclase (AC) und den second Messenger cAMP wirken. Unter der Herzinsuffizienz wird diese Signaltransduktionskaskade jedoch unterbrochen und desensitiviert, was zunächst einmal von Vorteil zu sein scheint <sup>11</sup>. Durch additiven Stress oder körperlicher Belastung eines Patienten mit ischämischer Herzkrankheit entsteht ferner ein Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und -angebot.

Intrazellulär kommt es durch den Sauerstoffmangel zu einer Erniedrigung des  $O_2$ -Partialdrucks in dessen Folge ein ATP-Mangel in den Myozyten bzw. Mitochondrien entsteht <sup>8</sup>. Dadurch ist der  $Na^+/K^+$ -Austausch durch die Zellmembran vermindert und der erhöhte Anteil an  $Na^+$ -Ionen wird alternativ über einen  $Ca^{2+}/Na^+$ -Austausch aus der Zelle befördert. Dies führt zu einem intrazellulären, myoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Anstieg, bei vermindertem  $Ca^{2+}$ -Efflux <sup>8; 16</sup>. Auch die während der Erschlaffungsphase unter Energieverbrauch stattfindende  $Ca^{2+}$ -Speicherung im sarkoplasmatischen Retikulum kann unter ATP-Mangel nur reduziert stattfinden. Demzufolge kann während der Kontraktion  $Ca^{2+}$  nur durch potential- und rezeptorgesteuerte (beta-adrenerge Rezeptoren) Calciumkanäle und nicht aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in die Myozyten gelangen. All dies führt zu einer verminderten und verlangsamten Kontraktion sowie einer unvollständigen und verlangsamten Relaxation <sup>8</sup>. Die Dehnbarkeit der Herzmuskelzellen ist nun reduziert und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) steigt an. Durch den myoplasmatischen  $Ca^{2+}$ -Anstieg werden die Mitochondrien mit  $Ca^{2+}$  überladen, was die ATP-Produktion weiter einschränkt. Im Gegenzug steigt der ATP-Bedarf jedoch an, um mittels  $Ca^{2+}$ -ATPase den zellulären  $Ca^{2+}$ -Ausstrom zu gewährleisten <sup>8</sup>. Daraus resultiert ein intrazelluläres Missverhältnis zwischen Energiebedarf und -angebot <sup>8</sup>.

## 2. Adrenerges System

Wie bereits geschildert versucht der Organismus durch Aktivierung neurohumoraler Systeme die Auswirkungen der linksventrikulären Dysfunktion abzumildern. Ein wichtiger Pfeiler ist hier das adrenerge System welches am Herz sowohl die Kontraktilität als auch die Herzfrequenz steigern kann.

Transmitter dieser Effekte sind die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin, welche im Nebennierenmark synthetisiert werden. Noradrenalin kann zusätzlich im Locus caeruleus gebildet werden<sup>17</sup>. Weiterhin wird Dopamin in der Substantia nigra gebildet<sup>18</sup> oder entsteht als Zwischenprodukt bei der Synthese von Noradrenalin und Adrenalin aus Tyrosin<sup>15</sup>. Der Name Catecholamine für die Hormone/körpereigenen Transmitter Adrenalin (Epinephrin), Noradrenalin (Norepinephrin) und Dopamin sowie die Arzneistoffe Isoprenalin, Dobutamin und Dopexamin leitet sich aus dem englischen „catechol“ ab und steht für die Derivate des ortho-Dihydroxybenzols<sup>17</sup>.

Die Synthese der Hormone findet in der Reihenfolge Tyrosin – Dopa – Dopamin – Noradrenalin – Adrenalin statt. Anschließend erfolgt die Speicherung der Hormone in Vesikeln. Durch Aktionspotentiale erfolgt die Freisetzung der Catecholamine und in der Folge ihr Transport zu den jeweiligen Effektororganen, wodurch sie ihre Wirkung an den neun bekannten G-Protein gekoppelten Adrenozeptoren ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$  und  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) entfalten können<sup>17; 15</sup>. Das Verteilungsverhältnis von  $\alpha$ - zu  $\beta$ -Adrenozeptoren unterscheidet sich je nach Gefäßgebiet und Organen. So sind z.B. die Arterien der Haut- und Schleimhaut überwiegend mit  $\alpha$ -Rezeptoren ausgestattet, während in den arteriellen Gefäßen der Skelettmuskulatur und in den Koronararterien  $\beta$ -Adrenozeptoren überwiegen. Am Herzen überwiegen die  $\beta_1$ -Rezeptoren, die die positiv inotropen und chronotropen Wirkungen der Sympathomimetika vermitteln<sup>15</sup>. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Adrenozeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren.

Durch Wiederaufnahme der Catecholamine in die Zellen bzw. Rücktransport in die freisetzenden Axone selbst, erfolgt anschließend die Elimination aus dem Extrazellulärraum. Die Catecholamine werden wieder in Vesikelform gespeichert oder aber durch Monoaminoxidase (MAO) oder Catechol-O-Methyltransferase (COMT) abgebaut<sup>17</sup>.

Die Catecholamine haben zunächst aktivierende Wirkung auf das Herz und sind direkt wirksame Sympathomimetika mit Wirkung auf  $\alpha$ - und  $\beta$ -Adrenozeptoren<sup>18</sup>. Sie wirken durch die Stimulation der kardialen  $\beta_1$ -Adrenozeptoren am Herzen direkt positiv ino- und chronotrop. Dabei spielt die Stimulation der übrigen kardiovaskulären Adrenozeptorensotypen für die Auswirkungen auf das Herzzeitvolumen (HZV) eine entscheidende Rolle<sup>15</sup>.

Aufgrund der raschen Desensibilisierung der Rezeptoren bei dauerhafter Aktivierung,

ist die positiv inotrope Wirkung der Catecholamine jedoch nur bei akuter Herzinsuffizienz (HI) therapeutisch nutzbar.

Bei chronischer Herzinsuffizienz (HI) lässt sich eine erhöhte Plasmakonzentration von Noradrenalin nachweisen, die eine massive und lang anhaltende Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren zu Folge hat. Dies führt zu einer Internalisierung des Rezeptorproteins und damit einer Verringerung der Anzahl, der in der Zellmembran vorhandenen  $\beta$ -Adrenozeptoren („receptor down regulation“). Aufgrund dieser Dichteabnahme der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren kommt es zu einer Abnahme der Catecholaminwirkung. Eine Verbesserung der chronischen HI unter Beta-Blocker-Therapie lässt sich daher möglicherweise auf eine normalisierte Ansprechbarkeit des Myokards auf Catecholamine zurückführen <sup>15</sup>.

Dopamin wirkt nicht selektiv für Adrenorezeptoren, sondern als eigenständiger Transmitter über Dopaminrezeptoren <sup>18</sup>. Im Kreislauf werden bei niedrigen Konzentrationen selektiv die  $D_1$ -Rezeptoren der glatten Muskulatur der renalen und mesenterialen Blutgefäße aktiviert. Sie stimulieren auf demselben Wege wie  $\beta$ -Adrenozeptoren über  $G_s$  (G-Protein-Familie s) die Adenylylcyclase und bewirken so eine renale und mesenteriale Vasodilatation mit einer kleinen Senkung des totalen peripheren Widerstandes <sup>17</sup>. In höherer Konzentration kann es neben seiner Wirkung auf die Dopaminrezeptoren im ZNS und peripheren Organismus zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens über die Stimulation von  $\beta_1$ -Rezeptoren führen. Nur in hohen Konzentrationen hat Dopamin Wirkung auf  $\alpha$ -, und dann weniger ausgeprägt auf  $\beta$ -Adrenorezeptoren <sup>18</sup>. Dopamin stimuliert die  $\beta_1$ -Adrenozeptoren am Herzen direkt positiv ino- und chronotrop, und aktiviert in hohen Dosen die vaskulären  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren, deren Stimulation über eine Verengung der Blutgefäße zu einer reflektorischen Frequenzsenkung führt <sup>15</sup>.

Auch Noradrenalin wirkt vornehmlich auf  $\alpha$ -Adrenozeptoren, während seine Wirkung auf  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -Adrenozeptoren deutlich schwächer ist, als die von Adrenalin <sup>17; 18</sup>. Noradrenalin wirkt positiv inotrop, führt jedoch nur zu einem kurzzeitigem Anstieg der Herzfrequenz, dem eine Bradykardie folgt, da es über die Pressorezeptorenstimulation zu einer reflektorischen Erhöhung des vagalen Tonus kommt, wodurch die durch Noradrenalin an den  $\beta_1$ -Rezeptoren bedingte Erregung im Sinusknoten überspielt wird <sup>18</sup>. Ferner kommt es durch die Stimulation von vaskulären  $\alpha$ -Adrenozeptoren zu einer Steigerung des arteriellen Widerstandes und

des Blutdrucks. Der erhöhte Widerstand schwächt die positiv inotrope Wirkung auf das Schlagvolumen ab und der erhöhte Blutdruck führt zu einer reflektorischen Frequenzsenkung, wodurch das HZV abnimmt <sup>15</sup>.

Wirkstoff	Rezeptortyp			
	$\beta_1$	$\beta_2$	A	Dopamin (D <sub>1</sub> )
Adrenalin	++	++	+	0
Noradrenalin	++	0	++	0
Isoprenalin	++	++	0	0
Dopamin <sup>1</sup>	++	+	++	++
Dobutamin	++	+	+	0

0 = keine Wirkung; + = relativ schwache Wirkung; ++ = starke Wirkung; <sup>1</sup> Zum Teil indirekt sympathomimetische Wirkung.

**Tabelle 1** Wirkprofil verschiedener Catecholamine an kardiovaskulären Adreno- und Dopaminrezeptoren. Abgewandelt nach Estler, 2007 <sup>15</sup>.

Da unter Adrenalin die  $\alpha$ -Adrenozeptor-vermittelte Vasokonstriktion durch die Stimulation der vaskulären  $\beta_2$ -Adrenozeptoren (Vasodilatation) bei kleinen und mittleren Dosen kompensiert wird, wird der mittlere arterielle Blutdruck kaum erhöht und die direkte positiv chronotrope Wirkung nicht reflektorisch abgeschwächt <sup>17; 15</sup>. Der periphere Widerstand sinkt und der Vagustonus ist im Gegensatz zum Noradrenalin nicht gesteigert <sup>17</sup>. Dadurch und durch seine Wirkung auf  $\beta_1$ -Rezeptoren erhöht Adrenalin die Kontraktionskraft des Herzens, die Herzfrequenz, das Herzminutenvolumen und damit den systolischen Blutdruck <sup>17; 18</sup>.

Transmitter, Mediator	Rezeptor	Signalweg „Second Messenger“ bzw. Ionenströme (I)	Wesentliche Vorkommen	Wesentliche biologische Antworten auf Zell- bzw. Organebene (Beispiele)
<b>Biogene Amine</b>				
Noradrenalin, Adrenalin	Adrenozeptoren			
	$\alpha_{1A}, \alpha_{1B}, \alpha_{1D}$	IP <sub>3</sub> /DAG	glatte Muskelzellen	Kontraktion
	$\alpha_{2A}, \alpha_{2B}, \alpha_{2C}$	cAMP↓	glatte Muskelzellen	Relaxation
	B <sub>1</sub>	cAMP↑	Herz	pos. inotrop, chronotrop
	B <sub>2</sub>	cAMP↑	glatte Muskelzellen/ Lunge	Relaxation
	B <sub>3</sub>	cAMP↑↓	Adipozyten	Lipolyse
Dopamin	Dopaminrezeptoren			
	D <sub>1</sub>	cAMP↑	ZNS, glatte Muskelzellen	Vasodilatation
	D <sub>2</sub>	cAMP↓	ZNS (z.B. Area postrema)	Extrapyramidal-motorische und psychische Erregung, Erbrechen
	D <sub>3</sub>	?	ZNS (z.B. limbisches System)	
	D <sub>4</sub>	?	ZNS (z.B. Medulla, frontaler Kortex)	
	D <sub>5</sub>	cAMP↑	ZNS (z.B. Hippocampus)	

**Tabelle 2** Übersicht über Oberflächenrezeptoren der körpereigenen Catecholamine mit ihren Second messengern, Vorkommen und biologischen Antworten. Nach Estler, 2007<sup>15</sup> bzw. TIPS Receptor Nomenclature. Trends Pharmacol. Sci. 1992; Suppl.

Nachteil der Catecholaminwirkung am Herzen ist, dass der Sauerstoffverbrauch des Herzens unter ihr mehr ansteigt, als es einer Zunahme der geleisteten Arbeit entspricht. Dies führt auf Dauer zu einem Missverhältnis zwischen myokardialen Sauerstoffverbrauch und -Versorgung<sup>18</sup>.

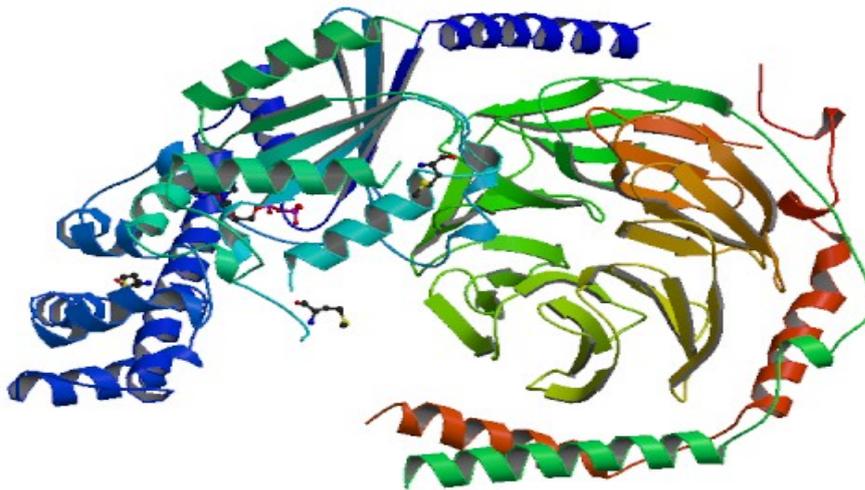
### **3. Guanin-nukleotid-bindendes-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren)**

Mit ca. 1000 Mitgliedern repräsentiert die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) die größte und vielfältigste Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren<sup>19; 20</sup>. Zu ihnen zählen z. B. Muskarinerg-cholinerge und  $\beta$ -Adrenerge-Rezeptoren, die aufgrund ihrer homöostatischen Regulationsfunktion des kardiovaskulären Systems besonders wichtig für das Herz sind<sup>21; 22; 23</sup>. Alle Mitglieder dieser Familie weisen sieben, in der Zellmembran ringförmig angeordnete Transmembranhelices (7-TMD-Struktur) auf<sup>17; 15; 24</sup> und bestehen grundsätzlich aus einer zum Extrazellularraum oder zur Lipidmembran gerichteten membranären Ligandenbindungsstelle, einem membranständigen Transduktorelement (G-Protein) und einem intrazellulären Effektor (Second Messenger-generierende Enzyme wie z.B. Adenylylcyclase,  $IP_3$ /DAG-generierende Phospholipase C)<sup>15</sup>.

Die GPCR sind an der Regulation einer Vielzahl von physiologischen Prozessen wie z.B. sensorische Empfindung oder Wahrnehmung von Schmerz, Licht, Geruch und Geschmack, Kognition, Muskelkontraktion, endo- und exokriner Sekretion, Stoffwechsel, Entzündung und Immunität, beteiligt<sup>25; 26</sup>. Dabei sind sie in der Lage eine große Anzahl chemischer Signale (First messenger) der Ligand-Rezeptorinteraktion hochselektiv zu erkennen und diese durch Second messenger an Effektoren in das Zellinnere weiterzuleiten<sup>17; 15; 20; 24</sup>. Diese Signaltransduktion ist essentiell, da die Rezeptoren in der Regel selber keine intrazelluläre Wirkung auslösen. Erst durch das in Gang setzen der intrazellulären z.T. vernetzten Signalkaskaden werden Vorgänge wie Sekretion, Kontraktion, Stoffwechsel oder Wachstum reguliert<sup>15</sup>.

Dies geschieht über die Aktivierung von G-Proteinen (> Abb. 2) (Guaninnucleotid-bindenden-Proteinen), die die Aktivität spezifischer Effektormoleküle wie der Adenylylcyclase (AC) und der Phospholipase C modulieren<sup>25</sup>. So führt die

Stimulation von Rezeptoren z.B. für  $\beta$ -Sympathomimetika oder Prostaglandine zu einer vermehrten Synthese von cAMP, während die Stimulation von Rezeptoren z.B. für  $\alpha_2$ -Sympathomimetika oder Opiate die cAMP-Bildung hemmen<sup>15</sup>. Die Adenylylcyclase wird also je nach G-Protein allosterisch gehemmt ( $G_i$ ) oder aktiviert ( $G_s$ ) (> Abb. 6)<sup>24</sup>. Eine dauerhafte Stimulation G-Protein-gekoppelter Rezeptoren führt zur Rezeptordesensitivierung (auch Desensitization genannt), einer adaptiven Antwort, die von Zellen genutzt wird, um die G-Protein-Transduktion zu hemmen und Schäden durch dauernde Rezeptorstimulation zu verhindern<sup>26</sup>.



**Abb. 2** 2.0 Å Kristallstruktur eines heterotrimeren G-Proteins, bestehend aus einer chimären  $\alpha_i/\alpha_i$  Untereinheit (blau) und der  $\beta\gamma$  Untereinheit (rot, grün).

**Quelle:** Public domain image from the RCSB PDB ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) of PDB ID: 1GOT (Lambright, D.G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N.P., Hamm, H.E., Sigler, P.B (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein, Nature 379:311).

Insgesamt sind einundzwanzig verschiedene  $\alpha$ -, fünf verschiedene  $\beta$ - und zwölf verschiedene  $\gamma$ -Untereinheiten bekannt. Der Verwandtschaftsgrad der  $\alpha$ -Untereinheiten ist dabei Maßgebend für die Einteilung der G-Protein-Familien. Man unterscheidet  $G_s$ -Proteine,  $G_i$ -Proteine,  $G_q$ -Proteine und  $G_{12/13}$ -Proteine mit jeweils mehreren Mitgliedern (siehe Tabelle 3)<sup>15; 24</sup>.

Auch in der Pharmakotherapie spielen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine wichtige Rolle. So wirkt ein Grossteil aller verschreibungspflichtigen Medikamente, die derzeit auf dem Markt sind auf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Dazu zählen z.B. Alpha- und Betablocker, Anticholinergika, Dopaminagonisten, AT<sub>1</sub>-Antagonisten, Neuroleptika, Antihistaminika, Opioide und Sympathomimetika.

G-Protein-Familie	$\alpha$ -Untereinheiten	Signaltransduktion	Vorkommen/Rezeptoren	Effekte (Beispiele)
<b>G<sub>i</sub>-Familie</b>				
G <sub>i/o</sub>	$\alpha_i, \alpha_o$	Hemmung der Adenylylcyclase, Hemmung der Bildung von cAMP  Öffnung von Kaliumkanälen, Hemmung von Calciumkanälen durch Aktivierung von G <sub><math>\beta\gamma</math></sub> -Untereinheiten	heptahelikale Hormon- und Neurotransmitter-rezeptoren, (z. B. muskarinerge Rezeptoren, Chemokin-rezeptoren, $\alpha_2$ -Adrenozeptoren)	Kontraktion glatter Muskulatur, Hemmung der Erregung, Wirkung auf multiple Kinasen und Funktionen, ubiquitäre Regulation
G <sub>t</sub>	$\alpha_t$ (Transducin)	Stimulation der Phosphodiesterase (PDE 6), Hydrolyse von cGMP, Schließung des CNG-Kanals	Rhodopsin	Wahrnehmung von Bildern/Sehen
G <sub>gust</sub>	$\alpha_{gust}$ (Gustducin)	Aktivierung der Phosphodiesterase 6, Abbau von cGMP	Geschmacks-rezeptoren	Geschmack
G <sub>z</sub>	$\alpha_z$	Hemmung der Adenylylcyclase	?	?
<b>G<sub>s</sub>-Familie</b>				
G <sub>s</sub>	$\alpha_s$	Stimulation der Adenylylcyclase, Bildung von cAMP, Aktivierung einer cAMP-abhängigen Kinase, Phosphorylierung von Serin oder Threonin	heptahelikale Hormon- und Neurotransmitter-rezeptoren (z. B. $\beta$ -Adrenozeptoren)	Konformitätsänderung, Aktivitätsänderung, Steigerung der Herzfrequenz, Relaxation glatter Muskulatur, Erregungsweiterleitung, ubiquitäre Regulation
G <sub>olf</sub>	$\alpha_{olf}$	Stimulation der Adenylylcyclase des Riechepithels, Bildung von cAMP, Öffnung des CNG-Kanals	Olfaktorische Rezeptoren	Geruchswahrnehmung/Riechen

Fortsetzung von **Tabelle 3**

G-Protein-Familie	$\alpha$ -Untereinheiten	Signaltransduktion	Vorkommen/Rezeptoren	Effekte (Beispiele)
<b>G<sub>q</sub>-Familie</b>				
G <sub>q</sub>	$\alpha_q, \alpha_{11}$ $\alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$	Aktivierung der Phospholipase C, Bildung von IP <sub>3</sub> und DG	heptahelikale Hormon- und Neurotransmitterrezeptoren (z. B. $\alpha_1$ -Adrenozeptoren, H <sub>1</sub> -Rezeptoren, AT <sub>1</sub> -Rezeptoren, metabotroper Glutamatrezeptor der Gruppe I)	Kontraktion glatter Muskulatur, Erregungsweiterleitung, ubiquitäre Regulation
<b>G<sub>12/13</sub>-Familie</b>				
G <sub>12/13</sub>	$\alpha_{12}, \alpha_{13}$	Aktivierung von Rho-Proteinen und Rho-Kinasen	heptahelikale Hormon- und Neurotransmitterrezeptoren	Erhöhte Kontraktilität des Zytoskeletts und des glatten Gefäßmuskels (z. B. Thromboxan-A <sub>2</sub> -Rezeptoren)

**Tabelle 3** Überblick über weitere G-Protein-Familien-abhängige Wege der Signaltransduktion nach Aktories, 2009<sup>17</sup>.

Da es in vorliegender Arbeit um ein Modell der chronischen Herzinsuffizienz geht und damit um die Wirkung im Krankheitsverlauf auftretender, erhöhter Catecholaminspiegel auf  $\beta$ -Adrenozeptoren am Herzen, soll hier stellvertretend das Modell der G<sub>s</sub>PCR-Signaltransduktion anhand der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren erläutert werden. Andere, von den jeweiligen G-Protein-Familien abhängige Wege der Signaltransduktion sind in Tabelle 3 kurz zusammengefasst.

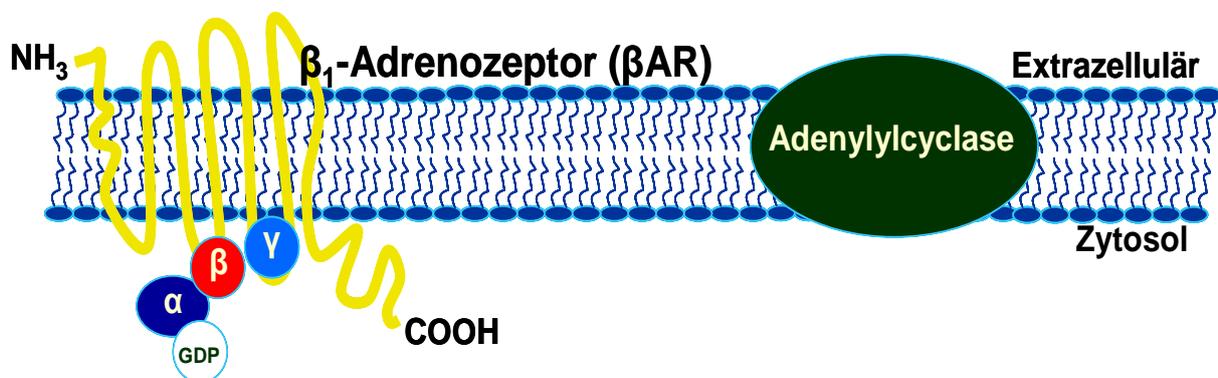
Der menschliche  $\beta_1$ -Rezeptor besteht aus 477 Aminosäuren. Diese Peptidkette durchquert die Zellmembran siebenmal, wodurch die Transmembran-Helices 1-7 gebildet werden. Der Aminoterminus liegt im Extra- und der Carboxyl-Terminus im Intrazellularräum<sup>17</sup>. Bei  $\beta_1$ -Adrenozeptoren wird die Bindungsstelle für Noradrenalin aus Aminosäuren der Transmembranhelices 3 und 5 gebildet, welche zusammen mit den anderen Helices die Tasche zur Aufnahme des Transmitters bilden<sup>24</sup>. Für die Bindung des Noradrenalins sind dabei ein Aspartat in Transmembranhelix 3, zwei

Serine in Transmembranhelix 5 und ein Phenylalanin in Transmembranhelix 6 entscheidend. Diese Aminosäuren sind bei allen Rezeptoren für Catecholamine fix<sup>17</sup>. Aufgrund der Ligandenbindung, kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Die Bindungsstelle für das heterotrimere G-Protein  $G_s$  am Rezeptor wird durch die vom aminoterminalen Ende aus gesehen zweite und dritte intrazelluläre Schleife und einem Teil des carboxylterminalen Endes gebildet (> Abb. 3). Durch die Konformationsänderung des aktivierten Rezeptors erfolgt ein Austausch des an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP gegen GTP, was eine Destabilisierung des  $G_s$ -Protein-Komplexes zur Folge hat (> Abb. 4). Das  $G_s$ -Protein dissoziiert nun in die hydrophilere, nicht membrangebundene  $\alpha_{GTP}$ -Untereinheit und in die durch posttranslationale Modifikation isoprenylierte, membranständige  $\beta\gamma$ -Untereinheit<sup>24</sup>. Beide Untereinheiten sind nach ihrer Aktivierung in der Lage, jeweils unabhängig voneinander verschiedene membranständige Effektoren zu aktivieren oder zu deaktivieren<sup>17</sup>. Im Beispiel der  $\beta$ -Adrenozeptoren erfolgt nach Dissoziation der  $\alpha_{GTP}$ -Untereinheit, die Bindung dieser an die Adenylylcyclase<sup>24</sup>. Die Adenylylcyclase dient als Effektor für zyklisches Adenosin monophosphat (cAMP)-abhängige Signalwege. Die Signaltransduktionskaskade setzt sich über die Aktivierung der Proteinkinase vom Typ A (PKA) durch cAMP fort. Die PKA phosphoryliert spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle in den Kardiomyozyten, was zu einer Erhöhung der Offenheitswahrscheinlichkeit der Kanäle führt<sup>15</sup>. Während eines Aktionspotentials hat dies einen verstärkten  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zellen zur Folge, der der direkten Aktivierung des kontraktile Apparates dient. Der erhöhte  $Ca^{2+}$ -Einstrom zieht zudem eine Ryanodin-Rezeptor vermittelte  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum nach sich. Die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration von  $10^{-7}$  auf  $10^{-5}$  mol/l bewirkt über die Bindung von  $Ca^{2+}$  an das regulatorische Protein Troponin C eine Umsetzung von chemischer Energie in Form von ATP aus den Mitochondrien in mechanische Verkürzung und Spannungsentwicklung der Muskelfaser und somit die Kontraktion einer Herzmuskelzelle (positiv inotrope Wirkung) (> Abb. 5)<sup>17; 15</sup>.

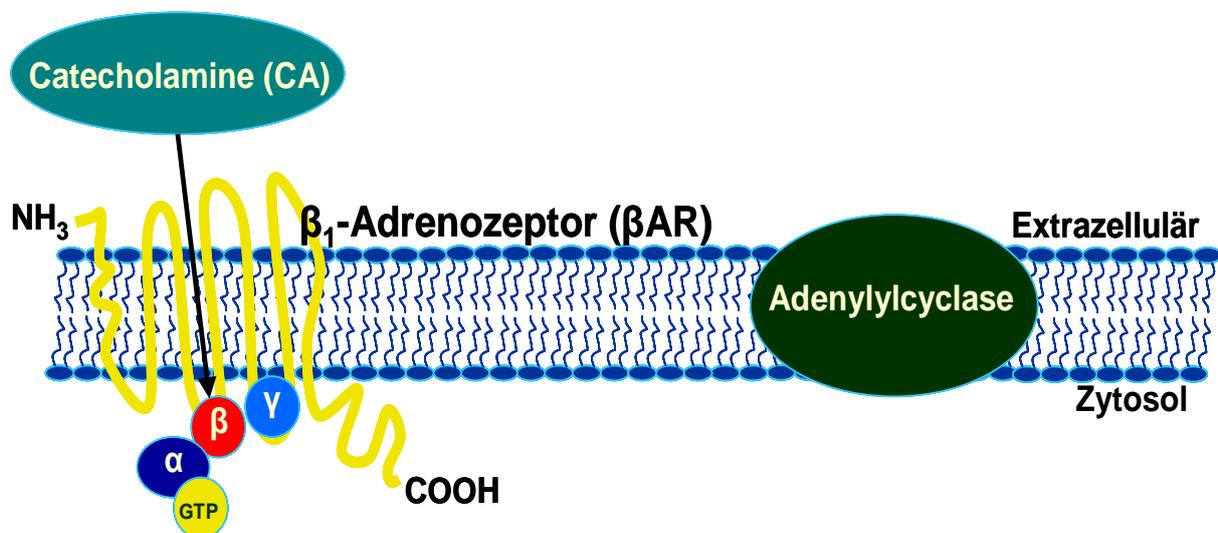
Aufgrund der intrinsischen GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit und durch Mithilfe von GTPase aktivierendem Protein geht das  $\alpha_{GTP}$  durch Phosphatabspaltung in GDP über und inaktiviert sich dadurch selbst. Nach Abdissoziation von der Adenylylcyclase und anschließender Reassoziaton mit einer passenden  $\beta\gamma$ -Untereinheit steht das G-Protein für eine weitere Signaltransduktion zur Verfügung.

Aufgrund der relativ langen Aktivität der  $\alpha_{\text{GTP}}$ -Untereinheit, kommt es in einem solchen Zyklus zu der Synthese mehrerer second-messenger Moleküle, die wiederum eine „chemische Verstärkung“ des auf die Zelle einwirkenden Signals zur Folge haben <sup>24</sup>. Die Membran-assoziierte  $\beta\gamma$ -Untereinheit hingegen ist in der Lage an  $\text{K}^+$ -Kanäle zu binden und diese zu öffnen. Ferner ist sie für die Bindung und Aktivierung die  $\beta$ -adrenozeptor-Kinase ( $\beta\text{ARK}$ ) verantwortlich, die Rezeptoren durch Phosphorylierung an den Serinresten des carboxyl-terminierten Rezeptorendes deaktiviert <sup>24</sup>.

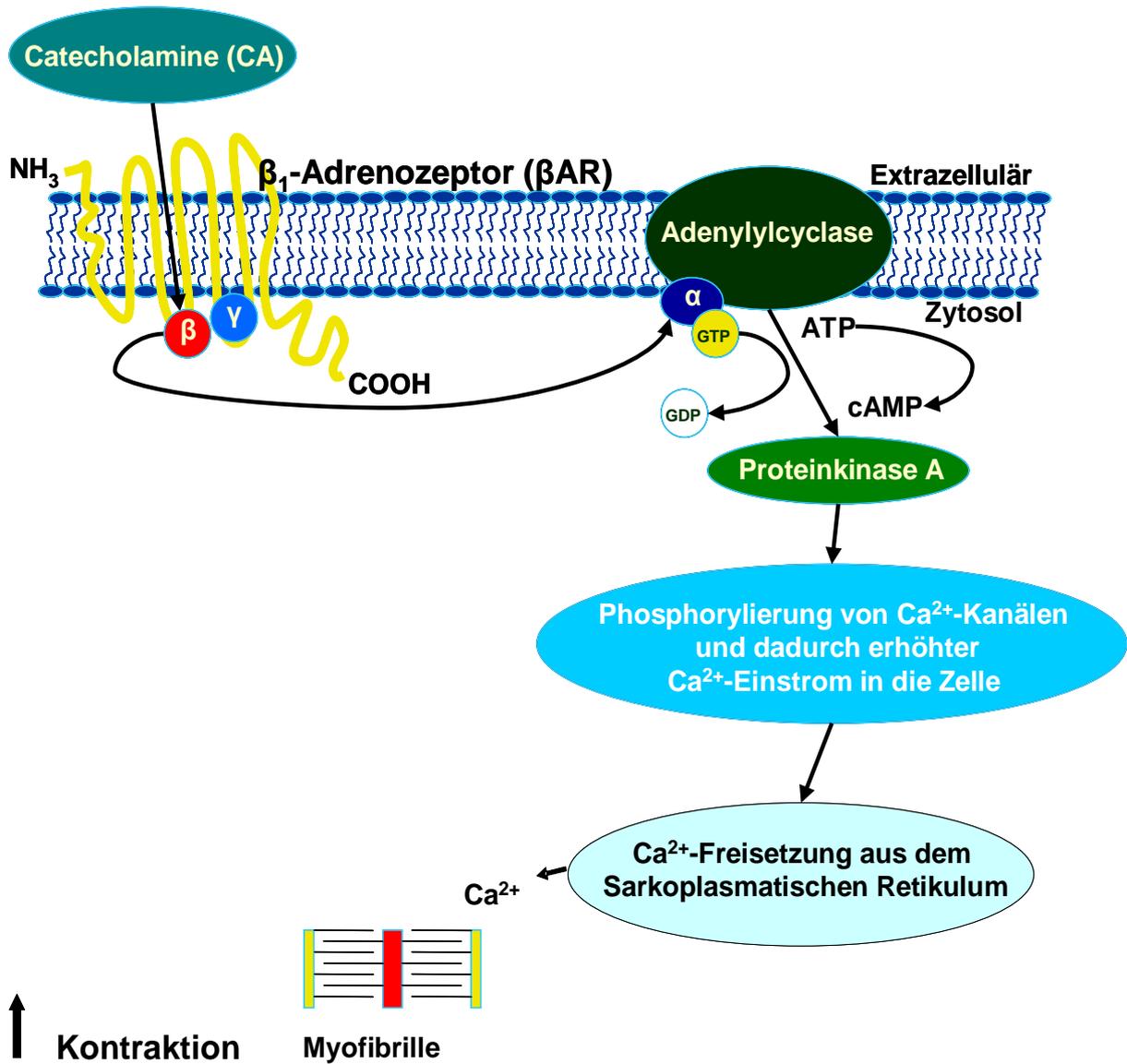
Die folgenden 3 Abbildungen geben einen Überblick über die Normofunktion eines  $\beta_1$ -Adrenozeptors unter Catecholamineinwirkung:



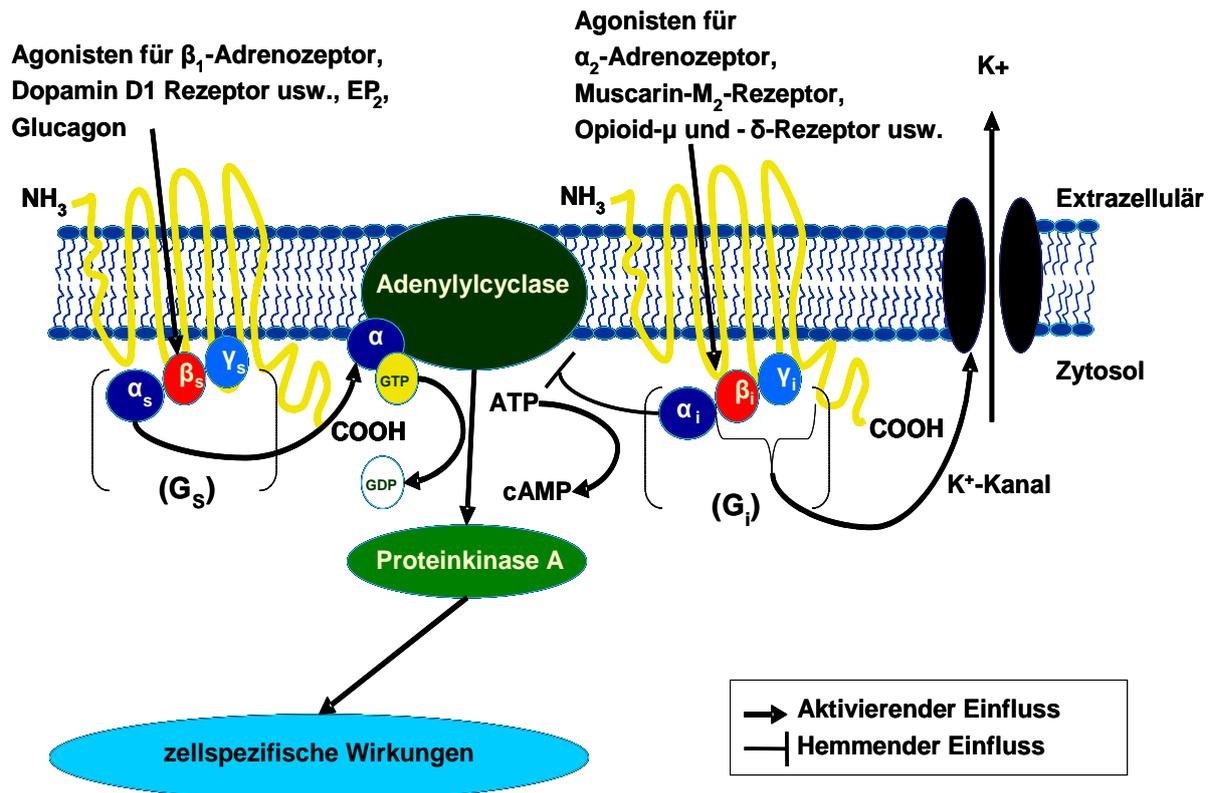
**Abb. 3**  $\beta_1$ -Adrenozeptor mit inaktivem, membrangebundenem heterotrimerem  $\text{G}_s$ -Protein. Modifiziert nach Estler, 2007 <sup>15</sup> und Pleger, 2007 <sup>27</sup>.



**Abb. 4** Agonist-/Ligandengebundener  $\beta_1$ -Adrenozeptor mit aktiviertem heterotrimerem  $\text{G}_s$ -Protein. Modifiziert nach Estler, 2007 <sup>15</sup> und Pleger, 2007 <sup>27</sup>.



**Abb. 5** Abdissoziation der aktivierten  $\alpha$ -Untereinheit, Bindung an die Adenylylcyclase mit anschließender Aktivierung und Fortsetzung der Signaltransduktion bis hin zur Kontraktion. Modifiziert nach Pleger, 2007 <sup>27</sup>.



**Abb. 6** Rezeptorabhängige Aktivierung bzw. Hemmung des Effektors Adenylylcyclase durch G<sub>s</sub> bzw. G<sub>i</sub>-Proteine und damit einhergehende Erhöhung (G<sub>s</sub>) oder Erniedrigung (G<sub>i</sub>) von cAMP. Modifiziert nach Estler, 2007<sup>15</sup>.

#### 4. Mechanismen der Desensitivierung von heptahelikalen Rezeptoren

Die längere Aktivierung heptahelikaler Rezeptoren führt zu einer Abnahme der Rezeptorempfindlichkeit und damit zu einer verminderten Rezeptorantwort; es kommt zu einer Desensitivierung. Generell unterscheidet man zwischen einer homologen Desensitivierung, bei der der aktivierte Rezeptor selektiv herunterreguliert wird, von einer heterologen Desensitivierung, bei der das aktivierte, an den Rezeptor gekoppelte G-Protein die Inhibition eines anderen Rezeptors induziert. Hierfür sind zahlreiche Mechanismen auf unterschiedlichen Ebenen wie z.B. Transkription, Translation oder Rezeptorproteinabbau verantwortlich. Durch beschleunigten oder verlangsamten Rezeptorabbau oder aber durch gesteigerte oder verminderte Rezeptorsynthese, wird die Anzahl der Rezeptoren herauf- oder herunterreguliert (Up- oder Down-Regulation) und damit die Stärke der Rezeptorantwort beeinflusst<sup>24</sup>;<sup>17</sup>. Häufiger Rezeptoraktivierung folgt meistens Down-Regulation, längerer Nicht-

Aktivierung Up-Regulation <sup>24</sup>. Diese Anpassungsvorgänge benötigen Stunden bis Tage <sup>17</sup>.

Ferner gibt es 3 weitere Regulationsmechanismen, die innerhalb von Sekunden bis Minuten zu einer Rezeptordesensitivierung führen können <sup>17</sup>.

#### 1. Rezeptorphosphorylierung durch die jeweilige Effektor kinase

Im Falle des  $\beta_2$ -Adrenozeptors, der hier als Beispiel aufgeführt werden soll, und seiner zugehörigen Effektor kinase cAMP-Kinase (PKA) kommt es nach Aktivierung der Kinase zu einer Phosphorylierung des Rezeptors an einem Serin in der dritten zytoplasmatischen Schleife und im C-Terminus. Durch diese Phosphorylierung erfährt der Rezeptor eine Konformitätsänderung, wodurch seine Interaktion mit dem  $G_s$ -Protein vermindert und mit dem inhibitorischen  $G_i$ -Protein erhöht wird. Die Bindung von  $G_i$  führt zu einer Hemmung der katalytischen Aktivität der Adenylylcyclase (> Abb. 7). Ebenso können  $G_q$ -gekoppelte Rezeptoren von ihrer Effektor kinase, hier der Proteinkinase C (PKC), inaktiviert werden. Beide Vorgänge entsprechen jeweils einer homologen Desensitivierung. Ferner können die aktivierten Effektor kinasen weitere PKC oder PKA gekoppelte Rezeptoren im Sinne einer heterologen Desensitivierung phosphorylieren und inaktivieren <sup>17</sup>.

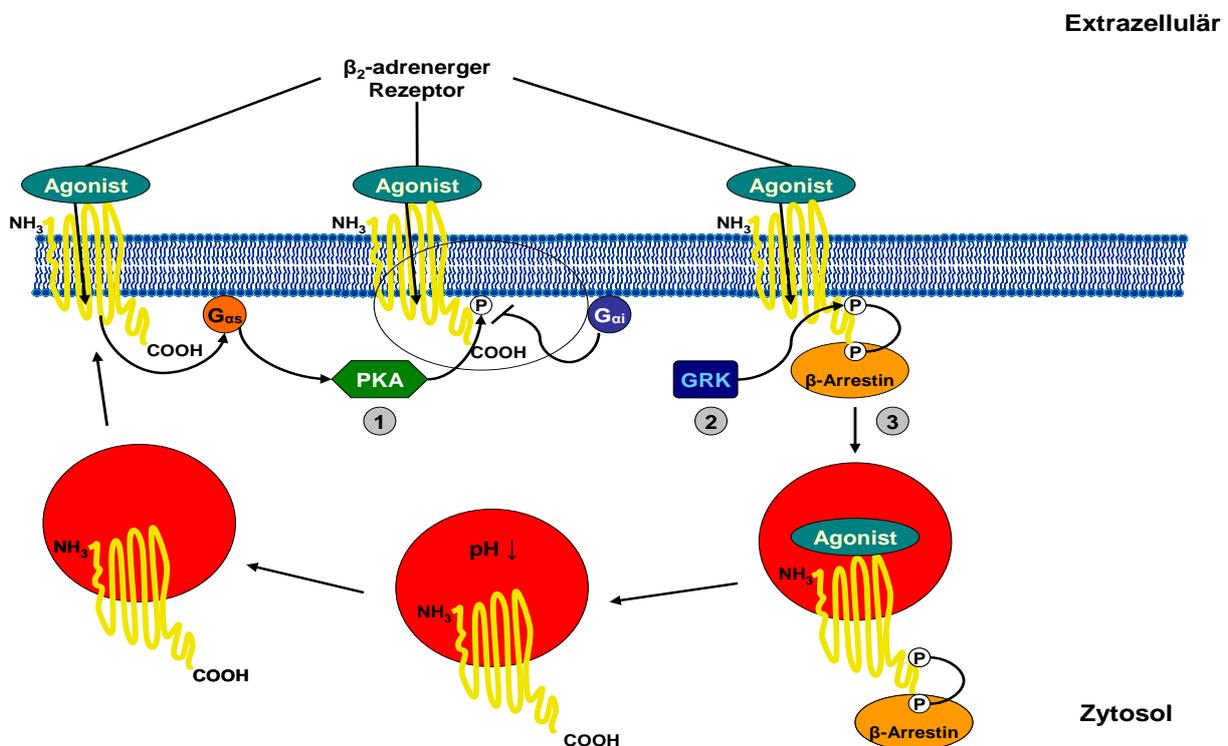
#### 2. Phosphorylierung durch eine spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptor kinase (GRK)

Dieser Mechanismus führt zu einer schnellen, agonist- und rezeptorspezifischen, d.h. homologen Desensitivierung von aktivierten heptahelikalen Rezeptoren und benötigt zwei Schritte:

An die aktive Rezeptorkonformation ( $R^*$ ) des Rezeptors bindet eine rezeptorspezifische G-Protein-gekoppelte-Rezeptor kinase (GRK) und phosphoryliert den Rezeptor (> Abb. 7). Im Falle des  $\beta_2$ -Adrenozeptors die  $\beta$ -Adrenozeptor-Kinase ( $\beta$ ARK) <sup>17; 28</sup>. Dabei erfolgt die Aktivierung der GRK durch eine Interaktion des Enzyms mit  $G_{\beta\gamma}$  und  $PIP_2$ . Durch die Phosphorylierung des  $\beta_2$ -Adrenozeptors wird seine Affinität für das zytoplasmatische Protein  $\beta$ -Arrestin 10-30-fach erhöht <sup>17</sup>, dessen Anlagerung wiederum die Bindung und Aktivierung von  $G_{\alpha_s}$  sterisch verhindert.

### 3. Intrazelluläre Sequestrierung des Rezeptors

Dabei wird der Rezeptor der Wirkung des Agonisten durch Verlagerung in das Zellinnere entzogen<sup>17</sup>. Im Falle des  $\beta_2$ -Adrenozeptors erfolgt die Sequestrierung nach Phosphorylierung des agonistgebundenen Rezeptors durch GRK und anschließender Bindung von  $\beta$ -Arrestin in Abhängigkeit des Co-Expressionsgrades von GRK und  $\beta$ -Arrestin<sup>29</sup>. Ferner spielt die MDM2 (murine double minute oncogene)-medierte Ubiquitinierung von  $\beta$ -Arrestin eine entscheidende Rolle, ohne die eine Bindung von  $\beta$ -Arrestin an Clathrin, ein membranständiges Protein, dass die Rezeptorendozytose fördert, nicht möglich wäre<sup>17; 30</sup>. Nach Endozytose des Rezeptorkomplexes, wird dieser im sauren Milieu des Vesikels dephosphoryliert, wodurch  $\beta$ -Arrestin und der Ligand vom Rezeptor abdissoziieren. Danach kann eine Rückkehr des Rezeptors zur Membran (> Abb. 7)<sup>17</sup> oder dessen Abbau erfolgen<sup>31; 32</sup>. Nach der intramembranären Reintegration des Rezeptors besitzt dieser wieder seine ursprüngliche Affinität für Agonist und G-Protein und kann somit wieder eine Zellantwort auslösen<sup>17</sup>.



**Abb. 7** Modell der Desensibilisierung eines heptahelikalen Rezeptors am Beispiel des  $\beta_2$ -Adrenozeptors. 1. Phosphorylierung durch die Effektor kinase PKA (Adenylylkinase = Kreis am mittleren  $\beta_2$ -Rezeptor). 2. Phosphorylierung durch eine spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase (GRK). 3. Intrazelluläre Sequestrierung. Nach Aktories, 2009<sup>17</sup>.

## 5. G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und $\beta$ -Arrestine

### 5.1. Allgemeines

Die sieben bisher bekannten Säugetier-G-Protein-gekoppelten Serin-/Threonin-Rezeptorkinasen können auf der Basis ihres allgemeinen Strukturaufbaus und ihrer Homologie in 3 Unterfamilien unterteilt werden:

1. GRK1 (Rhodopsin Kinase);
2. GRK2 ( $\beta$ ARK1) und GRK3 ( $\beta$ ARK2);
3. GRK4, GRK 5, GRK 6 und GRK 7 <sup>25-26</sup>.

Von 4 Kinasen dieser Familie (GRK2, 3, 5 und 6) wird angenommen, dass sie eine wichtige Rolle in der GPCR-Phosphorylierung am Herzen spielen <sup>23</sup>. Die GRKs der Gruppe 1 und 3 sind aufgrund der kovalenten Fettsäure- oder Isopren-Bindungen ihrer Carboxyltermini membranständig, in der Nähe der aktivierten Rezeptoren an die sie binden und die sie phosphorylieren, lokalisiert. Anders verhält es sich mit den GRKs 2 und 3 der Gruppe 2, die aufgrund ihrer nicht permanent ausgebildeten Lipid- oder Isopren-Modifikation nicht ständig mit der Membran verbunden sind. Vielmehr sind die zellulären Komplemente dieser Kinasen im Zytosol beheimatet und unterliegen nur einer vorübergehenden Rekrutierung zur Plasmamembran nach G-Protein-Aktivierung <sup>26</sup>. So liegt GRK2 in phosphoryliertem Grundzustand und damit in einer inaktiven Konformation im Zytosol vor <sup>26</sup>. Die durch eine Phosphatase dephosphorylierte und damit aktivierte GRK2 wird nach GPCR-Aktivierung zur Membran rekrutiert und bindet nach Kopplung an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten ERK1/2, wodurch es zu einer Phosphorylierung am Ser670 der GRK2 kommt. Dies deaktiviert die GRK2 und führt zu ihrer Lösung von der Plasmamembran und ermöglicht ihre Rückkehr ins Zytosol <sup>26</sup>.

Dabei binden GRK2 und 3 im Falle ihrer Rekrutierung spezifisch über die sog. carboxyl-terminierte pleckstrine homologie Domäne an die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins <sup>25; 26</sup>. Diese Interaktion setzt eine zeitliche Regulation der Kinasen voraus, da sich die Freisetzung der spezifischen  $\beta\gamma$ -Untereinheiten sonst mit der

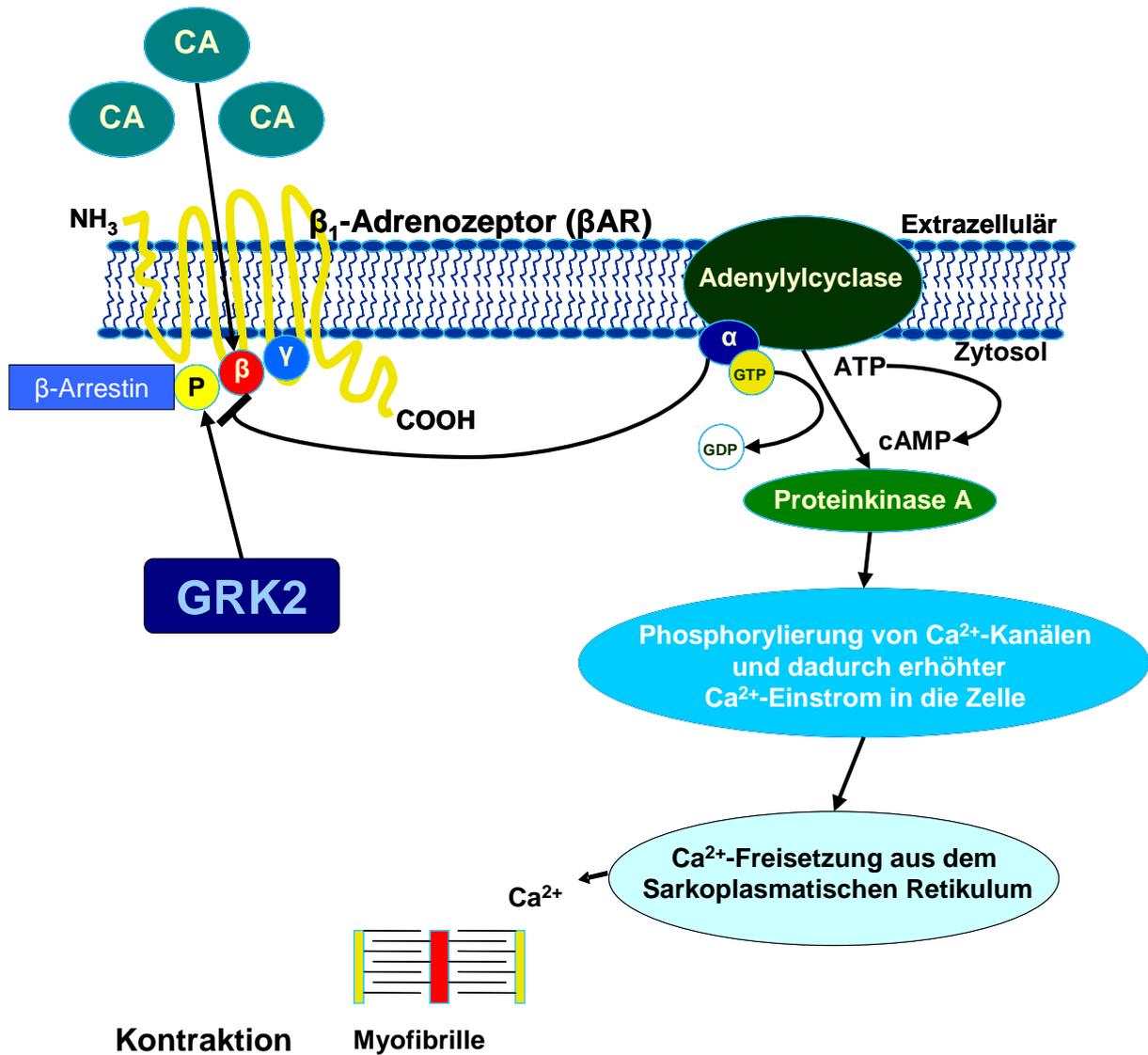
Rezeptoraktivierung überschneiden würde <sup>25</sup>. Auch wird angenommen, dass es in der Natur der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten liegt GRK2 (> Abb. 8) oder GRK3 an den Rezeptor zu rekrutieren <sup>25</sup>.

Neben ihrer Fähigkeit G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu phosphorylieren und deren Desensitivierung zu mediieren (> Abb. 9 und 10), sind GRKs auch in der Lage das Ausmaß der  $G_q$ -gekoppelten Signaltransduktion durch die Sequestration von  $G_{\alpha q}$  und die Verhinderung seiner Bindung an Downstream-Effektoren zu limitieren <sup>26</sup>.

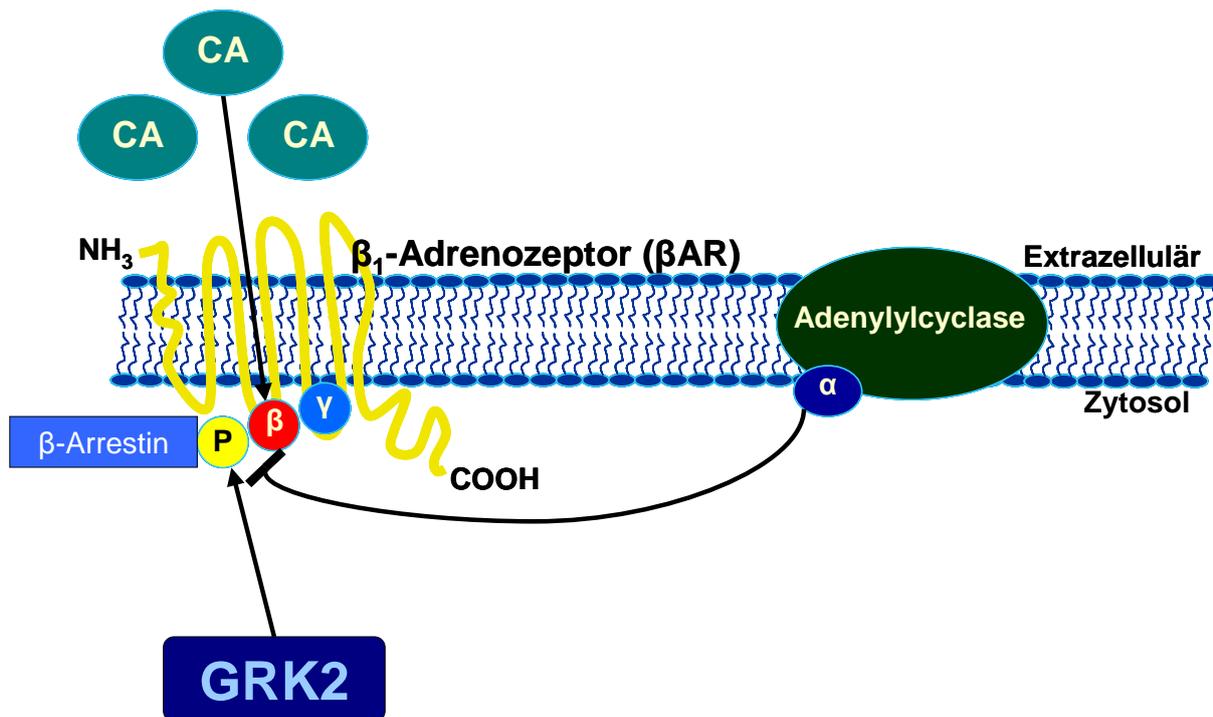


**Abb. 8** Komplex zwischen GRK2 und der  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit.

**Quelle:** Public domain image from the RCSB PDB ([www.pdb.org](http://www.pdb.org)) of PDB ID: 1OMW (Lodowski, D.T., Pitcher, J.A., Capel, W.D., Lefkowitz, R.J., Tesmer, J.J.G. (2003), Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma, *Science* **300**: 1256-1262).



**Abb. 9** Phosphorylierung des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors durch GRK2 und anschließende Bindung von  $\beta$ -Arrestin. Modifiziert nach Pleger, 2007<sup>27</sup>.



**Abb. 10** Inhibition der  $\beta$ -adrenergen-Signaltransduktionskaskade durch die Phosphorylierung des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors an der  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit durch GRK2 und Bindung von  $\beta$ -Arrestin. Modifiziert nach Pleger, 2007 <sup>27</sup>.

Es wird angenommen, dass die spezifische Bindung von Arrestin an die GRK-phosphorylierten G-Protein-Rezeptoren zu einer direkten Unterbrechung der Rezeptor-G-Protein Interaktion führt, wodurch die Reaktionsempfindlichkeit auf Catecholamine sinkt <sup>22; 25</sup>. Zudem geht man davon aus, dass Arrestine als Adapterproteine fungieren, die G-Proteinrezeptoren als spezielles Ziel für die Clathrin-medierte Endozytose bereitstellen. G-Protein/Arrestinkomplexe können durch Interaktion zwischen Arrestin und Clathrin in aktiv formierenden „coated pits“ akkumulieren. Dies resultiert in einer Rezeptorendozytose, die vermutlich in einer rezeptor-, zell- und zeitabhängigen Art und Weise darauffolgend entweder zu einer Aktivierung des MAPK Signalwegs, zu einer Resensitivierung oder aber Herunterregulation führen kann (> Abb. 7) <sup>25</sup>.

## 5.2. Die Rolle von GRK2 bei Herz-Gefäß-Erkrankungen

Die ubiquitär exprimierte G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase2 (GRK2) ist zudem die am höchsten exprimierte GRK im Herzen <sup>26; 33</sup>. GRK2 ist ein zytosolisches Protein, das nach GPCR-Stimulation zur Plasmamembran transferiert wird, wo es an die dissoziierte und Membrangebundene  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine bindet und dadurch den Agonist-besetzten Rezeptor phosphoryliert. Dabei können  $\beta$ -

AR durch die GRKs 2-6 phosphoryliert und desensitiviert werden <sup>26</sup>. GRK2 ist außerdem in der Lage den Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1A zu desensitivieren.

Die in vivo Effekte von GRK2 auf  $\beta$ -ARs konnten an transgenen Mäusen verifiziert werden. So wiesen Mäuse mit einer Herz-spezifischen GRK2 Überexpression eine verminderte Isoprenalin stimulierte Kontraktilität auf. Ein Effekt der durch spezifische Inhibition der GRK2 neutralisiert werden konnte <sup>34</sup>. Dies scheint von potentiell klinischer Relevanz, da GRK2 bei der HI des Menschen deutlich hochreguliert ist <sup>35</sup>.

Ferner konnten verschiedene Studien erhöhte Expressionen weiterer GRKs in Verbindung mit der kongestiven Herzinsuffizienz, Hypertonie und myokardialer Ischämie aufzeigen <sup>25; 36; 37; 38; 39</sup>. Bisher ist nicht geklärt, ob die erhöhten GRK-Spiegel die Erkrankungen jeweils kausal mitverursachen oder lediglich ein sekundäres Phänomen bedingt durch einen aus der Krankheit resultierenden erhöhten Hormonspiegel darstellen. Auch bei einer akuten myokardialen Ischämie, die mit einer massiven Freisetzung von Noradrenalin einhergeht, sind erhöhte GRK2-mRNA-Spiegel nachgewiesen worden <sup>25</sup>. Des Weiteren führt eine chronische Gabe von  $\beta$ AR-Agonisten bei Mäusen zu einer konsekutiven Erhöhung der GRK2 Expression <sup>25</sup>. Umgekehrt führt eine Behandlung mit  $\beta$ AR-Antagonisten zu einer Verringerung der GRK2 Expression in Mäusen <sup>25</sup>. Auch die pharmakologische Behandlung von Schweinen mit dem Betablocker Bisoprolol führte zu einer Reduktion der GRK2-Spiegel <sup>36</sup> und somit zu einer Inhibition der  $\beta$ -Arrestin-Bindung und Rezeptorinternalisation <sup>22</sup>. Dies unterstützt die Vorstellung dass hormonelle Signale direkt die GRK2-Expression und Aktivität regulieren und das eine erhöhte GRK2-Aktivität zu einer Verschlechterung des Krankheitszustands beisteuert. Die funktionalen Konsequenzen der GRK2-Überexpression sind bisher am besten für die kongestive Herzinsuffizienz untersucht. So zeigen kongestive Herzinsuffizienz-Patienten eine um bis zu 70 % verminderte Antwort auf Catecholaminstimulation. Während dies zum Teil zu einem circa doppelt so hohen Abfall der  $\beta_1$ AR-Proteinspiegel führt, zeigt dies auch die Desensitivierung der  $\beta_1$ AR- Funktion <sup>25</sup>.

Die Bindungsfähigkeit von GRK2 an die  $G_{\gamma\beta}$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine wurde experimentell genutzt um die GRK2 geförderte  $\beta$ -AR-Desensitivierung zu inhibieren. Dazu wurde ein carboxyl-terminiertes Peptid ( $\beta$ ARKct), das die gleiche Bindungsregion wie GRK2 besitzt, eingesetzt <sup>35</sup>. Erste Inhibitionsversuche der GRK2 wurden im Mäusemodell und später im Ratten- und Kaninchenmodell etabliert <sup>40</sup>.

Durch die Inhibition der GRK2, die für das „Ausschalten“ des  $\beta$ -adrenergen-Rezeptors zuständig ist, wird dieser nicht wie unter Agonistwirkung (z. B. Dobutamin) stimuliert, sondern zu einer normalen Signaltransduktion zurückgeführt<sup>40</sup> (> Abb. 13). Dadurch kann die Entwicklung der Herzinsuffizienz unterdrückt werden<sup>40</sup>.

Letztendlich reguliert die GRK2, und wird die GRK2 durch viele verschiedene membrangebundene und intrazelluläre Moleküle reguliert. Dazu zählen der Epidermal-Growth-Factor-Receptor (EGFR), der Platelet-derived growth factor-Receptor  $\beta$  (PDGFR  $\beta$ ), das GRK-interacting Protein 1, Synuclein, Phosducin, das ribosomale Protein P2, die inhibitorische  $\gamma$ -Untereinheit der Typ 6 retinalen cGMP-phosphodiesterase, der neuronale Kalziumsensor-1, die  $\beta$ -Untereinheit der epithelilen Natriumkanäle wie auch verschiedenen Proteine des Zytoskeletts (Tubulin,  $\alpha$ -Actinin und Ezrin)<sup>41</sup>.

### 5.3. $\beta$ -Arrestine

$\beta$ -Arrestine bilden eine kleine Genfamilie, die aus 4 Mitgliedern besteht, die allesamt mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nach deren Aktivierung und Phosphorylierung durch GRKs interagieren. Arrestin1 und Arrestin4 treten nur in den retinalen Stäbchen und Zapfen auf, wo sie entsprechend Rhodopsin und Sehpigmente (Opsine) steuern. Im Gegensatz dazu werden Arrestin2 und -3 in nahezu allen Geweben exprimiert, wo sie an der Regulation der 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelten Rezeptoren) beteiligt sind<sup>30</sup>.

Ihre Hauptfunktion liegt in der Desensitivierung der 7-TM-Rezeptoren durch sterische Blockade der Interaktion dieser mit dem G-Protein. Dabei werden  $\beta$ -Arrestine in der Regel zum GRK-phosphoryliertem Rezeptor rekrutiert<sup>30</sup>. Dabei entkoppeln sie nicht nur den Rezeptor von seinem G-Protein, sondern wirken auch als Gerüst um Clathrin und den Clathrin-Adapter AP2 zu rekrutieren, die den Rezeptor zum Ziel der Endozytose machen<sup>22</sup>. So mediierten sie die Clathrin-coated-pit-Internalisation vieler Rezeptoren über ihre Interaktionen mit verschiedenen Komponenten des endozytären Systems, ein Prozess der durch Ubiquitinierung und Deubiquitinierung von  $\beta$ -Arrestinen reguliert wird<sup>30</sup>. Einmal internalisiert, können Rezeptoren dephosphoryliert, resensitiviert, recycled und zur Zelloberfläche zurücktransportiert<sup>30</sup> oder aber abgebaut werden (> Abb. 7)<sup>31; 32</sup>. Auch können sie zwecks Abbaus zum

Ziel von Lysosomen gemacht werden, oder in weitere intrazelluläre Signalwege einrücken<sup>30</sup>. Zudem fungieren  $\beta$ -Arrestine als Adapter, die in der Lage sind, verschiedenen Elemente des GPCR-Signaltransduktionsweges zusammenzuführen wodurch den signalisierenden Proteinen die Möglichkeit der Aktivierung und subzellulären Lokalisation eröffnet wird. So dienen sie als Adapter für Mitglieder der Src-Familie und bilden ein Gerüst für verschiedene Mitglieder der MAPK-Kaskade (MAPK-Kinase Kinase, MAPK Kinase und MAPK) sowie für die c-Jun Aminoterminal-Kinase 3 (JNK3) und die ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase) wodurch diese der direkten Kontrolle des stimulierten Rezeptors unterstellt werden<sup>22</sup>. So ist ERK dann wiederum in der Lage  $\beta$ -Arrestin wie auch GRK herabzuregulieren, wodurch gleich zwei Faktoren der Rezeptordesensitivierung inhibiert werden<sup>41</sup>.  $\beta$ -Arrestin1 wird z. B. durch Phosphorylierung am S412-Rest inhibiert. Im Gegensatz dazu generiert die durch Arrestin rekrutierte und an der Mediation der ERK-Aktivierung beteiligte Tyrosinkinase Src eine positive Rückreaktion auf GRK2, indem sie GRK2 durch Phosphorylierung aktiviert<sup>41</sup>.

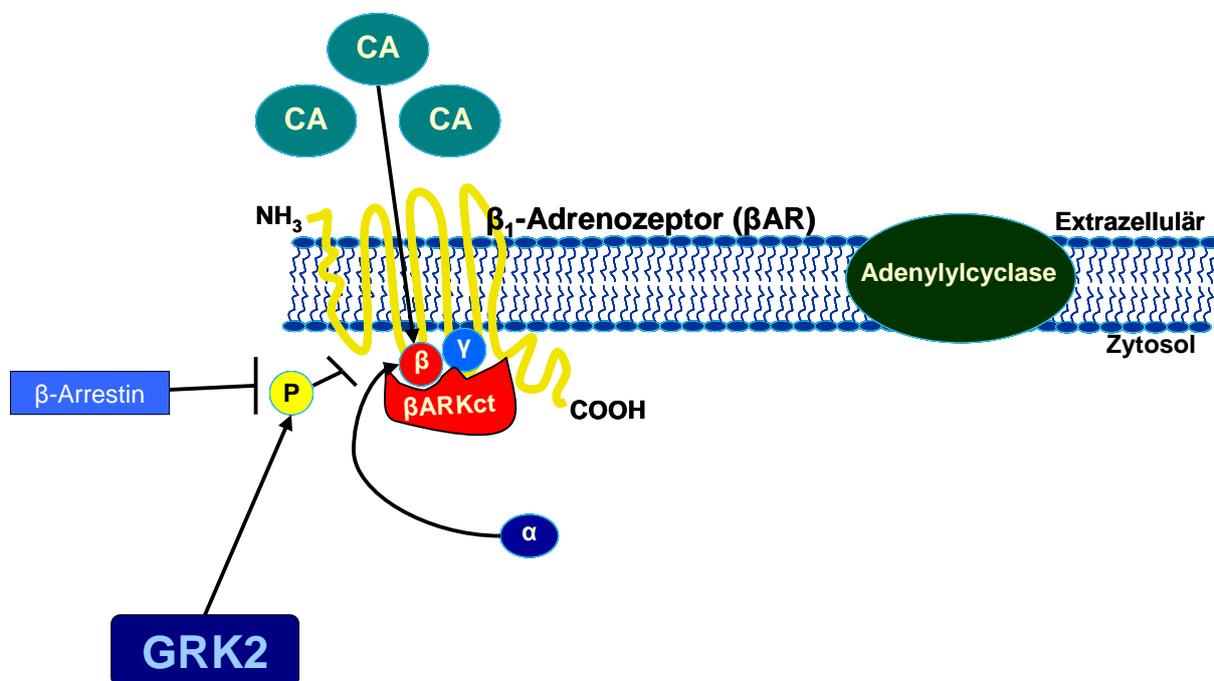
Interessante, mechanistisch signifikante Unterschiede treten in der Interaktion zwischen  $\beta$ -Arrestinen und Rezeptoren auf. So binden z.B. sogenannte Klasse A Rezeptoren, wie  $\beta_2$ AR,  $\beta$ -Arrestin vorübergehend, wandern mit Ihnen zu den Clathrin-coated-pits und dissoziieren. Die Rezeptoren werden dann ohne  $\beta$ -Arrestin internalisiert und generell schnell recycled bzw. zur Zelloberfläche zurückgeführt. Im Gegensatz dazu binden B-Klasse Rezeptoren, wie z.B. der AT<sub>1</sub>A Angiotensin II-Rezeptor oder der V<sub>2</sub> Vasopressin Rezeptor, deutlich stärker an  $\beta$ -Arrestin und internalisieren deshalb mit  $\beta$ -Arrestin. Diese Rezeptoren benötigen für das Recycling deutlich länger<sup>30</sup>.

Auch geht man bei der ERK-Aktivierung davon aus, dass diese zum einen durch G-Proteine mediiert, jedoch auch ohne vorherige G-Protein-Aktivierung nur durch  $\beta$ -Arrestine erfolgen kann<sup>30</sup>.

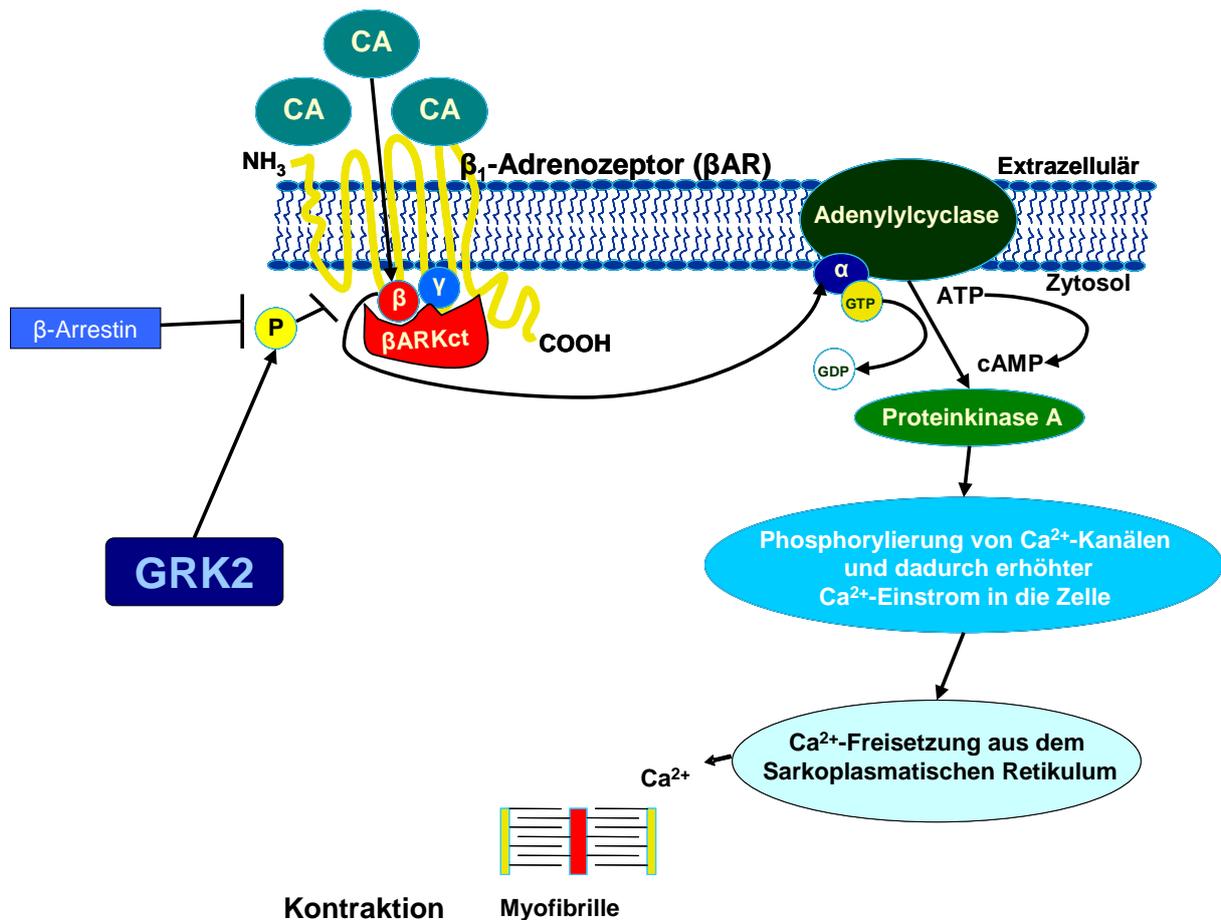
Ebenso unterbinden  $\beta$ -Arrestine nicht nur physikalisch die G-Protein-Signaltransduktion, sondern steigern die GPCR-Desensitivierung durch translozierte zytosolische Proteine wie PDE und c-Src (= Tyrosinkinase Src) zum Rezeptor. Einmal an der Membran können PDE und c-Src die Signaltransduktion durch den Abbau von cAMP oder die Phosphorylierung von GRK2 unterbinden, um dadurch die Aktivität von GRK2 gegenüber dem Rezeptor entsprechend zu erhöhen<sup>26</sup>.

## 6. Getherapeutische Inhibition der GRK2

Wie bereits geschildert kommt es im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz zu erhöhten Spiegeln der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase2, was die Desensitivierung der kardialen beta-Rezeptoren entscheidend mitbeeinflusst. Es wurden deshalb Versuche unternommen, die Effekte der Kinase zu inhibieren. Viele Studien am Kleintier haben hier bereits Erfolge nachweisen können. Verwendet wird ein Protein bestehend aus den letzten 194 Aminosäuren<sup>42; 43</sup> des C-terminus der bovinen GRK2 (=  $\beta$ ARK1), genannt  $\beta$ ARKct. Dieses konkurriert kompetitiv mit GRK2 um die Bindung an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und verringert so dessen Effekte (> Abb. 11)<sup>1; 22; 44; 45</sup> Hierdurch kann die Funktion der  $\beta$ -adrenergen-Signaltransduktionskaskade wieder hergestellt werden (> Abb. 12)<sup>44</sup>.



**Abb. 11** Inhibition der Phosphorylierung der  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit durch kompetitive Bindung von  $\beta$ ARKct. Modifiziert nach Pleger, 2007<sup>27</sup>.



**Abb. 12** Wiederherstellung der Normalfunktion der β-adrenergen-Signaltransduktionskaskade durch Inhibition der Phosphorylierung der G<sub>βγ</sub>-Untereinheit durch βARKct. Modifiziert nach Pleger, 2007<sup>27</sup>.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass es sowohl unter einer Herzinsuffizienz (HI), als auch in verschiedenen experimentellen Tiermodellen mit kardialer Dysfunktion zu einer Hochregulierung von myokardialen GRK2 kommt<sup>35; 36; 38; 39</sup>. Die herabgesetzte β-AR-Empfindlichkeit ist dabei vermutlich der zunehmenden GRK2 vermittelten Desensitivierung und Rezeptor-G-Protein-Entkopplung zuzuschreiben<sup>35</sup>. Noch vor einem Jahrzehnt wurde angenommen, dass diese Dämpfung des βAR-Signalweges durch eine erhöhte GRK2-Aktivität schützend wirkt. In vivo Studien mit Nagern<sup>46; 47</sup> und in vitro Studien mit humanen Kardiomyozyten<sup>48</sup> zeigten jedoch, dass die GRK2-Aktivität im untergehenden Herzen pathologisch wirkt<sup>35</sup>, und dass eine Inhibition durch βARKct die myokardiale Funktion verbessern<sup>49; 34</sup> und somit im Falle einer HI vorbeugend und rettend wirken kann<sup>35</sup>.

So demonstrierten transgene Mäuse mit herzspezifischer Überexpression der GRK2 oder seinem carboxyl-terminierten Ende, also βARKct, vielversprechende in vivo

Effekte auf die kardiale Funktion. Während GRK2 Überexpression zu einer vermehrten Abkopplung des Beta-Adrenergen-Rezeptors von der Adenylylcyclase und eine damit zusammenhängende Verminderung der linksventrikulären Kontraktilität verursachte, war bei Mäusen, die  $\beta$ ARKct überexprimierten selbst bei Abwesenheit des  $\beta$ -Agonisten eine verbesserte linksventrikuläre Kontraktilität sowie eine Umkehrung des transgenen GRK-Phänotyp festzustellen<sup>25; 35</sup>.

Bei Studien mit heterozygoten GRK2 knockout Mäusen [GRK(-/+)], die mit Mäusen gekreuzt wurden, welche eine myokardiale Überexpression von  $\beta$ ARKct aufwiesen, konnte eine weitere Reduktion in der GRK2-Aktivität im Herzgewebe sowie eine Verbesserung der kardialen Kontraktilität im Vergleich zu GRK(-/+)-Mäusen beobachtet werden<sup>26</sup>. Zusätzlich zeigte die biochemische Analyse der Herzen der Hybrid-Mäuse eine verringerte Rezeptor-Phosphorylierung und verbesserte  $\beta$ -adrenerge Signaltransduktion. Umgekehrt führte eine gezielte Überexpression von GRK2 im Myokard oder der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Abschwächung der Agonist stimulierten kardialen Kontraktilität bzw. Vasodilatation<sup>26</sup>. In Studien mit KO Mäusen für kardiomyozytäres GRK2 konnte des Weiteren gezeigt werden, dass vermindertes kardiomyozytäres GRK2 die LV-Kontraktilität bewahrt, das Remodelling des LV verbessert und das Überleben post MI erhöht<sup>35</sup>. In einem Mäusemodell mit einem Muskel LIM Protein Knockout ( $MLP^{-/-}$ ), der zu einer dilatierten Kardiomyopathie mit verminderter Kontraktilität des Herzens führte und phänotypisch durch  $\beta$ AR-Entkopplung und erhöhte GRK2-Expression gekennzeichnet war, wiesen die gekreuzten  $\beta$ ARKct/ $MLP^{-/-}$  Mäuse, im Gegensatz zu den nativen  $MLP^{-/-}$  bzw. den  $\beta_2$ AR/ $MLP^{-/-}$ , eine normale linksventrikuläre Funktion und keine Anzeichen einer Kammerdilatation auf<sup>50</sup>.

Ferner führte  $\beta$ ARKct Überexpression zu verbesserter Inotropie und Chronotropie im linksventrikulären Myokardium transgener Mäuse. Auch konnte die Ausbildung einer myokardialen Hypertrophie unterbunden, eine verbesserte Belastungstoleranz erzielt und die Überlebensrate gesteigert werden<sup>22; 25; 41; 51</sup>. Dabei wurde der potentielle Wert dieses Therapieansatzes noch dadurch gesteigert, dass die  $\beta$ AR-Funktion in untergehenden Kaninchen-Myozyten durch Adenovirus-medierten-Gentransfer von  $\beta$ ARKct wiederhergestellt werden konnte<sup>25</sup>.

In einem Mäusemodell der HI mit  $\beta$ ARKct-transgenen-Mäusen zeigten sich additive/synergistische Effekte auf das Überleben bei gleichzeitiger Applikation von

$\beta$ -AR-Agonisten<sup>35</sup>. Dies ist wichtig, da GRK2 auch andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren im Herzen desensitiviert, so dass der Mechanismus von  $\beta$ ARKct eventuell sogar über die positiven Effekte auf das  $\beta$ AR-Signaltransduktion hinausgeht<sup>35</sup>.

Ferner zeigte sich, dass herzspezifischer Adenovirus-mediierter Gentransfer von  $\beta$ ARKct die Grund- und Agonist-induzierte Arbeitsleistung in gesunden wie insuffizienten Kaninchenherzen nach der ventrikulären oder Cross-Clamp-Methode verbessert. Zusätzlich ist die  $\beta$ ARKct-Adenovirus-Infektion von glatter Gefäßmuskulatur geeignet, die neointimale Proliferation nach Angioplastie signifikant zu reduzieren<sup>1</sup>.

Selbst in untergehenden humanen Kardiomyozyten verbesserte der  $\beta$ ARKct-Gentransfer die  $\beta$ AR-Signaltransduktion und die kontraktile Dysfunktion<sup>35</sup>.

All diese Studien unterstützen die These, dass der Einsatz von  $\beta$ ARKct und die damit verbundene GRK2-Inhibition ein viel versprechendes Ziel in der Behandlung der Herzinsuffizienz ist<sup>35</sup>. Denn die daraus resultierende Unterdrückung der Arrestin-Rekrutierung zum Rezeptor, bedingt eine Abschwächung der Rezeptor-Internalisierung, so dass die Anzahl der Oberflächenrezeptoren gesteigert, einer Hypertrophie entgegengesteuert und die Belastungstoleranz verbessert wird<sup>41</sup>. Präklinische Großtierstudien könnten dabei helfen dieses Molekül in klinische Studien Einzug halten zu lassen<sup>35</sup>. Daher ist weiterführende Forschung nötig, um den Nutzen der Inhibition der GRK2-Aktivität durch einen AAV-medierten- $\beta$ ARKct-Gentransfer für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen zu bestimmen<sup>1</sup>.

## **7. $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten/ $\beta$ -Rezeptoren-Blocker ( $\beta$ -Adrenolytica/ $\beta$ -Sympatholytica)**

In der Natur kommen  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten nicht vor. 1958 wird Dichlorisoprenalin als erster synthetischer  $\beta$ -Blocker entdeckt und beschrieben. Dabei handelt es sich um einen partiellen Agonist mit recht hoher intrinsischer Aktivität, der therapeutisch jedoch nie zum Einsatz kam. Der älteste klinisch eingesetzte  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker ist Propranolol. Er wurde 1964 von J. W. Black und Imperial Chemical Industries in ENGLAND eingeführt<sup>24</sup>. Seit Ende der 60er

Jahre werden  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker zur der Therapie der ischämischen Herzkrankheit eingesetzt<sup>5</sup>. Weitere Indikationen für eine Therapie mit  $\beta$ -Rezeptoren-Blockern, stellen neben der koronaren Herzkrankheit auch die Behandlung tachykarder Herzrhythmusstörungen sowie der arteriellen Hypertonie und die Reinfarktprophylaxe dar<sup>15</sup>. Die Wirkung der  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten beruht auf ihrer Strukturähnlichkeit zu den Catecholaminen, im speziellen zu dem synthetischen, racemischen Noradrenalin-Derivat Isoprenalin, einem vollen Agonist der  $\beta$ -Adrenozeptoren<sup>24</sup>. Fast allen  $\beta$ -Blockern (außer Sotalol und Timolol) ist diese Isopropanol-Grundstruktur gemein<sup>15</sup>.  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker binden spezifisch und reversibel an  $\beta$ -Adrenozeptoren und verhindern ihre sympathomimetische Stimulation mittels kompetitiver Antagonisierung<sup>5; 15</sup>. Für ihre blockierende Wirkung an den  $\beta$ -Adrenozeptoren ist die aliphatische Hydroxylgruppe verantwortlich, wobei nur die linksdrehenden Formen aktive Verbindungen darstellen, die rechtsdrehenden haben eine 50-100-fach geringere und damit zu vernachlässigende blockierende Wirkung am Rezeptor. Der aromatische Teil des  $\beta$ -Rezeptoren-Blockers und seine Substituenten sind für seine Wirkungsstärke und relative Selektivität verantwortlich<sup>15</sup>. Ein großer Stickstoffsubstituent, meist eine Isopropylgruppe, macht die Antagonisten so  $\beta$ -Rezeptor-selektiv, dass sie auf  $\alpha$ -Adrenozeptoren praktisch nicht mehr wirken<sup>24</sup>.  $\beta$ -Blocker blocken jedoch nicht den Rezeptor, sondern führen zu einer Verschiebung der Catecholaminantwort in die richtige Richtung<sup>11</sup>.  $\beta_1$ -Rezeptorenblocker werden als kardioselektiv bezeichnet. Da am Herzen jedoch auch  $\beta_2$ -Rezeptoren vorkommen, andere Gewebe ebenfalls  $\beta_1$ -Rezeptoren besitzen und eine Selektivität nur bei niedriger Dosis besteht und mit steigender verloren geht, ist diese Bezeichnung jedoch unpräzise<sup>15</sup>.  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten lassen sich in vier Hauptgruppen unterteilen: Kardioselektiv, nicht kardioselektiv, mit intrinsischer sympathomimetischer Aktivität und ohne intrinsischer sympathomimetischer Aktivität. Hämodynamisch führen sie zu einer Herabsetzung der Myokardkontraktilität, Senkung der Druckerhöhungsgeschwindigkeit im linken Ventrikel (dp/dt), Blutdrucksenkung, Vergrößerung des Ventrikelvolumens, Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes, Reduktion des Schlagvolumens und der Ejektionsfraktion sowie zu einer Verlängerung der systolischen Austreibungszeit<sup>5; 52</sup>. Elektrophysiologisch wirken sie hauptsächlich negativ chrono- und dromotrop, inotrop und lusitrop und automatieunterdrückend<sup>5; 17; 52</sup>.  $\beta$ -Rezeptoren-Blockern wird ein Chinidin-ähnlicher Effekt nachgesagt wodurch ventrikuläre Arrhythmien

unterbunden werden<sup>5; 52</sup>. Sie sind die wichtigsten Antiarrhythmika (Klasse II-Antiarrhythmica), wirken antianginös und tragen dazu bei, die Prognose von Patienten mit Myokardinfarkt zu verbessern<sup>17</sup>.

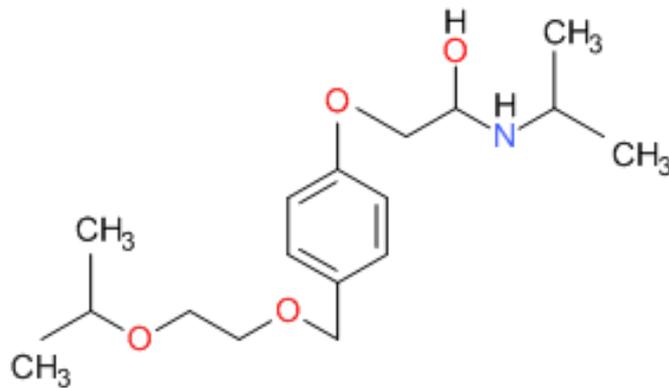
Bei bestehender Herzinsuffizienz versucht der Körper das geringere Herzzeitvolumen durch einen erhöhten Sympathikustonus zu kompensieren. Dies ist am Anstieg des Plasmanoradrenalins ablesbar, wodurch das Herz bereits in Ruhe unter vermehrtem Antrieb steht<sup>17; 15</sup>. Nach kurzzeitiger Erhöhung der Herzleistung kommt es in der Folge jedoch zu Myokardschäden wie Hypertrophie, Fibrose und Zelltod und damit zu einer weiteren Verschlechterung der myokardialen Funktion. Catecholamine wirken toxisch auf das Myokard und fördern dessen schädlichen, progredienten Umbau (Remodelling) unter der Herzinsuffizienz<sup>17</sup>.

Die Applikation von  $\beta$ -Rezeptoren-Blockern unterbricht diesen fortschreitenden Circulus vitiosus und schützt vor den toxischen Effekten (Apoptose, Nekrose) einer chronischen  $\beta$ -adrenergen Stimulation, was zu einem verzögerten Untergang der Herzmuskulatur führt<sup>17; 15; 52</sup>. Durch  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker wird der positiv chronotrope, dromotrope, bathmotrope und inotrope Einfluss des Sympathikus am Herzen abgeschwächt oder aufgehoben<sup>15</sup>. Durch Verlangsamung der Depolarisationsgeschwindigkeit der Schrittmacherzellen im Sinusknoten über die Hemmung des spannungsabhängigen Calciumeinstroms und des hyperpolarisationsaktivierten cAMP-regulierten Kationeneinstroms kommt es zu einer Reduktion der Herzfrequenz. Einem ähnlichen Einfluss unterliegen externe Schrittmacher. Ferner werden die Erregungsausbreitungsgeschwindigkeit in den Vorhöfen und die Leitungsgeschwindigkeit durch den Atrioventrikularknoten reduziert. Dies und die Herabsetzung des Blutdruckes und der Myokardkontraktilität führt zu einer Verminderung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs sowie zu einer Verbesserung der myokardialen Sauerstoffbalance<sup>2; 15; 53</sup>. Eine Steigerung der Pumpleistung ist nun nur noch über die Zunahme des Herzzeitvolumens (HZV) durch eine Erhöhung des Füllungsdrucks der Ventrikel und eine stärkere Vordehnung (Frank-Starling-Mechanismus) des Herzmuskels möglich. Dies schützt Patienten vor zu hohem Energie und Sauerstoffverbrauch und ist besonders bei Patienten mit eingeschränkter koronarer Blutversorgung von Bedeutung<sup>15</sup>. Die Mortalität sinkt um fast ein Drittel<sup>11; 17</sup>. Eine Erklärung für die Erholung der kontraktilen Funktion des Myokards unter  $\beta$ -Blockern, könnte in der Reversion des Herzinsuffizienz-typischen Phänotyps mit Resensitivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade, der

Normalisierung des intrazellulären Calciumstoffwechsels (z.B. durch vermehrte Expression der Ca-ATPase am Sarkoplasmatischen Retikulum – SERCA) und Reversion des fetalen Genexpressionsprogramms kontraktile Proteine liegen<sup>17; 53</sup>. Insgesamt führen die biologischen Therapieeffekte der Betablocker mittelfristig zu phänotypischen Veränderungen des myopathischen Herzens. Dadurch kommt es zu einer Abnahme des LV-Volumens und einer Zunahme der linksventikulären Ejektionsfraktion und somit zu einer Umkehr des Remodellingprozesses<sup>53</sup>.

Da  $\beta$ -Blocker die kardiale Auswurfleistung akut verschlechtern, oder bei Herzinsuffizienz zu einer akuten Dekompensation führen können, sollten diese vorsichtig und einschleichend dosiert werden. Im Therapieverlauf kann dann individuell, in Abhängigkeit von Herzfrequenz und Blutdruck höher dosiert werden<sup>5; 17; 15; 52</sup>. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz wird eine allmähliche Dosistitration mit Niedrigdosierungen empfohlen, die mit ca. einem Zehntel der Erhaltungsdosis beginnt und erst nach mehreren Wochen die Zieldosis erreicht<sup>15</sup>. Ziel ist dabei eine Reduktion der Herzfrequenz um 20 %, wobei 55 Schläge/min. nicht unterschritten werden sollten. Die Blutdrucksenkung sollte ca. 10 % betragen<sup>5</sup>. Unerwünschte Nebenwirkungen können in einer Verstärkung eines bestehenden AV-Blocks durch die negativ dromotrope Wirkung der  $\beta$ -Blocker, und in einer Verschlimmerung einer bestehenden Herzmuskelsuffizienz durch Senkung der Kontraktilität bestehen<sup>17</sup>. Ferner kann bei länger andauernder Rezeptorblockade oder auch bei Abnahme des sympathischen Tonus eine Überempfindlichkeit auf Agonisten als Folge einer erhöhten Rezeptorzahl in der Zellmembran auftreten. Dadurch kann es nach dem plötzlichen Absetzen einer  $\beta$ -Blocker-Therapie zu überschießenden kardialen Reaktionen wie z.B. Tachykardie oder auch Angina pectoris kommen. Im Falle der Beendigung einer Dauertherapie mit  $\beta$ -Rezeptoren-Blockern ist die Dosierung daher allmählich zu reduzieren<sup>15</sup>.

Das in dieser Studie eingesetzte Bisoprolol ( $C_{18}H_{31}NO_4$ ) ist ein  $\beta_1$ -kardioprävalenter (selektiver)  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker ohne intrinsische sympatho-mimetische Aktivität (ISA), der zur Therapie der Herzinsuffizienz geeignet ist (> Abb. 13)<sup>15; 53; 54</sup>.



**Abb. 13** Strukturformel von Bisoprolol.

Am Herzen wirkt Bisoprolol negativ chrono- und inotrop, führt jedoch bei Herzinsuffizienz langfristig zu einer Hochregulation der beta-Rezeptordichte und damit paradoxerweise zu einer verbesserten Kontraktilität. Bezüglich seiner Hydro-/Lipophilie nimmt es eine Mittelstellung im Vergleich zu anderen verfügbaren  $\beta$ -Blockern ein<sup>54</sup>. Die Bioverfügbarkeit liegt bei 88 (ca. 90) %<sup>17; 15; 54</sup>. Intrahepatisch wird Bisoprolol zu ca. 50 % in inaktive Metabolite abgebaut, der Rest wird unverändert renal aus dem Plasma entfernt und ausgeschieden. Mit einer Halbwertszeit von 10-12 h gehört es zu den länger wirkenden  $\beta$ -Rezeptoren-Blockern<sup>17; 15; 54</sup>. Bisoprolol ist für die Behandlung der arteriellen Hypertonie, der koronaren Herzkrankheit und der Herzinsuffizienz zugelassen<sup>54</sup>.

In einer vorangegangenen Studie eines präklinischen Schweinemodells führte die Behandlung mit Bisoprolol bei täglicher Applikation von 0,2 mg/kg i.v. zu einer reduzierten  $\beta_2$ -Adrenergen-Rezeptor-Aktivierung mit verminderter G-Protein Expression und verringerter  $\beta$ -adrenerger-Rezeptor-Kinase ( $\beta$ ARK)-Aktivität im Schweineherzen<sup>36</sup>. Neben der Herunterregulation von  $G_{i\alpha 2}$  und  $G_{s\alpha}$  mRNA sowie einer verminderten G-Protein Expression im linken Ventrikel, wurde auch ein verminderter G-Protein-Gehalt im rechten Ventrikel mittels Immunoblotting nachgewiesen. Ferner trat ein beachtlicher Anstieg der  $\beta$ -Adrenergen rezeptormedierten cAMP-Produktion in Verbindung mit einer persistent hohen Bindungsstärke des Agonisten auf. Des Weiteren konnte eine Reduktion der linksventrikulären  $\beta$ -Adrenergen-Rezeptorkinaseaktivität mittels lichtabhängiger Rhodopsin-Phosphorylierung aufgezeigt werden<sup>36</sup>.

## 8. Adeno-assoziierte-Viren (AAV)

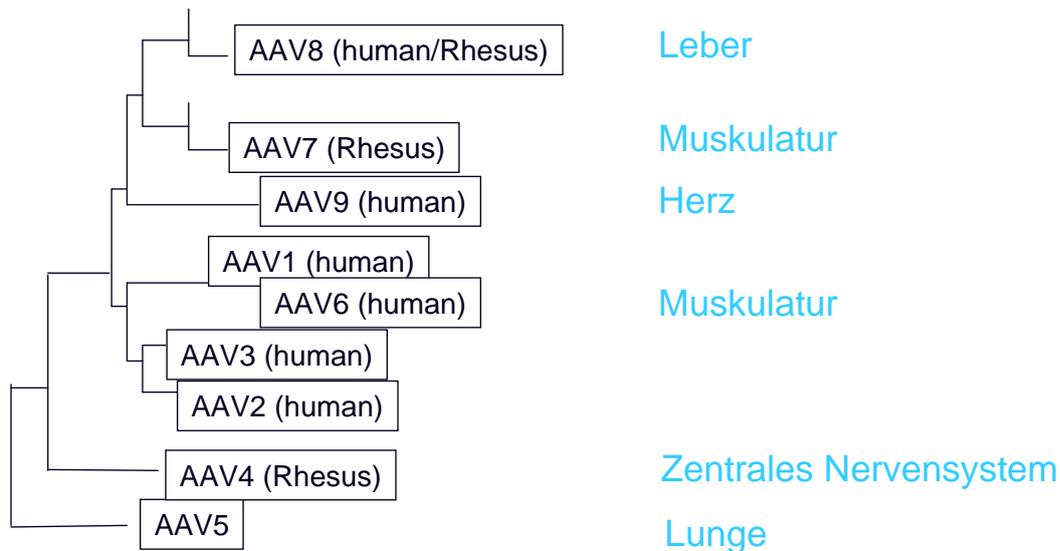
Adeno-assoziierte-Viren sind kleine DNA-Einzelstrangviren, die zum Genus der Dependoviren und zur Familie der Parvoviren gehören und bisher nachweislich zu keinen Humanerkrankungen geführt haben<sup>17; 35; 55; 56</sup>. Aufgrund ihrer Replikationsinkompetenz benötigen sie zur Vermehrung die Anwesenheit eines Helfervirus wie z.B. Adeno- oder Herpesviren<sup>57</sup>. Der Name „Adeno-assoziierte Viren“ kommt daher, dass Viren dieser Gruppe erstmals als Kontamination in Adenovirus-Isolaten gefunden wurden<sup>58</sup>. Ihre DNA weist eine Länge von 4675 Nukleotiden auf. Sie sind in der Lage, proliferierende oder ruhende Zellen zu infizieren, ohne dass dabei eine Immunreaktion hervorgerufen oder die Morphologie und das Wachstum der Zelle beeinflusst wird<sup>55; 58</sup>. Eine Zellteilung ist für die Expression nicht notwendig<sup>49</sup>. Die intrazelluläre Aufnahme der Adeno-assoziierten-Viren erfolgt durch Endozytose über so genannte Clathrin-coated vesicles<sup>59</sup>. Nach Freisetzung in das Zytosol folgt die Einwanderung der Viren in den Nukleus, Integration in das Wirtsgenom und latente Infektion. Nur in Anwesenheit der Helferviren kommt es zum lytischen Zyklus. Gentherapeutische Vektoren basierend auf den AAVs integrieren sich in der Regel nicht in das Wirtsgenom, sondern persistieren episomal. Dies erklärt den Verlust der Genexpression in rasch proliferierenden Zellen.

Nachteile der AAV stellen Schwierigkeiten bei der Herstellung der Vektoren und ein relativ geringes Packvermögen von ~ 4-5 kb dar<sup>17; 35</sup>. Ferner könnte die Anwesenheit von natürlich in der Bevölkerung vorkommenden AAV-Antikörpern ihren Wert limitieren.

Dennoch gelten AAVs allgemein hin als vielversprechende Vektoren für die gentherapeutische Behandlung chronischer Krankheiten, wie z.B. der Herzinsuffizienz (HI). Sie gewährleisten in bradytrophen Geweben wie dem Herzmuskel eine stabile Langzeitexpression bei zu vernachlässigender Immunreaktion und Toxizität<sup>17; 35; 60</sup>.

Über 100 verschiedene AAV Varianten darunter 11 Serotypen wurden bisher beschrieben<sup>60; 61</sup>. Diese unterscheiden sich primär durch ihre Kapsidproteine und entfalten hierdurch einen unterschiedlichen Gewebetropismus sowie Transduktionseffizienz (> Abb. 14)<sup>35; 56; 62</sup>. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere der AAV9 mit hoher Effizienz Kardiomyozyten transduziert<sup>63; 64; 65</sup>. Für die in dieser Dissertation dargestellten

Versuche wurde eine Pseudotypisierung vorgenommen, die ein Verpacken des AAV2-Genoms in das Kapsid des AAV9 ermöglichte. Dadurch wurden Hybrid-Vektoren geschaffen, die den Vorteil der sicheren Langzeit-Expression des AAV2 mit der verbesserten in vivo Wirksamkeit und der Gewebespezifität des AAV9 kombinierte <sup>60</sup>.



**Abb. 14** AAV-Serotypen unterscheiden sich bezüglich ihrer Transduktionscharakteristik und ihres Gewebetropismus. Adaptiert nach G. Gao, 2004 <sup>56</sup>.

Als idealer Modus für die Gentherapie in der HI wird die intravenöse Applikation eines Vektors angesehen, der spezifisch und effizient von den Kardiomyozyten aufgenommen wird. Dies könnte sich auf den Menschen übertragen schwierig gestalten, da hier ein viel größeres Blutvolumen vorhanden ist und die nachfolgende Verdünnung berücksichtigt werden muss. Dennoch könnte der Gewebetropismus einiger AAV Serotypen genau dies ermöglichen und die eigentlich benötigte Dosis, die für einen effektiven human kardialen Gentransfer benötigt wird, limitieren <sup>35</sup>.

In vorliegender Studie wurde ein Adeno-assoziiertes-Virus Serotyp-9 (AAV2/9/CMV<sub>enh</sub>-MLC1, 5-βARKct) als Vektor verwendet. Durch den Einsatz eines herzspezifischen MLC-Promotors konnte der Gewebetropismus von AAV2/9 sinnvoll ergänzt und eine Expression in nicht kardialen Gewebe verhindert werden <sup>66; 67</sup>. Ferner wurde die selektive druckregulierte Retroinfusion als Applikationstechnik gewählt, mit der ein spezifisches Einbringen des Virusvektorkonstrukts in die AIV

erfolgen konnte. Durch die kurzzeitige retrograde Ballonokklusion der AIV unter der druckregulierten Applikation, konnte die Verweildauer des Therapeutikums erhöht und dessen myokardiale Konzentration gesteigert werden. Daraus resultierte eine verbesserte Gewebefixierung unter definierten Bedingungen<sup>68; 69</sup>.

In einigen Vorversuchen (AAV 20 und AAV 28), kam das lacZ-Gen als Markergen zum Einsatz. Das lacZ-Gen codiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase, das neben der Spaltung von Lactose auch in der Lage ist, die synthetische Verbindung 5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid (X-Gal) zu spalten. Dies führt zur Entstehung eines tiefblauen Indigofarbstoffs, der sich mit Hilfe der X-Gal-Färbung darstellen lässt und jene Zellen farblich markiert, die das lacZ-Gen aufgenommen haben und  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren. Somit konnte mittels des lacZ-Gens sowohl die Effizienz wie auch der Ort des Gentransfers verifiziert werden.

## 9. Brain Natriuretic Peptide (BNP)

Die Familie der natriuretischen Peptide besteht aus 3 Mitgliedern, dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP), dem B[Brain]-Typ-natriuretischen Peptid (BNP) und dem C-Typ natriuretischen Peptid (CNP)<sup>17; 70</sup>. Sie bestehen aus 28-32 Aminosäuren und werden im Herzen und Gehirn gebildet<sup>17</sup>. Das BNP wird vorwiegend in Kardiomyozyten synthetisiert und dort in 2 Bruchstücke das BNP und das NT-proBNP (= inaktives N-terminales proBNP) aufgespalten, die dann sezerniert werden können<sup>71</sup>. Alle natriuretischen Peptide sind vasodilatatorische Botenstoffe und können zudem eine Natri- und Diurese stimulieren<sup>17; 70; 72</sup>. Weitere Wirkungen sind eine Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems sowie von Endothelin und Noradrenalin<sup>17; 70</sup>. So sind ANP und BNP in der Lage den sympathischen Einfluss herabzusetzen und eine Vasopressinfreisetzung zu unterbinden<sup>70</sup>. Hierdurch erhalten sie eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation insbesondere auch durch Reduktion der kardialen Vorlast. Das C-Typ natriuretische Peptid wird in Endothel- und glatten Muskelzellen des Zentralen Nervensystems gebildet und wirkt im Gegensatz zu seinen Verwandten ANP und BNP nicht direkt natriuretisch sondern vermutlich auf autokrinem oder parakrinem Weg<sup>70</sup>.

ANP, das erste Familienmitglied, besteht aus 28 Aminosäuren und wird hauptsächlich in den Vorhöfen synthetisiert<sup>71</sup>. Dabei wird ein erhöhtes

intravaskuläres Volumen und eine erhöhte Wandspannung in den Vorhöfen des Herzens, in Verbindung mit anderen Hormonen und Neurotransmittern wie z.B. Endothelin und Catecholaminen, als Hauptstimulus der Synthese angesehen <sup>70</sup>.

BNP besteht aus 32 Aminosäuren und wurde 1988 als zweites natriuretisches Peptid aus Schweinehirn isoliert <sup>70; 71; 73</sup>. BNP wird hauptsächlich im Ventrikel und zum Teil auch im Atrium synthetisiert. Im Menschen erfolgt die BNP-Sekretion hauptsächlich (zu ca. 70 %) aus den Ventrikeln <sup>70</sup>. BNP und das inaktive NT-proBNP werden im Gegensatz zu ANP nicht gespeichert, sondern direkt nach ihrer Bildung durch das Myokard freigesetzt, sobald die Ventrikel einer erhöhten Wandspannung durch z.B. erhöhte intrakardiale Drücke und/oder Volumen ausgesetzt sind <sup>70</sup>. Die kardiale Synthese von ANP and BNP ist unter kardialer Hypertrophie erhöht und geht mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen einher <sup>71; 72</sup>. Dabei korreliert die Serumkonzentration des BNP invers mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF). Eine hohe BNP-Serumkonzentration weist auf eine verminderte LVEF hin <sup>71</sup>:

< 100 pg/ml	Keine kongestive Herzinsuffizienz (HI)
100-300 pg/ml	Kongestive HI vorhanden
> 300 pg/ml	Milde kongestive HI
> 600 pg/ml	Mittelschwere kongestive HI
> 900 pg/ml	Schwere kongestive HI

**Tabelle 4:** Korrelation der BNP-Blutserumkonzentration mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz. Nach Furger, 2009 <sup>71</sup>.

Die Höhe der BNP/NT-proBNP-Konzentration im Blutserum stellt damit einen zuverlässigen diagnostischen Indikator zur Abklärung des Schweregrades einer Herzinsuffizienz dar und ist in die Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie und der Deutschen Gesellschaft für Kinderkardiologie eingeflossen <sup>70; 74</sup>. Erhöhte Serumkonzentrationen von BNP/NT-proBNP (und ANP) können neben der kongestiven Herzinsuffizienz auch bei Hypertonie, Hypervolämie, akutem Koronarsyndrom, linksventrikulärer Dysfunktion, hypertrophischer Kardiomyopathie,

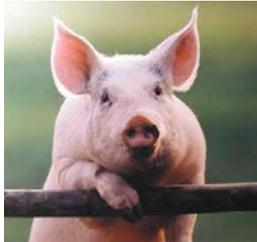
Arrhythmien, Vorbestehen einer kürzlichen HI, hohem Alter, diversen Lungenerkrankungen, infiltrativer Kardiopathie, akuter Kardiomyopathie, Myokarditis, Zytostatika-induzierter Kardiopathie, Niereninsuffizienz, Zuständen mit erhöhtem Herzminutenvolumen (Sepsis, Verbrennung etc.), Herzklappenerkrankungen und Hirnschlag auftreten<sup>70; 71</sup>.

### III. ZIELE DER STUDIE

Basierend auf den bisher vorliegenden, vielversprechenden Ergebnissen aus  $\beta$ ARKct Gentransfer-Versuchen mit Nagetieren (Maus)<sup>34; 75</sup> und Lagomorphen (Kaninchen)<sup>1; 46; 47</sup> setzten wir uns die Etablierung eines präklinischen Schweinmodells der chronischen Herzinsuffizienz mit Adeno-Assoziierter-Virus-Vektor mediiertes Gentherapie durch  $\beta$ ARKct zum Ziel, um zu evaluieren, ob diese Effekte auch auf ein Großtiermodell übertragbar sind. Dabei sollte vor allen Dingen die Bewertung des  $\beta$ ARKct Gentransfers anhand der Resensitivierung der beta-adrenergen Signaltransduktionskaskade und der daraus resultierenden Fähigkeit der Erhaltung oder Verbesserung der myokardialen Funktion im Vordergrund stehen. Die myokardiale Funktion wollten wir mittels hämodynamischer Messungen, Sonomikrometrie, Infarktgrößenbestimmung und mit Hilfe der BNP-Blutserumkonzentration eruieren. Diese Effekte sollten mit denen einer bereits etablierten pharmakologischen Behandlungsmethode (Betablocker) verglichen werden.

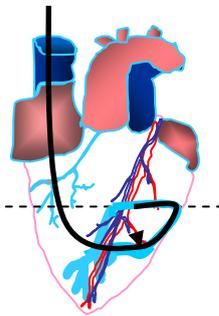
## IV. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Studiendesign



#### Tag 0 Infarktinduktion

Globale myokardiale Funktionsmessungen (Hämodynamik, Angiographie), 90 min. Ischämie durch LAD-Okklusion und anschließende Reperfusion



#### Tag 14 Gentherapie

Globale myokardiale Funktionsmessungen (Hämodynamik, Angiographie), Regionaler myokardialer Blutfluss, MRT, Selektive druckregulierte retrograde Retroinfusion:

- Kontrolle: Kochsalzlösung
- $\beta$ ARKct: AAV2/9- $\beta$ ARKct  $1 \times 10^{12}$  gc/Tier
- $\beta$ -Blocker: Bisoprolol oral, 2,5 mg/Tag



#### Tag 56 Gewebeentnahme

Myokardiale Funktionsmessungen (global und regional), MRT, Gewebeernte, Histologie, Infarktgrößenbestimmung

## **2. Versuchsgrundlagen**

Diese Studie wurde von der Regierung von Oberbayern nach AZ 67/07 genehmigt und nach dem deutschen Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206,1313), das zuletzt durch das Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950) geändert worden ist, durchgeführt.

### **2.1. Versuchstiere**

38 Versuchstiere der Rasse deutsches Landschwein, mit einem durchschnittlichen Gewicht von 25 kg  $\pm$  2 kg, wurden vom Lehr- und Versuchsgut der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Oberschleißheim, DEUTSCHLAND bezogen und anschließend im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin eingestallt. Dort erfolgte die Haltung der Tiere in Gruppen von 3-4 Tieren bei einem kontrolliertem Tag-/Nachtzyklus und freiem Zugang zu Wasser und einer einmalig am Tag bereitgestellten ssniff<sup>®</sup> Schweine-Standarddiät (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DEUTSCHLAND) nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes. Nach einer Wartezeit von 5 Tagen konnte mit den Versuchen begonnen werden.

### **2.2. OP-Vorbereitung – Kalibrierung der Hämodynamischen-Messgeräte**

Zur Überwachung des arteriellen Blutdrucks wurde dieser über ein Druckwandlersystem (Statham Transducer P23 ID Statham Instruments, Inc., Oxnard, CA, USA) abgenommen und auf einem Monitor (Hellige, Freiburg im Breisgau, DEUTSCHLAND) optisch dargestellt. Vor jedem Versuch wurde dazu die für die hämodynamischen Messungen benötigte Hellige eingeschaltet und das Druckmesssystem mittels Nullabgleich gegen den atmosphärischen Luftdruck abgeglichen. Es folgte die Kalibrierung des arteriellen Blutdrucks auf 100 mmHg gegen den Umgebungsluftdruck. Dabei befand sich der Druckabnehmer auf Herzhöhe. Ferner wurde der Conductance Katheter (Millar pressure tip catheter SPC 560, Millar Transducer Control Unit MIL-TC-510, Millar Instruments, Texas, USA), der u.a. der Bestimmung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes dient, in ca. 37° C warmem Wasser in Herzhöhe auf Null abgeglichen und auf 100 mmHg kalibriert.

## 2.3. Hämodynamische Grundlagen

### 2.3.1. Arterielle Blutdruckmessung

Der Aortendruck wurde mittels einer in die Arteria carotis interna eingelegten 9 Fr. Schleuse (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA), die über ein Druckschlauchsystem (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DEUTSCHLAND) distal mit einem Druckabnehmer (Statham Transducer P23 ID Statham Instruments, Inc., Oxnard, CA, USA, Hellige Monitor, Freiburg, DEUTSCHLAND) verbunden war, abgenommen. Grundlage hierfür stellte das unter Punkt 2.2. erläuterte System dar. Dabei war darauf zu achten, dass das komplette Druckmesssystem luftblasenfrei mit 0,9 %iger NaCl-Lösung (NaCl 0,9 % Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., DEUTSCHLAND) befüllt war. Der Aortendruck diente, wie auch die Herzfrequenz, die Sauerstoffsättigung und der Puls, als hämodynamischer Kontrollparameter während der Narkose. Die Herzfrequenz wurde mittels Elektrokardiogramm (EKG) und die Sauerstoffsättigung sowie der Puls mittels Pulsoxymeter (Ohmeda BIOX 3700e, Louisville, CO, USA) kontinuierlich gemessen.

### 2.3.2. Ejektions-/Auswurffraktion

Die Ejektionsfraktion (EF) gilt als Kontraktilitätsparameter der auxotonen Phase der Herzkontraktion und als Maß für die Ventrikelentleerung<sup>5</sup>. Die EF gemessen in Ruhe und unter Belastung kann in Beziehung zum LVEDP und dem linksventrikulären enddiastolischen Volumen (LVEDV) einen Aufschluss über die linksventrikuläre Funktion geben. Postinfarkt, sinkt die EF unter Belastung im Vergleich zum gesunden Herzen signifikant ab. Bereits ein Abfall von  $\geq 5\%$  deutet auf eine Herzinsuffizienz hin. In der Humanmedizin liegen Normalwerte der EF bei 50-75 %<sup>5</sup>.

Die Berechnung der EF erfolgt nach folgender Formel:

**Formel 1:**

$$EF = \frac{EDV - ESV}{EDV} = \frac{SV}{EDV} \times 100 [\%]$$

**EF** = Ejektionsfraktion

**EDV** = Enddiastolisches Volumen

**ESV** = Endsystolisches Volumen

**SV** = Schlagvolumen

Nach Einlage eines 6 Fr. Pigtail Katheters (PIG Super Torque<sup>®</sup> Plus, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) über die arterielle 9 Fr. Schleuse und Vorführung bis in den Herzspitzenbereich des linken Ventrikels, erfolgte die biplane Darstellung mittels C-Bogen (Exposcop 8000, Ziehm GmbH, Nürnberg, DEUTSCHLAND) bei einer Right-Anterior-Oblique (RAO)-Projektion von 60° unter Ruhebedingungen und unter Belastung (rechtsatrialem Pacing, 130 Schläge/min.). Das Kontrastmittel (Imeron 350, Imeprol, Bracco Imaging, Konstanz, DEUTSCHLAND) wurde dabei kontinuierlich in einer Menge von 10 ml über 1-2 Sekunden appliziert. Die RAO-Projektion ermöglichte neben der Ermittlung der EF auch die überlagerungsfreie Beurteilung der anterioren Bereiche des linken Ventrikels. Die Auswertung der EF erfolgte mittels des Programms Quantcor LVA (Siemens AG, München, DEUTSCHLAND).

### **2.3.3. Messung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP)**

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) wird als Füllungsdruck zur Beurteilung des Funktionszustandes des linken Ventrikels benutzt<sup>5</sup>. Er ist ein Parameter der globalen Myokardfunktion mit dem die Entwicklung einer Herzinsuffizienz abgeschätzt, und deren Schweregrad mittels Kathetertechnik bestimmt werden kann. Der Normalbereich des LVEDP liegt bei Gesunden bei 8-12 mmHg. Bei linksventrikulärer Dysfunktion liegt er wesentlich höher, was durch die verminderte Dehnbarkeit des hypertrophierten oder ischämisch geschädigten Herzens bedingt ist<sup>76</sup>. Post-Infarkt kommt es sowohl im Infarktreal, wie auch in der Area at Risk in Abhängigkeit von der Infarktgröße und dem damit einhergehenden Myozytenuntergang bzw. der Hibernation von Myozyten zu einer verminderten Kontraktilität des Myokards. Dies führt zu einer Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEDV). Postsystolisch verbleibt nun mehr Blut im linken Ventrikel, der LVEDP steigt an und ermöglicht eine Aussage über die linksventrikuläre

Funktion. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt gilt ein LVEDP von 21-24 mmHg als optimaler Füllungsdruck, bei dem das Herz seine höchste Auswurfleistung erzielen kann<sup>76</sup>.

Vor jedem Versuch wurde die unter Punkt 2.2. beschriebene Kalibrierung des Druckmesssystems durchgeführt. Zur Messung des LVEDP wurde ein 6 Fr.-Conductance-Katheter (Millar pressure tip catheter SPC 560, Millar Instruments, Texas, USA) unter Röntgenkontrolle über den arteriellen Zugang (Exposcop 8000, Ziehm GmbH, Nürnberg, DEUTSCHLAND) in den linken Ventrikel vorgeführt. Dabei kam die Katheterspitze im Apexbereich des linken Ventrikels zum liegen. Der enddiastolische linksventrikuläre Druck wurde nun unter Ruhebedingungen und atrialem Pacing (130 Schläge/min.) durch Aufzeichnung der Ventrikeldruckkurve (CardioSOFT™ Version 3.4.50, Sonometrics Corporation, London, CANADA) gemessen.

#### **2.3.4. Systolische Anstiegsgeschwindigkeit des linksventrikulären Drucks nach der Zeit (dLVP/dt)**

Mittels oben beschriebener Conductance-Katheter-Messung wurde auch die systolische Anstiegsgeschwindigkeit des linksventrikulären Drucks, die erste Ableitung der Ventrikeldruckkurve nach der Zeit  $dLVP/dt$ , gebildet. Dabei wird die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ) in der Anspannungsphase und die Druckabfallgeschwindigkeit ( $dp/dt_{min}$ ) in der Entspannungsphase gemessen. Anfangs ist die Druckanstiegsrate des Ventrikels dabei nicht maximal. Sie erhöht sich mit Beginn der Systole bis zum Maximum vor Beginn der Ejektion =  $dp/dt_{max}$ . Nach Abschluss der Ejektion steigt die isovolumetrische Spannung an, Mitralklappe und Trikuspidalklappe öffnen sich, so dass der erneute Einstrom des Blutes in die Ventrikel für die nächste Systole beginnt =  $dp/dt_{min}$ <sup>5</sup>. Der  $dLVP/dt$  stellt somit trotz seiner Abhängigkeit von der Vor- und Nachlast, der Herzfrequenz und des Koronarperfusionsdruckes einen verifizierbaren Parameter zur Messung und zum Vergleich der linksventrikulären Kontraktilität und Relaxation dar<sup>77; 78</sup>. Der humanmedizinische Normwert liegt bei 1500-1800 mmHg<sup>5</sup>.

#### **2.3.5. Fluoreszierende Mikrosphären**

Die Bestimmung des Blutflusses in Geweben, die einem Infarktrisiko unterliegen, ist

essentiell, um die pathologischen Nebeneffekte der vaskulären Okklusion zu verstehen<sup>79</sup>. Dabei stellt die Verwendung von fluoreszierenden Mikrosphären (FluoSpheres<sup>®</sup> Blood Flow Determination Fluorescent Color Kit #3, polystyrene microspheres, 15 µm Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) eine etablierte Methode zur Bestimmung des regionalen myokardialen Blutflusses dar<sup>80-81</sup>. Im Vergleich zu den ursprünglich zu diesem Zweck verwandten radioaktiven Mikrosphären, erzielen die fluoreszierenden Mikrosphären vergleichbar gute Resultate und sind dabei kostengünstiger, leichter zu entsorgen und stellen keine potentielle Gefahr für den Anwender dar<sup>79; 82; 83; 84</sup>. Mit ihnen sind Ein- oder Mehrfachmessungen der regionalen Organperfusion möglich<sup>85</sup>. Die Wahl der richtigen Größe der Mikrosphären ermöglicht zum Beispiel die Messung des Organblutflusses oder dessen Verteilung in den Organen. Dabei haben kleinere Mikrosphären (15 µm oder kleiner) gegenüber den Größeren oftmals signifikante Vorteile. Sie werden ähnlich wie rote Blutzellen im Organ verteilt, Verstopfen das vaskuläre Bett seltener, variieren nicht so sehr in der Größe und können in einer signifikant größeren Anzahl appliziert werden. Gerade der letzte Punkt ist für eine zuverlässige Bestimmung des regionalen Blutflusses von Bedeutung<sup>86</sup>. Zur Messung des regionalen myokardialen Blutflusses werden fluoreszierende Polystyrene Mikrosphären mit einem Durchmesser von 15 µm ( $\pm 0,1$  µm) direkt in den linken Ventrikel appliziert<sup>84; 87</sup>. Hier erfolgt die Durchmischung mit dem Blut. Durch die Systole erfolgt die Austreibung in die arterielle Strombahn und damit über die Koronargefäße in die Kapillaren des perfundierten Myokards. Die Mikrosphären bleiben in den deutlich kleineren Kapillaren (5-10 µm) proportional zum Blutfluss hängen. Nach abschließender Quantifizierung der Mikrosphären aus dem Gewebe erfolgt die Berechnung des regionalen myokardialen Blutflusses im Vergleich zu einer Referenzflussprobe<sup>88-89</sup>.

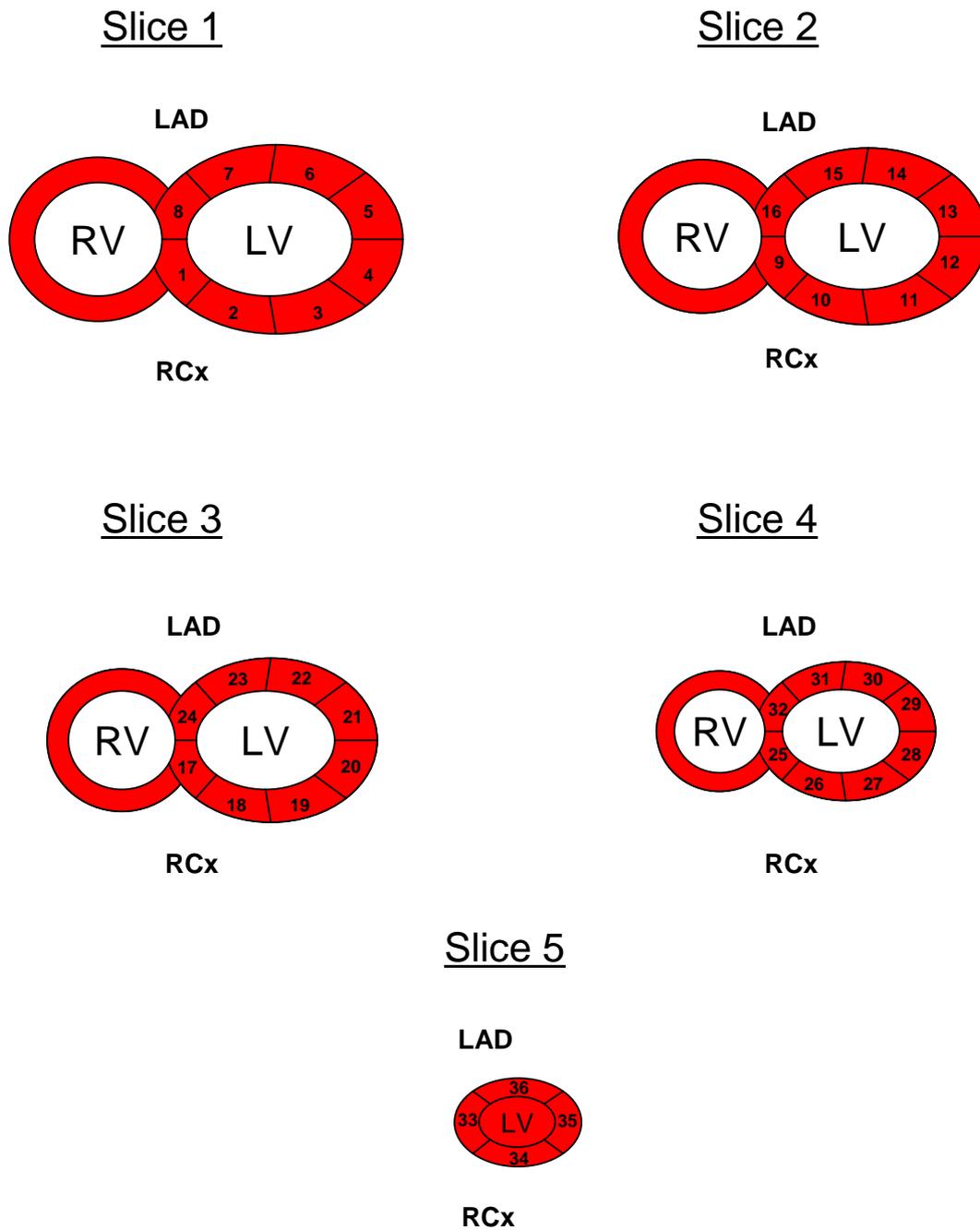
Um eine homogene Verteilung der Mikrosphären vor Applikationsbeginn zu gewährleisten wurden diese in einem Vortex (Vortex Genie 2<sup>TM</sup> (Bender & Hobein AG, Zürich, SCHWEIZ) zunächst 3 min. und nach zwischenzeitlichem Ultraschallbad (Bandelin Sonorex TK 52 H, Bandelin electronic, Berlin, DEUTSCHLAND) weitere 1,5 min. gevortext. Anschließend erfolgte die Verdünnung eines Mikrosphären-Alliquots von 5 ml ( $1 \times 10^6$  Mikrosphären/ml) auf 20 ml mittels 0,9 %iger NaCl-Lösung (NaCl 0,9 % Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., DEUTSCHLAND).

Die im Volumen von 20 ml gelösten Mikrosphären wurde dann über einen zuvor im linken Ventrikel platzierten 6 Fr. Pigtailkatheter (PIG Super Torque<sup>®</sup> Plus, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) über einen Zeitraum von 1 Minute unter Ruhepulsbedingungen appliziert<sup>87, 90</sup>. Eine spätere, erneute Applikation erfolgte nach Farbwechsel unter atrialem Pacing (Pacer in rechtem Vorhof, Stimulationsfrequenz 130 s/min.). Ein Abzug von arteriellem Blut zwecks Referenzermittlung fand über die arterielle 9 Fr. Schleuse statt. Dazu wurde ab Applikationsbeginn, über einen Zeitraum von 3 Minuten, Blut über einen Perfusorschlauch (Spritzen-Pumpenleitung, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DEUTSCHLAND) in eine mit 3 ml Natriumcitrat-Lösung (Na-Citrat-Lösung 3,13 % Eifefango<sup>®</sup>, Eifefango, Bad Neuenahr-Ahrweiler, DEUTSCHLAND) gefüllte 30 ml Perfusor-Spritze (BD Plastipak<sup>™</sup> Perfusion syringe, BD Drogheda, Ireland) mittels der Harvard Apparatus Standard Infuse/Withdraw Pump (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA) abgezogen. Die Abzugsrate lag bei 4,12 ml/min. Anschließend wurde das Referenzblut unter Vakuum durch ein Sample Processing Unit (SPU)-Filtersystem (Sample Processing Unit Filters/Set, Angelika Gaiser, Kunststoff- und Metallprodukte GmbH, Kappel-Grafenhausen, DEUTSCHLAND) abgezogen. Die SPU ist eine röhrenförmige Filtrationseinrichtung, deren Siebgewebe aus Polyamid besteht<sup>91</sup>. Aufgrund der Maschenweite des Siebgewebes von 7 µm, blieben die 15 µm großen Mikrosphären im Sieb hängen. Nach kurzer Nachspülphase mit isotonischer Kochsalzlösung wurden die Mikrosphären behafteten Sample Processing Units nun aufrecht, lichtgeschützt, und gekühlt aserviert. Die in den Kapillaren des Myokards hängen gebliebenen Mikrosphären konnten nach Gewebeentnahme am Tag 56 aufgearbeitet und schließlich fluoreszenztechnisch durch Messung der Fluoreszenz-Intensität (Top und Bottom), der Fluoreszenz-Polarisation, der Multikanalabsorption und der Lumineszenz mittels Mikroplatten Reader (Safire<sup>2™</sup> Mikroplatten Reader, Tecan, Crailsheim, DEUTSCHLAND) quantitativ bestimmt werden.

Dazu wurde das Herz post mortem mittels eines Parenchymmessers ausgehend von der Herzspitze zur Herzbasis hin in 5 Scheiben/Slices geschnitten. (Apex = Slice 5, Basis = Slice 1). Diese wurden für mindestens eine Woche in 4 % Formalin-Lösung (Ausgangslösung: Formaldehyd 37 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND) fixiert. Nach Entfernung der rechten Ventrikel, wurden die linksventrikulären Anteile der einzelnen Scheiben/Slices ausgehend vom Kontrollareal (RCx), in Richtung des Ziel-/Infarktareals (LAD), mittels transmuraler

Schnittführung in 8 Segmente unterteilt (> Abb. 15).

### Schnittschema des linken Ventrikels zur Gewinnung der Mikrosphärenproben



**Abb. 15** Schnittschema des Herzens zur Mikrosphärenprobengewinnung.

Diese 8 Segmente wiederum, wurden nach epikardialem und endokardialem Anteil unterteilt, so dass daraus für die Slices 1-4 jeweils 16 Gewebeproben und für den Slice 5 (Apex) aus 4 Segmenten, 8 Gewebeproben resultierten. Die Gesamtanzahl der Gewebeproben betrug somit 72 pro Tier. Die einzelnen Proben wurden nun auf einer Waage (Mettler PL 1200, Mettler Waagen GmbH, Giessen, SCHWEIZ) gewogen, wobei das durchschnittliche Schnittgewicht bei ca. 1 g lag und 2,5 g nicht überschreiten durfte, um Messfehler und Standardabweichung möglichst gering zu halten. Überschüssiges Material wurde bei Bedarf entfernt. Die Proben wurden nach dem Wiegen in durchnummerierte SPU-Filtersysteme überführt. Diese 76 Proben (72 Gewebeproben und 4 Referenzen (baseline + pacing d 14 und d 56)) wurden dann in Heizblöcke (Perkin Elmer Bodenseewerk, Perkin Elmer GmbH, Überlingen, DEUTSCHLAND) verbracht und mittels 15 ml, 4M KOH-Lösung (Kaliumhydroxid Plätzchen, KOH 56,11 g/mol, Merck KGaA, E. Merck KG, Darmstadt, DEUTSCHLAND) welche mit einem Polysorbat 80-Anteil (Tween<sup>®</sup> 80, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND) von 0,02 % versetzt war, bedeckt. Es folgte die flüssige Abdeckung mittels 2 ml Isopropanol (2-Propanol, Merck KGaA, E. Merck KG, Darmstadt, DEUTSCHLAND). Danach wurden die Proben mit losen Deckeln verschlossen. Die anschließende Autolyse erfolgte für 6 h bei 60° C. Nach erfolgreichem Verdau wurde die verbliebene Restlösung unter Unterdruck durch den SPU-Filter abgezogen und mittels phosphatgepufferter Salzlösung (Apothekes Innenstadt Uni München, DEUTSCHLAND) abgepuffert und abgetrocknet. Nach weiterer Lufttrocknung und Umsetzung in 50 ml Falcons (BD Falcon<sup>™</sup> 50 ml Röhrchen mit Schraubverschluss, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DEUTSCHLAND) erfolgte die Lösung der Mikrosphären in 2 ml 2-Ethoxyethyl Acetat (Cellosolve<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DEUTSCHLAND) und die Abzentrifugation für 2 Minuten durch die SPU-Filter mittels einer Zentrifuge (Heraeus Varifuge 3.2S Heraeus Holding GmbH, Hanau, DEUTSCHLAND) bei 3000 Umdrehungen/Minute. Anschließend wurde ein Alliquot von je 200 µl pro Probe auf eine lösungsmittelresistente Mikrotiterplatte (Brand Mikrotiterplatte, U-Boden, PP, 96-Well, Vol. 300 µl, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DEUTSCHLAND) pipettiert und mittels Mikroplatten Reader (Safire<sup>2™</sup> Mikroplatten Reader, Tecan, Crailsheim, DEUTSCHLAND) analysiert. Die ermittelten Werte für die einzelnen Myokardproben konnten nun in Bezug zur Fluoreszenzintensität der jeweiligen Referenz bei bekannter Abzugsrate (4,12 ml/min.) gesetzt werden. Der regionale myokardiale

Blutfluss wurde dann nach folgender Formel berechnet<sup>80, 88, 91-92</sup>:

**Formel 2:**

$$F_i = \frac{(I_i) (R)}{I_{ref}}$$

$F_i$  = Regionaler Blutfluss der Myokardprobe (ml/min)

$I_i$  = Fluoreszenzintensität der Myokardprobe

$R$  = Abzugsrate des Referenzblutes (ml/min)

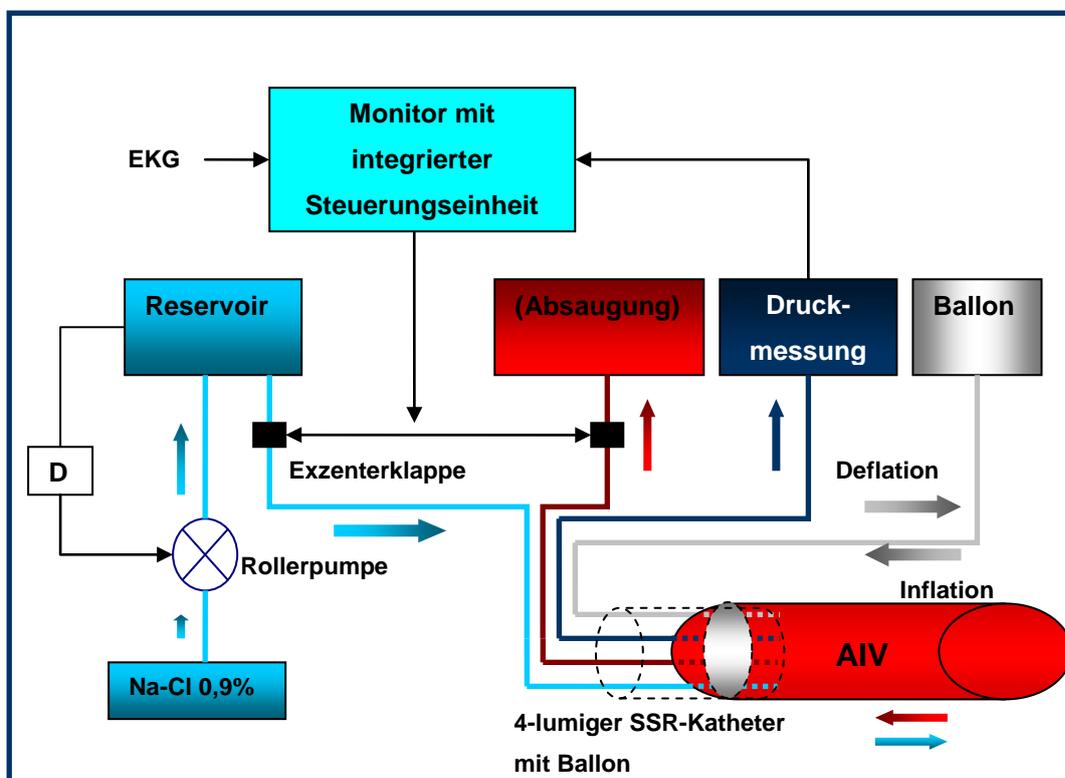
$I_{ref}$  = Fluoreszenzintensität in der Referenzblutprobe

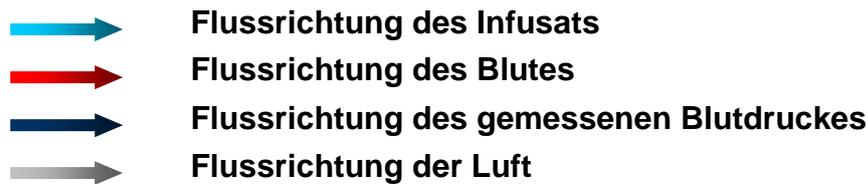
Im Anschluss erfolgte die Division der errechneten regionalen Blutflüsse durch das vor dem Verdau ermittelte Gewicht der einzelnen Myokardproben. Nach Paarweiser Mittelwertbildung der Myokardproben in absteigender Reihenfolge (RCx nach LAD) und anschließender in Bezugsetzung zum Mittelwert aller RCx-Werte, konnte der regionale myokardiale Blutfluss der LAD im prozentualen Verhältnis zur RCx berechnet und im Mittel dargestellt werden.

#### **2.4. Selektive druckregulierte Retroinfusion und Absaugung (SSR)**

Die SSR stellt eine von der Firma PTC Pro-Med Technology Consult GmbH, Mödling, ÖSTERREICH und P. Boekstegers entwickelte, auf Kathetertechnik basierende Methode zur selektiven druckregulierten Retroinfusion und Absaugung von Koronarvenen dar. Im Gegensatz zur unselektiven synchronisierten Retroperfusion (SRP) ist es mit der SSR möglich die regionale myokardiale Funktion während der Ischämie wesentlich effizienter aufrechtzuerhalten<sup>93</sup>. Sie ermöglicht eine regionale Applikation von Blut oder Therapeutika in das gewünschte koronar-venöse Zielgefäß, wobei durch die Druckregulierung des retrograden Blutflusses eine Anpassung an das individuelle koronar-venöse System mit einem Maximum an Effizienz und Sicherheit ermöglicht wird<sup>93</sup>. Dies vermindert Totraumvolumenverluste sowie das

Abfließen des Infusats in nicht ischämische Bereiche <sup>94</sup>. Dadurch bietet sie die Möglichkeit einer effektiven, regionalen Verteilung von Genvektoren und Medikamenten im ischämischen Myokard <sup>69</sup>. Durch einen am SSR-Katheter (MPK 002, PTC Pro-Med Technology Consult GmbH, Mödling, ÖSTERREICH) befindlichen Ballon, kann zusätzlich mittels Inflation der Blutfluss in der aufgesuchten Koronarvene herabgesetzt, und damit die Kontaktzeit des Medikaments auf das, durch die Koronarvene drainierte, ischämische Myokard erhöht werden. Dadurch lassen sich, im Vergleich zu einer systemischen Applikation, eine verbesserte Gewebefixierung und eine erhöhte myokardiale Konzentration des applizierten Therapeutikums im Zielareal erzielen <sup>68; 69</sup>. Zudem verbessert die SSR, im Vergleich zu einer antegraden Koronar-Applikation, die funktional relevante Perfusion der Kollateralen <sup>69</sup>. Daher stellt die SSR eine effiziente Methode zum perkutanen, transluminalen Gentransfer ins das Myokard dar <sup>95</sup>. Der Extrakorporalkreislauf der SSR besteht im Wesentlichen aus der EKG getriggerten Steuerungseinheit, einem Hochdruckreservoir mit vorgeschalteter Rollerpumpe und nachgeschalteter Exzenterklappe, einer Ballonpumpe, der Absaugereinheit, und dem Druckaufnehmer zur Druckmessung (> Abb. 16) <sup>96</sup>.

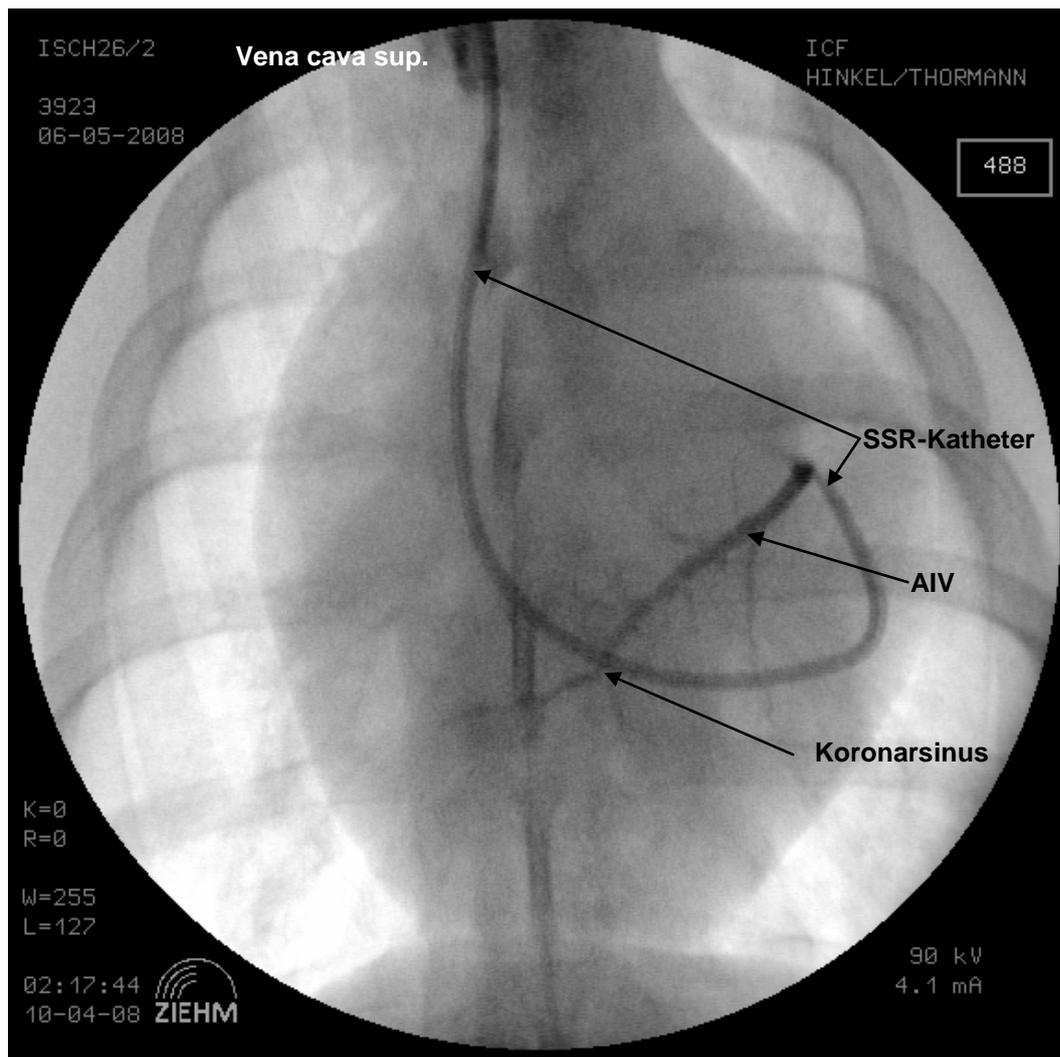




**Abb. 16** Schematische Darstellung der selektiven druckregulierten Retroinfusion und Absaugung (SSR).

In vorliegender Arbeit, lag das ischämische Myokard distal des ersten Diagonalastes (D 1) entlang der Left anterior descending artery (LAD). Dieses Gebiet wird durch die anteriore Herzvene (AIV) drainiert.

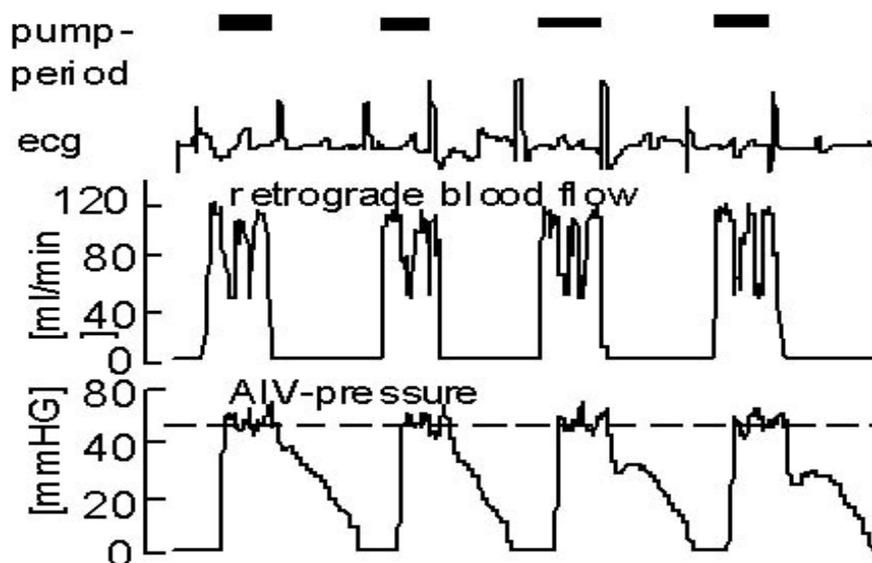
Um den SSR Katheter retrograd in der AIV zu platzieren, wurde zunächst ein 6 Fr. Amplatz-Katheter (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) in die in der Vena jugularis liegende 11 Fr. Schleuse (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) eingeführt und über den rechten Vorhof, durch die Trikuspidalklappe und die rechte Kammer in den Koronarsinus vorgelegt. Anschließend wurde ein 0,018“ Draht (Road Runner Extra Support, Cook Denmark Holding ApS, Bjæverskov, DÄNEMARK) nachgelegt und der Amplatz-Katheter gegen einen 6 Fr. Cournand-Katheter (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) gewechselt. Nun wurde der AIV-Abgang aufgesucht und der Draht bis über die Kurvatur hinweg in das Gefäß vorgeführt. Der Cournand-Katheter wurde unter stabiler Lagekontrolle des Drahtes entnommen und anschließend der deflatierte 4-lumige 7,8 Fr. SSR-Katheter über den Draht bis in die AIV vorgeführt und platziert. Durch kurze Balloninflation und anschließender Kontrastmittelapplikation (Imeron 350, Imeprol, Bracco Imaging, Konstanz DEUTSCHLAND) unter Röntgenkontrolle (Exposcop 8000, Ziehm GmbH, Nürnberg, DEUTSCHLAND) wurde die AIV bis zur Herzspitze mitsamt ihren Abgängen angiographisch dargestellt und auf Arterio-venöse Shunts und Unversehrtheit untersucht (> Abb. 17). Anschließend wurde der Ballon wieder deflatiert, der 18er Führungsdraht entfernt und der SSR-Katheter in der AIV belassen.



**Abb. 17** Prinzip der selektiven durchregulierten Retroinfusion in die AIV mit angiographischer Darstellung der AIV und Lageüberprüfung des SSR-Katheters.

An der druckregulierten Infusionseinheit der SSR wurde nun der Druckabnehmer gegen den Umgebungsluftdruck kalibriert und angespült. Die mittels Hochdruckreservoir gesteuerte Rollerpumpe beförderte das 0,9 % NaCl-Infusat (NaCl 0,9 % Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., DEUTSCHLAND) luftblasenfrei in das System. Es erfolgte eine Spülung (Flush) des Systems. Die Einstellung des frei wählbaren Reservoirvordruckes betrug 1250 mbar. Die Steuerung des Systems erfolgte bei autonomer Triggerung. Für die Parameter Verzögerung (Delay) wurde 10, für die Absaugung (Suction) 0, für die Pumpzeit (Pumptime) 80 und für das Intervall (Intervall) 1:10 vorgewählt. Es folgte die Konnektierung des Systems mit dem Katheter, so dass der Koronarvenöse Druck kontinuierlich am Monitor überwacht werden konnte. Nach Betätigung der Interventionstaste konnte mit der selektiven druckregulierten Retroinfusion begonnen werden. Die 4 Lumina des Katheters dienen der Infusion des Infusats ( $\beta$ ARK-ct-

AAV2/9-Konstrukt oder 0,9 % Natrium-Chlorid-Lösung), der Bestimmung des im Koronargefäß vorherrschenden Druckes (in mmHg) mittels Drucksensor sowie der Ballonin- bzw. -deflation. Eine Absaugung von Blut aus der AIV fand im Rahmen dieses Versuches nicht statt, da dies sonst eine Verdünnung der Virus-Vektorkonzentration zur Folge gehabt hätte. Die dem Reservoir nachgeschaltete Exzenterklappe steuerte den abgegebenen Infusat-Fluss in Abhängigkeit des intrakoronarvenösen Druckes. Überstieg der mittels Druckabnehmer gemessene AIV-Druck den Verschlussdruck um 20 mmHg, wurde der Retroinfusionsfluss abgeriegelt, wodurch zu hohe, schädliche Spitzendrücke unter der SSR vermieden wurden (> Abb. 18).



**Abb. 18** Monitorauszug der SSR unter selektiver, druckregulierter Retroinfusion mit Anzeige des Pumpintervalls, des EKG, des retrograden Blutflusses und des AIV-Drucks. Nach Boekstegers et al. JACC 1998.

## 2.5. Sonomikrometrie

Die Sonomikrometrie stellt eine etablierte Messmethode zur Bestimmung der regionalen kontraktiven Myokardfunktion dar, die als sensibler Parameter für eine Minderperfusion des Myokards gilt<sup>16; 97; 98</sup>. Bei der modifizierten Ultraschall-Laufzeit-Messmethode nach Bugge-Asperheim<sup>99</sup> werden dazu senkrecht zur langen Herzachse und parallel zu den Myokardfasern, paarweise piezoelektrische Ultraschallkristalle in einem Abstand von 1,5-2 cm ins Myokard des linken Ventrikels implantiert<sup>78; 94; 100; 101; 102; 103; 104</sup>. Mittels der Ultraschallkristalle, die gleichzeitig als

Sender und Empfänger (= Transceiver) fungieren, können nun anhand der Veränderung der Ultraschalllaufzeit die Segmentverkürzungen während der Kontraktionszyklen des Herzens gemessen und graphisch dargestellt werden (> Abb. 19 und 20). Dabei ist die Verringerung der Segmentverkürzung abhängig von dem Ausmaß der ischämischen Schädigung bzw. Infarzierung des jeweiligen Myokardabschnitts. Die 0,7 mm großen, mit Epoxidharz verkleideten (2 mm x 1,5 mm) piezoelektrischen Kristalle<sup>105</sup> senden dazu alternierend ein Signal mit einer Frequenz von 1 MHz oder mehr aus. Dieses Signal setzt sich in biologischem Gewebe mit einer Geschwindigkeit von 1540 m/s fort und wird nach einer Laufzeit von 0,012-0,024 ms vom Empfängerkristall aufgenommen und an das digitale Ultraschallmesssystem (TRX Series 6 Transceiver, Sonometrics Corporation, London, CANADA) weitergeleitet. Mittels des auf einem Personal Computer (IBM Pentium 200 MHz, Sonometrics Corporation, London, CANADA) installierten Programms (CardioSOFT™ Version 3.4.50, Sonometrics Corporation, London, CANADA) erfolgte die Umwandlung der sich proportional zum Kristallabstand ändernden Laufzeit der Ultraschallsignale und die graphische Darstellung nach folgender Formel:

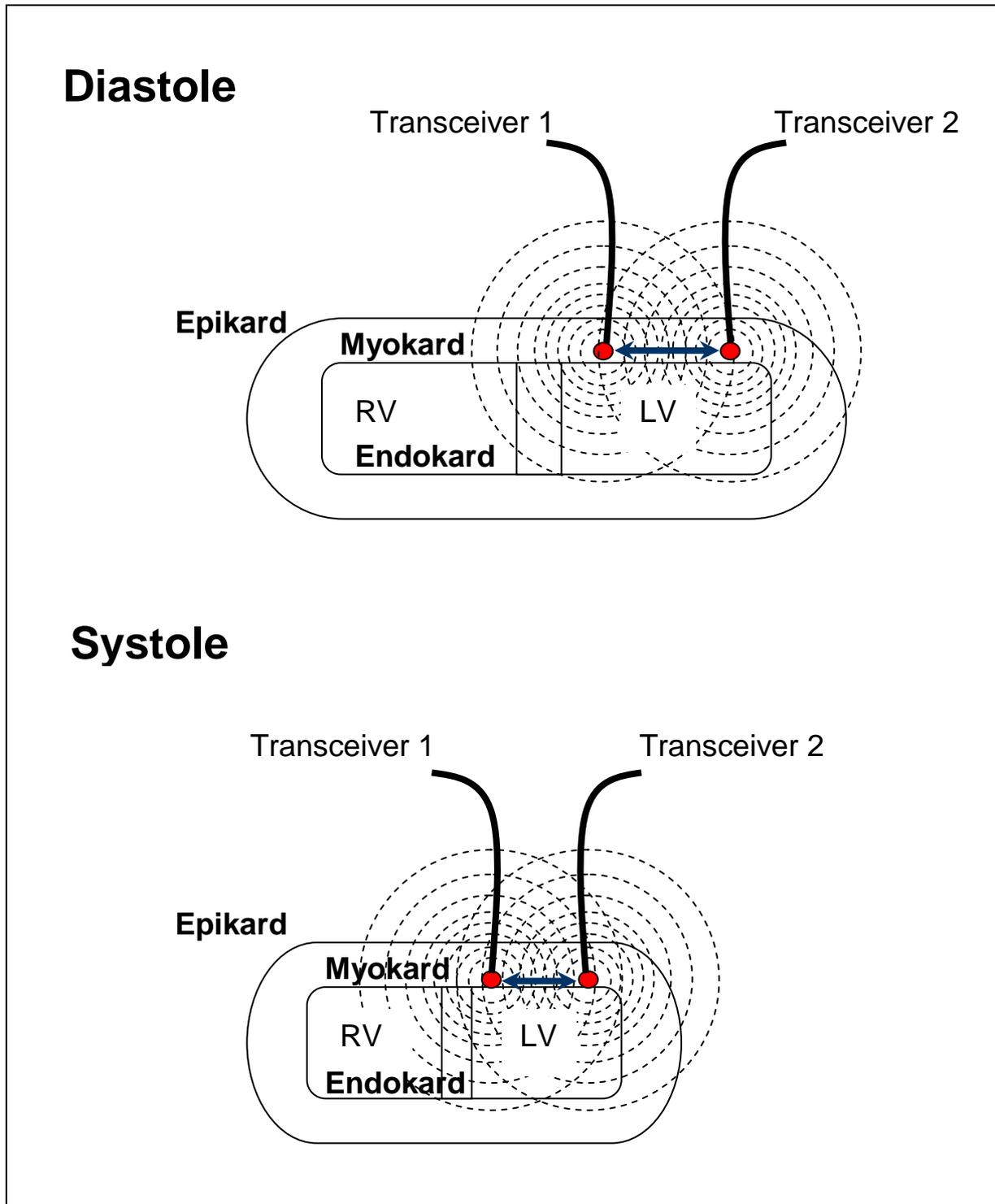
**Formel 3:**

$$s = v \cdot t$$

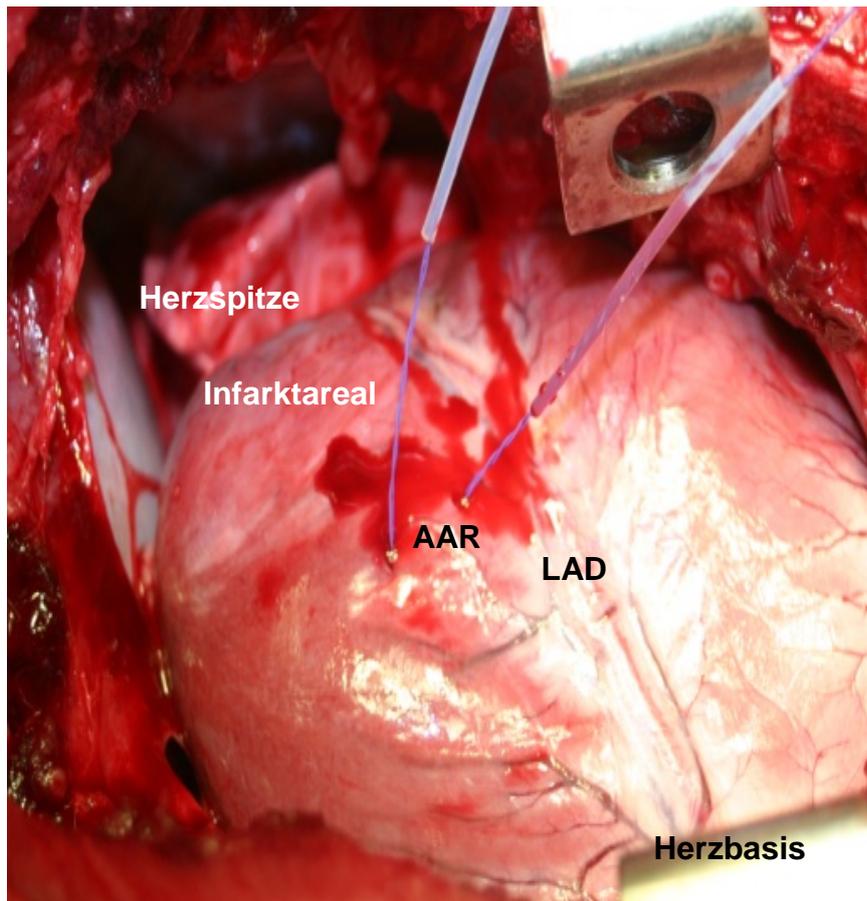
**s** = Strecke zwischen den beiden Kristallen,

**v** = Schallausbreitungsgeschwindigkeit im Myokard,

**t** = Laufzeit des Ultraschallsignals



**Abb. 19** Schematische Darstellung der piezoelektrischen Ultraschallkristalle im Myokard zum Zeitpunkt der Diastole (= enddiastolische Länge (EDL)) und der Systole (= endsystolische Länge (ESL)). RV = rechter Ventrikel, LV = linker Ventrikel.



**Abb. 20** Piezoelektrische Ultraschallkristalle im Myokard der AAR.

Die sonomikrometrische Messung der Segmentverkürzung (SES) erfolgte in vorliegender Studie am Versuchstag 56. Nach vorangegangener medianer Sternotomie und erfolgter Eröffnung des Perikards, wurden 2 Stichinzisionen (Disposable Scalpel No. 11, Feather Safety Razor Co., JAPAN) senkrecht zur langen Herzachse und parallel zu den Myokardfasern oberflächlich ins Myokard gesetzt. Es folgte die paarweise Implantation der piezoelektrischen Ultraschallkristalle, 1 cm unterhalb der ursprünglichen LAD-Okklusionsstelle, ins Myokard der Area At Risk (AAR). Zur Interferenzvermeidung wurde ein Abstand zwischen den Kristallen von 1,5-2 cm eingehalten. Nach erfolgter Messung unter Baseline und Reservebedingungen (rechts atrialem Pacing mit gesteigertem Sauerstoffbedarf bei 80, 100, 120 und 140 Schlägen/min.) erfolgte die oben geschilderte Kristallimplantation und Messung der SES auch im Infarktareal (ca. 3 cm unterhalb der ursprünglichen LAD-Okklusionsstelle) sowie im Bereich des nichtischämischen Kontrollgebietes des Ramus circumflexus der linken Koronararterie (Herzhinterwand). Zusätzlich zur sonomikrometrischen Abstandsmessung erfolgte die kontinuierliche Aufnahme (IBM Pentium 200 MHz, Sonometrics Corporation,

London, CANADA) des arteriellen Drucks, des linksventrikulären Drucks (Leycom Sigma-5DF, Cardiodynamics, Zoetermeer, NIEDERLANDE) und die Ableitung eines Elektrokardiogramms.

Zu Auswertungszwecken wurde die Segmentverkürzung als prozentuale Veränderung der Segmentlänge (% SS) nach der folgenden Formel von Harada et al. berechnet<sup>101</sup>:

**Formel 4:**

$$\% \text{ SS} = (\text{EDL} - \text{ESL}) / \text{EDL} \times 100$$

**SS** = Segmentverkürzung

**EDL** = Enddiastolische Länge = der Moment an dem die Druckerhöhungsgeschwindigkeit des linksventrikulären Druckes (dLVP/dt) gerade noch null beträgt

**ESL** = Endsystolische Länge = Zeitpunkt des maximalen Abfalls des linksventrikulären Druckes (dLVP/dt min)

Pro Messzeitpunkt wurden jeweils fünf Werte bestimmt und die Mittelwerte in Formel 4 eingesetzt.

## 2.6. BNP (Brain Natriuretic Peptide)

Die Höhe der BNP-Konzentration wurde an den Versuchstagen 0, 14 und 56 aus dem Blutserum bestimmt. Dazu wurde den Tieren unter standardisierten Bedingungen venöses Blut aus der in die Vena jugularis eingebrachten 11 F Schleuse (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) entnommen und in einem Serumgefäß (S-Monovette, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nürnberg, DEUTSCHLAND) für 30 Minuten aufrecht stehen gelassen. Nach vollständigem Ablauf der Gerinnung wurden die Proben für 10 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Hettich Rotanta K, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DEUTSCHLAND) und anschließend bei -80°C (Heraeus Hera freeze HFU 2585 SI Basic, Heraeus Holding GmbH, Hanau, DEUTSCHLAND) bis zur Analyse konserviert. Die BNP-Analysen wurden für vorliegende Arbeit mit dem Enzyme

Immunoassay Kit (BNP-26, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, USA) vorgenommen. Die Durchführung des Immunoassays erfolgte nach dem offiziellen „General protocol for Enzyme Immunoassay Kit“ der Firma Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Burlingame, CA, USA. Die BNP-Serumkonzentrationen wurden im Anschluss durch photometrische Messung (anthos reader HT III, anthos Mikrosysteme GmbH Krefeld, DEUTSCHLAND) bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

## 2.7. Infarktgrößenbestimmung

Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte anhand der Schnitt-Photographien mit Hilfe des Programms ImageJ (Image Processing Analysis in Java Wayne Rasband at the Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA (rsb.nih.gov/ij/)). Dazu wurde zunächst, durch Ermittlung des maximalen Ventrikelumfanges und des Lumens, die Gesamtfläche des linken Ventrikels erfasst. Anschließend wurde das Infarktareal anhand seiner bindegewebigen Struktur sowie der negativen Vitalfärbung durch TTC (2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND) bestimmt. Die AAR konnte zum einen aufgrund der positiven TTC-Vitalfärbung vom Infarktgewebe und zum anderen durch die Methylenblau-Vitalfärbung (LÖFFLERS Methylenblaulösung, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND) vom intakten und nicht ischämischen Gewebe abgegrenzt werden (> Abb. 21). Die Berechnung des Flächenanteils des Infarkts in Prozent am linken Ventrikelmyokard erfolge anschließend nach der Formel <sup>104</sup>:

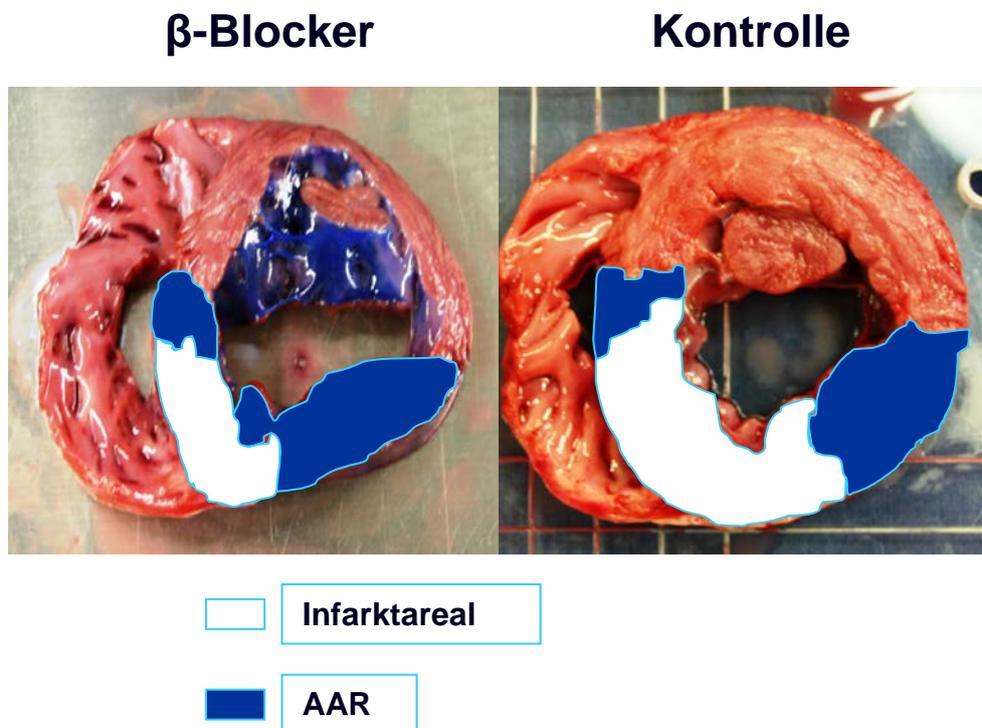
### Formel 5:

$$\frac{\text{Fläche des Infarktareals} \times 100}{\text{(Fläche des linken Ventrikels - Lumen)}}$$

bzw. für die Berechnung des Flächenanteils der AAR am linken Ventrikelmyokard dementsprechend:

**Formel 6:**

$$\frac{\text{Fläche der Area at Risk} \times 100}{\text{(Fläche des linken Ventrikels - Lumen)}}$$



**Abb. 21** Beispielhafte Darstellung für die AAR- und Infarktgrößenbestimmung mittels ImageJ am Beispiel eines Tieres aus der β-Blocker- und aus der Kontrollgruppe. Das Infarktareal ist weiß dargestellt, die AAR blau.

## 2.8. Gel- und Pufferzusammensetzungen für den Western Blot

<u>Gel</u>	<u>Substanzen</u>	<u>Volumina</u>
<b>Laufgel</b> <b>(10 %)</b>	30 % AA-bis-AA ProtoGel (30 % Acrylamid/Methylen Bisacrylamid-Lösung, National Diagnostics, Atlanta, USA)	6,4 ml
	1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (pH 8,8) (PUFFERAN <sup>®</sup> , ≥ 99,3 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND)	7,5 ml (pH 6,8)
	H <sub>2</sub> O	5,55 ml
	20 % Sodium n-Dodecyl-Sulfat 20 % Lösung (SDS, Merck KGaA, Darmstadt, DEUTSCHLAND)	100 µl
	10 % Ammoniumperoxidsulfat-Lösung (APS, Merck KGaA, Darmstadt, DEUTSCHLAND)	400 µl
	Tetramethylethylendiamin (Temed, Merck KGaA, Darmstadt, DEUTSCHLAND)	15 µl
<b>Sammelgel</b> <b>(4 %)</b>	30 % AA-bis-AA ProtoGel (30 % Acrylamid/Methylen Bisacrylamid-Lösung, National Diagnostics, Atlanta, USA)	1,3 ml
	1 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (pH 8,8) (PUFFERAN <sup>®</sup> , ≥ 99,3 %, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND)	1,25 ml

H <sub>2</sub> O	7,2 ml
20 % Natrium n-Dodecyl-Sulfat 20 % Lösung (SDS, Merck KGaA, Darmstadt, DEUTSCHLAND)	50 µl
10 % Ammoniumperoxidsulfat-Lösung (APS, Merck KGaA, Darmstadt, DEUTSCHLAND)	200 µl
Tetramethylethyldiamin (Temed, Merck KGaA, Darmstadt, DEUTSCHLAND)	10 µl

<u>Puffer</u>	<u>Substanzen und Einwaagen</u>	<u>Endvolumina</u>
<b>Lämmli-puffer</b>	140 mM TrisHCl pH7, 30 % Glycin, 4 % SDS (jeweils Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND), 16 % Beta-Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau (jeweils Sigma-Aldrich <sup>®</sup> , St. Louis, USA)	auf 10 ml H <sub>2</sub> O
<b>Laufpuffer</b>	Tris-Base 3,03 g, Glycine 14,4 g, SDS 1,0 g (jeweils Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND)	auf 1 Liter H <sub>2</sub> O
<b>Blottingpuffer</b>	Tris-Base 3,03 g, Glycine 14,4 g und 200 ml Methanol (jeweils Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND)	auf 1 Liter H <sub>2</sub> O

**Anmerkung:** Alle Stammlösungen wurden eigens im Labor angesetzt

## 2.9. Western Blot (Molekulargenetischer Nachweis der Proteinsynthese nach erfolgreicher Transduktion)

Der Western- oder auch Immuno-Blot genannt, ist eine allgemein anerkannte Methode zum Nachweis von Proteinen <sup>71, 106; 107; 108</sup>.

### 2.9.1. Gelherstellung

Für die Western Blot-Analyse wurde zunächst ein 10-prozentiges Laufgel (10-150 kDa) und ein 4-prozentiges Sammelgel nach zuvor beschriebener Zusammensetzung hergestellt. Das Laufgel (ProtoGel 30 % Acrylamid/Methylen Bisacrylamid-Lösung, National Diagnostics, Atlanta, USA) wurde gegossen, wobei Tetramethylethyldiamin (Temed, Merck, Darmstadt, DEUTSCHLAND) erst zum Schluss hinzugegeben wurde. Anschließend erfolgte eine Überschichtung mit Isopropanol (2-Propanol zu Analysezwecken, Merck, Darmstadt, DEUTSCHLAND). Nach Verfestigung des Gels konnte das Isopropanol nun mit H<sub>2</sub>O gewaschen, und das Gel mit Filterpapier (Whatman<sup>®</sup> 3 mm Chor, Whatman, Maldstone, ENGLAND) getrocknet werden. Anschließend wurde das Sammelgel über das Laufgel geschichtet und der Kamm eingesetzt.

### 2.9.2. Probenaufbereitung und Western Blot

100 g einer Gewebeprobe wurden mittels Ultra Turrax S 25 N (Ultra Turrax, IKA<sup>®</sup>-Werke GmbH & Co. KG, Janke & Kunkel, Staufen, DEUTSCHLAND) dispergiert. Davon wurden 60 µg Proteinlysate auf 15 µl mit Probenpuffer aufgefüllt und danach mit 3 µl Lämmli-Puffer (140 mM TrisHCl pH7, 30 % Glycin, 4 % SDS, 16 % Beta-Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau auf 10 ml) versetzt und somit auf ein Endvolumen von 18 µl pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 3 min. bei 95 °C erhitzt. Danach erfolgte das Einpipettieren der Proben sowie 10 µl eines Kontrollmarkers (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in die Geltaschen und der Einsatz des Gels in die mit Lauf-Puffer (Tris-Base 3,03 g, Glycine 14,4 g, SDS 1,0 g auf 1 Liter H<sub>2</sub>O) befüllte Kammer (Mini Protean 3-Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Diese wurde nun für 10 min. bei 95 V und anschließend bei 135 V bis zur völligen Auftrennung weiter laufen gelassen.

Danach wurden die Schwämmchen (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), die Membran (Immobilon P Millipore, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) und das Filterpapier (Whatman<sup>®</sup> 3 mm Chor, Whatman, Maldstone, ENGLAND) in Blotting-Puffer getränkt. Nach dem Beschriften der Membran wurde das Gel ebenfalls in Blotting-Puffer gelegt und anschließend die Sandwich-Klemme (Bio-Rad Protean 3-Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit der schwarzen Seite nach unten, wie folgt schichtweise von unten nach oben befüllt: Schwämmchen, 2 Whatman<sup>®</sup>-Filterpapiere, Blotting-Gel (Taschen abgeschnitten), Membran (zuvor 10 sec. in Methanol gebadet), 2

Whatman®-Filterpapiere, Schwämmchen. Nach der Befreiung von Luftblasen mittels einer über das Sandwich gerollten Pipette, wurde die Sandwich-Klemme fixiert und in die Kammer mit dem bei 4°C gekühlten Blotting-Puffer gefüllt. Die Laufzeit betrug 50 min. bei 100 V. Danach wurde die Membran entnommen, kurz in PBS gewaschen und in 5 % Milch (Magermilchpulver Roth, Karlsruhe, DEUTSCHLAND) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) + Tween® (Tween® 20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) 0,01 % bei Raumtemperatur eine Stunde geblockt. Der primäre, polyklonale Rabbit-Antikörper (Santa Cruz GRK-2 (C15) sc 562, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) wurde nun über Nacht bei 4°C in einer Konzentration von 1:500 mit 5 % Magermilch inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgten 2 kurze und 2 zehnminütige Waschungen der Membran in PBS + Tween 0,01 %. Danach wurde die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5 % Magermilch mit dem sekundären Antikörper (AK) Goat-Anti-Rabbit IgG HRP Conjugate ZYMED (ZyMay™, Zymed Laboratories, South San Francisco, USA) inkubiert. Anschließend wurde nochmals kurz nur mit PBS gewaschen und ECL (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) zu gleichen Teilen angesetzt und 1 min. einwirken gelassen. Es folgte die Filmentwicklung im Entwickler (Cerox 60, AGFA HealthCare, Köln, DEUTSCHLAND) mit (CL-XPosure™-Film Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Die Auswertung der Bandendicke erfolgte mittels des Gel-Dokumentationssystems Gel Doc 2000 (Gel Doc 2000, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) und dem Programm Quantity One 4.1.1.

Um die gleiche Ladung der Proteine zu überprüfen, wurde der Blot mit Stripping-Puffer (Restore™ Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) gestrippt und die Membran mit Aktin (Santa Cruz SC 1615, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) als primären und Donkey-Anti-Goat IgG HRP (Santa Cruz S2020, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) als sekundärem Antikörper inkubiert.

### **2.10. Narkoseeinleitung, Narkosefortführung und Überwachung**

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Narkose- bzw. Aufwachbox im Tierstall des Walter Brendel Zentrums für Experimentelle Medizin. Mittels Bolusinjektion von Azaperone 10mg/kg KG (Stresnil®, Janssen-Cilag, Neuss, DEUTSCHLAND), 0,5 mg Atropinsulfat (Atropinsulfat Braun®, B. Braun, Melsungen, DEUTSCHLAND) und Ketamin 20 mg/kg KGW (Ketavet® 100 mg/ml, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin,

DEUTSCHLAND) wurde die Narkose eingeleitet. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde den Tieren in eine Ohrtrandvene mittels Braunüle (22G (0,9 x 25 mm) Introcan Safety-W<sup>®</sup>, B. Braun AG Melsungen, DEUTSCHLAND) ein intravenöser Zugang gelegt. Die Narkosefortführung erfolgte durch Applikation von 5 mg Midazolam (0,2 mg/kg/KGW) (Dormicum<sup>®</sup>, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, SCHWEIZ) und 0,05 mg Fentanyl (0,002 mg/kg/KGW) (Fentanyl<sup>®</sup>-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, DEUTSCHLAND). Anschließend wurden die Tiere endotracheal intubiert (Lo-Contour Magill, Mallinckrodt Medical, Athlone, IRLAND) und unter Beatmung mittels Handbeatmungsbeutel (Laerdal Silikon-Beatmungsbeutel Laerdal Medical GmbH, Puchheim, DEUTSCHLAND) in den OP verbracht. Hier wurden die Tiere mit dem Rücken auf den OP Tisch platziert und durch Ausbinden der Vordergliedmaße fixiert. Die Narkose wurde durch Kombination einer Inhalationsnarkose mit einer intravenösen Injektionsnarkose fortgeführt. Die Inhalationsnarkose erfolgte mittels Sauerstoff und Druckluft über den Ventilator (Siemens Elema Servo Ventilator 900C, Siemens Elema AB, Solna, SCHWEDEN), unter Beimischung von 0,6-1,2 % Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott, Illinois, USA) und Verdampfung mittels Vaporisator (Siemens-Eléma 952 Servo Ventilator, Siemens-Eléma AB, Solna, SCHWEDEN). Das Beatmungsvolumen wurde zunächst dem Gewicht des Tieres, und im Verlauf des Eingriffs anhand der arteriellen Blutgasanalyse angepasst. Anzustrebende arterielle Blutgaswerte waren hierbei: pH: 7,3-7,5, pO<sub>2</sub>: 100-180 mmHg, pCO<sub>2</sub>: 35-45 mmHg. Die Injektionsnarkose mit Propofol 2 % (Propofol<sup>®</sup> MCT Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., DEUTSCHLAND) wurde mit einem Flow von 100 mg/h mittels Perfusor (Perfusor<sup>®</sup> Secura B. Braun AG, Melsungen, DEUTSCHLAND) intravenös appliziert. Die Herztätigkeit wurde permanent mittels EKG (Siemens Sirecust 304 D, Siemens AG, München, DEUTSCHLAND) überwacht und über 3 Klebelektroden nach Einthoven abgeleitet. Nach Einführung einer 9 Fr.-Katheterschleuse (Cordis Corporation, Miami, FL, USA) in die rechte, bzw. linke A. carotis interna konnte der blutige Blutdruck über einen Druckabnehmer (Statham Transducer P23 ID Statham Instruments, Inc., Oxnard, CA, USA und Hellige-Monitor, Freiburg, DEUTSCHLAND) kontinuierlich gemessen werden. Ein kontinuierliches Monitoring der Körpertemperatur erfolgte mittels rektaler Temperatursonde. Puls und Sauerstoffsättigung wurden mittels Pulsoxymeter (Ohmeda BIOX 3700e, Louisville, CO, USA) überwacht.

## **2.11. Intraoperativ eingesetzte Medikamente**

Neben den zur Narkoseeinleitung und -fortführung verwendeten Medikamenten kamen noch folgende zum Einsatz:

### **2.11.1. Infusionen**

Die Tiere erhielten intraoperativ zur Volumenaufrechterhaltung kontinuierlich isotonische (0,9 %ige) Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., DEUTSCHLAND) infundiert. Dieser waren pro 500 ml Infusionsflasche je 1 Ampulle Mg<sup>2+</sup> (Magnesiocard<sup>®</sup> 3 mmol Injektionslösung, Verla-Pharm Arzneimittel, Tutzing, DEUTSCHLAND) und 1 Ampulle Amiodaronhydrochlorid (Amiodaronhydrochlorid Hexal<sup>®</sup> 150 mg/3 ml, Hexal AG, Holzkirchen, DEUTSCHLAND) beigemischt.

Magnesium besitzt eine kardioprotektive Wirkung. Es fungiert als Muskelrelaxans, stabilisiert das Ruhepotential der erregbaren Herzmuskelzellen und steuert die Erregungsübertragung zwischen Nerven und Muskeln. Ferner beugt es Herzrhythmusstörungen vor und ist in der Lage Reperfusionsarrhythmien zu hemmen.

Das Antiarrhythmikum Amiodaron besitzt eine hemmende Wirkung auf ventrikuläre und supraventrikuläre Herzrhythmusstörungen.

HES 6 % (Hydroxyethylstärke 6 % Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., DEUTSCHLAND) wurde als kolloidaler Volumenersatz bei Blutverlust und zur Verbesserung der kapillären Mikrozirkulation intraoperativ infundiert.

### **2.11.2. Antikoagulantien**

Die distale Ligation der Zugangsgefäße sowie die 90 min. Ischämie und die damit einhergehende Veränderung des Blutflusses in der LAD erforderten eine ausreichende Antikoagulation. Den Tieren wurden daher intraoperativ 10000 IE Heparin (Ratiopharm, Ulm, DEUTSCHLAND) intravenös verabreicht.

### **2.11.3. Dobutamin-Stressmessung (Dobutamin-Belastungstest)**

Das Racemat Dobutamin ist ein sympathomimetisch wirkendes Catecholamin, dass sowohl die  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - als auch die  $\alpha$ -adrenergen Rezeptoren stimuliert<sup>5</sup>. Die scheinbar selektive Herzwirkung kommt durch ein Zusammenspiel der unterschiedlichen Wirkungen der (+)- und (-)-Enantiomere des Dobutamins zustande. (+)-Dobutamin ist

ein  $\alpha_1$ -Antagonist und ein nichtselektives  $\beta_1/\beta_2$ -Sympathomimetikum. (-)-Dobutamin besitzt hingegen eine starke  $\alpha_1$ -mimetische Wirkung, bei gleichzeitig schwacher  $\beta$ -Rezeptorwirkung. Durch Kombination beider Entantiomere zum  $\pm$  Dobutamin, werden die  $\alpha$ -Wirkungen aufgehoben und die  $\beta_2$ -mimetische Wirkung des (+)-Enantiomers durch die  $\alpha$ -agonistische Wirkung des (-)-Enantiomers antagonisiert<sup>18</sup>. Durch seine Wirkung an den  $\beta_1$ -Rezeptoren kommt es zu einer Steigerung der Kontraktilität und des Herzzeitvolumens (HZV) bei gleichzeitig geringer vasokonstriktorischer und positiv chronotroper Wirkung<sup>5</sup>. Ziel des Dobutamin-Belastungstests ist die Beurteilung der linksventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt. Zudem können unter Belastung auftretende Wandbewegungsstörungen detektiert und die regionale Myokardfunktion mittels myokardialer Vitalitätsdiagnostik (Late-Enhancement-Messung) im Magnetresonanztomographen (MRT) analysiert werden.

Für die Dobutamin-Stressmessung wurde ein 6 Fr.-Conductance-Katheter (Millar pressure tip catheter SPC 560, Millar Instruments, Texas, USA) unter Röntgenkontrolle über den arteriellen Zugang (Exposcop 8000, Ziehm GmbH, Nürnberg, DEUTSCHLAND) in den linken Ventrikel vorgeführt, wobei die Katheterspitze im Apexbereich des linken Ventrikels zum liegen kam. Nun erfolgte eine perfusorgesteuerte i.v. Dobutaminapplikation in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . über 5 min. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) sowie der  $dp/dt$  konnte nun durch Aufzeichnung der Ventrikeldruckkurve (CardioSOFT™ Version 3.4.50, Sonometrics Corporation, London, CANADA) gemessen werden. Danach wurde die Dosis für 3 min. auf 10, 20 bzw. 40  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . gesteigert und die Ventrikeldruckkurve mittels des o.g. Programms aufgezeichnet.

#### **2.11.4. $\beta$ -Rezeptoren-Blocker ( $\beta$ -Adrenolytica/ $\beta$ -Sympatholytica)**

In vorliegendem Versuchsmodell wurde Bisoprolol (Concor® Merck Serono GmbH, Darmstadt, DEUTSCHLAND) als  $\beta$ -Rezeptoren-Blocker eingesetzt. Die orale Bisoprolol Applikation erfolgte einmal täglich, morgens auf nüchternen Magen. Dabei lag die Initialdosis in der 1. Woche bei 1,25 mg/Tier/Tag, die Erhaltungsdosis ab der 2. Woche bei 2,5 mg/Tier/Tag. Diese wurde bis zum Versuchsende beibehalten.

### **2.11.5. Antibiose**

Zur Infektionsprophylaxe wurde den Tieren am 1. (d 0) und 2. (d 14) Versuchstag intraoperativ 750 mg/Tier Cefuroxim-Natrium (Cefuroxim-saar<sup>®</sup>, Cephsaar Chem. Pharm. Fabrik GmbH, St. Ingbert, DEUTSCHLAND) intravenös appliziert.

### **2.11.6. Muskelrelaxantien**

Am 3. Versuchstag wurden vor der Sternotomie 4 mg Pancuroniumbromid (Pancuronium-Inresa<sup>®</sup>, 4 mg/2 ml N2, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, DEUTSCHLAND) pro Tier i.v. als Muskelrelaxans appliziert.

### **2.11.7. Opioide**

Das synthetische Opioid Fentanyl (Fentanyl<sup>®</sup>-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, DEUTSCHLAND) wurde ebenfalls vor Beginn der Sternotomie in einer Dosis von 0,1 mg pro Tier i.v. verabreicht.

## **2.12. Notfallmedikamente/Defibrillator**

Für den Fall einer ventrikulären Tachykardie oder eines Kammerflimmerns (VF) wurde das betroffene Tier sofort mit 100 % Sauerstoff versorgt und mit 360 Joule monophasisch defibrilliert (Theracard 361 D, Siemens AG, Erlangen, DEUTSCHLAND). Es folgte die Applikation von Adrenalin (Suprarenin<sup>®</sup>, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, DEUTSCHLAND) 1:10 verdünnt. Zusätzlich wurde eine Herzdruckmassage im Rhythmus von 60 Druckstößen/min. durchgeführt. Bei persistierender VF/pulslose VT wurden zusätzlich 300 mg Amiodaron als Bolus i.v. appliziert. Alternativ blieb Lidocain 1 mg/kg (max. 3 mg/kg innerhalb 1 Stunde).

## **3. Versuchsbeschreibung und Protokoll**

### **3.1. Chronisches Ischämie-/Reperusionsmodell**

#### **3.1.1. Versuchstag 0: Hämodynamische Messungen und Infarktinduzierung**

### **3.1.1.1. Präparation und angiographische Darstellung des LV**

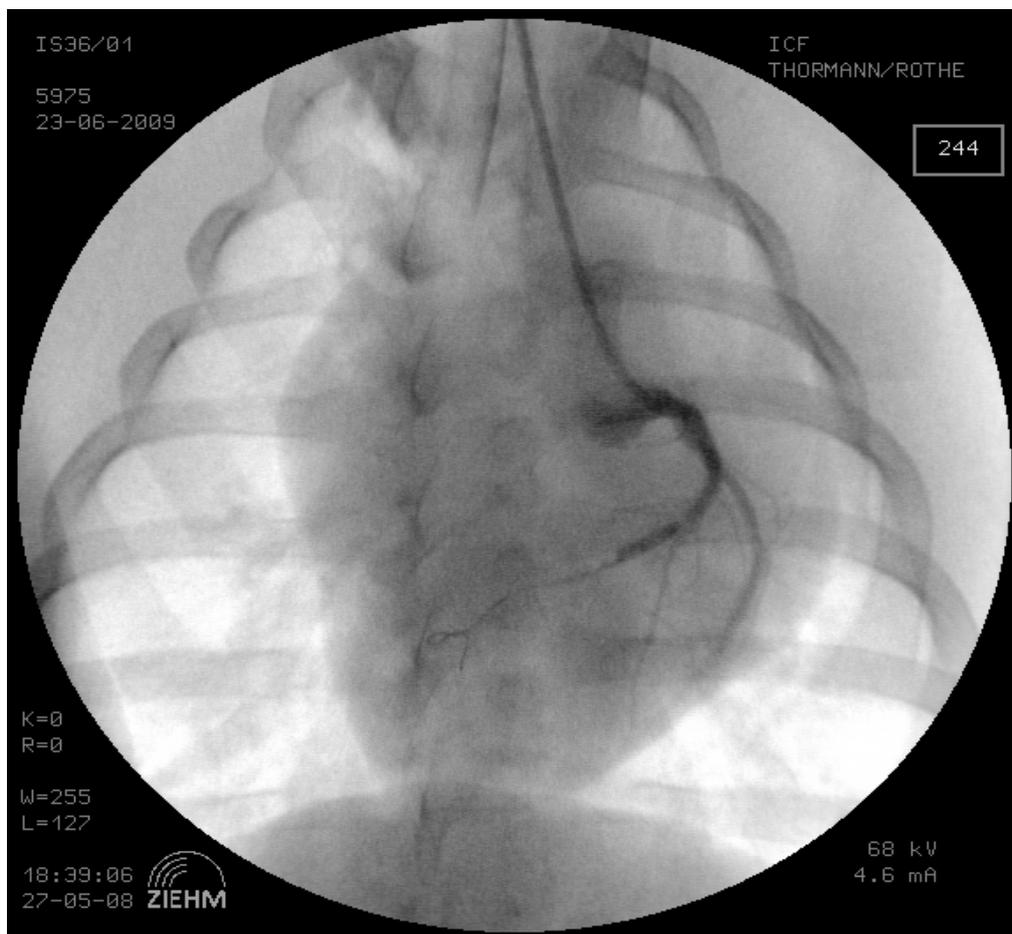
Am Versuchstag 0 wurden die Tiere, wie in unseren anderen Studien zuvor, narkotisiert und präpariert<sup>109; 110; 111</sup>. Dazu wurde nach zuvor beschriebener Narkoseeinleitung und -fortführung (siehe Punkt 2.10.) mittels Elektrokauter zunächst ein ca. 3 cm langer Schnitt von kranial nach kaudal, medial des rechten M. sternocleidomastoideus geführt. Nach stumpfer Präparation und kranialer Ligation (2 Ethibond Excel Sutupak 6 x 45 cm, EH6447, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DEUTSCHLAND) wurde eine 9 Fr. Schleuse (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) in die rechte A. carotis interna und eine 11 Fr. Schleuse (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) in die rechte V. jugularis externa eingelegt. Nach Fixation der Schleusen konnte nun ein Pigtail Katheter (PIG Super Torque<sup>®</sup> Plus, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) unter Durchleuchtung (Exposcop 8000, Ziehm GmbH, Nürnberg, DEUTSCHLAND) über die arterielle 9 Fr. Schleuse bis in den linken Ventrikel vorgeführt und platziert werden. Mittels Kontrastmittelapplikation (Imeron 350, Imeprol, Bracco Imaging, Konstanz, DEUTSCHLAND) erfolgte eine RAO-60 Projektion unter Ruhepulsbedingungen (Baseline), mittels derer später die Ejektionsfraktion bestimmt werden konnte. Im Anschluss wurde ein Herzschrittmacher im rechten Vorhof platziert und die angiographische Darstellung im gleichen Projektionswinkel unter Stimulation (130 Schläge/min) wiederholt. Der Pigtail-Katheter wurde anschließend aus dem LV entfernt.

### **3.1.1.2. Messung der globalen Myokardfunktion (Conductance Messung)**

Zur Bestimmung des LVEDP bzw. des  $dLVP/dt$ , der ersten Ableitung nach der Zeit, wurde nun ein Conductance Katheter (Millar pressure tip catheter SPC 560, Millar Transducer Control Unit MIL-TC-510, Millar Instruments, Texas; USA) in den Herzspitzenbereich des LV eingelegt. Der LVEDP wurde unter Ruhebedingungen und unter rechtsatrialem Pacing, zur Bestimmung der funktionellen Reserve, mit einer Stimulationsfrequenz von 130 Schlägen/min anhand der mittels CardioSoft, (CardioSOFT<sup>™</sup> Version 3.4.50, Sonometrics Corporation, London, CANADA) aufgezeichneten Ventrikeldruckkurve gemessen. Es folgte die Entnahme des Katheters und des Pacerkabels aus dem linken Ventrikel bzw. dem rechten Vorhof des Herzens.

### 3.1.1.3. Infarktinduzierung

Mit einem 7 Fr. Judkins-Rechts-Katheter (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) wurde unter C-Bogen-Röntgenkontrolle (Exposcop 8000, Ziehm GmbH, Nürnberg, DEUTSCHLAND) der linke Hauptstamm aufgesucht und mittels Kontrastmittelapplikation (Imeron 350, Imeprol, Bracco Imaging, Konstanz, DEUTSCHLAND) dargestellt. Daraufhin wurde ein 0,014“ Führungsdraht (Road Runner Extra Support, Cook Denmark Holding ApS, Bjæverskov, DÄNEMARK) über den zuvor platzierten Judkins-Rechts-Katheter in die LAD vorgeschoben. Dabei kam der Draht mit der Spitze im distalen Teil der LAD zum liegen. Über den Draht wurde nun ein 12/3.0 PTCA-Ballon (Quantum™ Maverick® Monorail Ballon Katheter Boston Scientific, Natick, MA, USA) in der LAD (left anterior descending coronary artery oder Ramus interventricularis anterior) distal des 1. Diagonalastes (D 1) platziert. Es folgte die Inflation des Ballons mit einem In-/Deflator (Sedat Dolphin, Sedat, Irigny FRANKREICH) auf 7 atm. Die anschließende Überprüfung auf korrekte Lage und Perfusion oberhalb der Okklusionsstelle bzw. Nicht-Perfusion im Bereich, und distal des Ballons erfolgte mittels Koronarangiographie (> Abb. 22).



**Abb. 22** Angiographie mit Okklusion der LAD distal des D1.

Nach erfolgreicher Prüfung konnte der 0,014“ Führungsdraht entfernt, und der mittels Ballon erfolgte Gefäßverschluss für 90 min. aufrechterhalten werden. Der 7 Fr. Judkins-Rechts-Führungskatheter wurde für diesen Zeitraum aus dem linken Hauptstamm auf Höhe der Aortenwurzel zurückgezogen, um eine zusätzliche Belastung durch Perfusionsreduktion im Bereich der Herzkranzgefäße zu vermeiden. Nach 90 minütiger Ischämie erfolgte die Ballondeflation. Dieser wurde nun entfernt und eine Abschlussdarstellung der LAD mittels Kontrastmittelapplikation durchgeführt, um einen evtl. Koronarspasmus ausschließen zu können.

#### **3.1.1.4. Chirurgische Wundversorgung und Rücktransport in die Stallungen**

Es folgte die Entfernung der Katheter und Schleusen, wobei die jeweiligen Gefäße nun vollständig ligiert wurden. Der Wundverschluss erfolgte schichtweise (1 Vicryl CTX Plus 70 cm V365H, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DEUTSCHLAND) und die Wunde wurde im Anschluss steril mit Gaze (Nobagaze<sup>®</sup> Kompressen, Noba Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter, DEUTSCHLAND) abgedeckt und mit Klebepflaster (Leucoplast<sup>®</sup> hospital, BSN medical GmbH, Hamburg, DEUTSCHLAND) fixiert. Die Narkose wurde ausgeleitet, das jeweilige Tier bei stabiler Eigenatmung extubiert und unter Kontrolle der Vitalparameter zurück in die Stallungen des Walter-Brendel-Zentrums verbracht. Infolge der noch wirksamen Spiegel langwirkender Sedativa, erwachten die Tiere erst im Tierstall, unter Aufsicht der Tierpfleger, vollständig aus dem tiefen Schlaf.

#### **3.1.2. Versuchstag 14: Hämodynamische Messungen, Druckregulierte Retroinfusion und Therapie mittels $\beta$ ARK-ct**

Am Versuchstag 14 erfolgte die Narkoseeinleitung, -fortführung und Überwachung wie unter Punkt 2.10. beschrieben. Die Präparation der Gefäßzugänge erfolgte diesmal linksseitig, d.h. es wurden eine 9 Fr. Schleuse (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) in die linke A. carotis interna und eine 11 Fr. Schleuse (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) in die linke V. jugularis externa eingelegt. Die angiographische Darstellung des LV erfolgte wie bereits unter Punkt 3.1.1.1. erläutert. Im Anschluss folgte, zwecks späterer Ermittlung der regionalen Myokardfunktion die Applikation von Mikrosphären (FluoSpheres<sup>®</sup> Blood Flow Determination Fluorescent Color Kit #3, polystyrene microspheres, 15  $\mu$ m Molecular

Probes, Eugene, Oregon, USA) unter Baseline- und Pacing- (Reserve) Bedingungen. Hierzu wurde zunächst ein 6 Fr. Pigtailkatheter (PIG Super Torque® Plus, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA) über die arterielle Schleuse im linken Ventrikel (LV) sowie das Pacerkabel im rechten Vorhof des Herzens platziert. Über den Pigtailkatheter wurden nun unter Baselinebedingungen, über einen Zeitraum von 1 Minute, 5 ml Mikrosphären ( $1 \times 10^6$  Mikrosphären/ml), die zuvor mit NaCl auf ein Gesamtvolumen von 20 ml verdünnt wurden, in den LV injiziert. Zeitgleich erfolgte ein Abzug des arteriellen Referenzblutes über einen mit der Schleuse verbundenen Perfusorschlauch (Spritzenpumpenleitung, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DEUTSCHLAND) durch die Harvardapparatur über eine Gesamtzeit von 3 Minuten. 1 Minute während der Applikation der Mikrosphären plus 2 weitere Minuten nach Beendigung der Mikrosphäreninjektion.

Die Messung wurde danach auch unter Pacing (130 Schläge/min.) mit einer anderen Mikrosphären-Farbe durchgeführt.

Es folgte die Messung der globalen Myokardfunktion mittels Conductance Katheter und eine anschließende Stressmessung des LVEDP bzw. dp/dt unter progredient steigender Dobutaminapplikation über die venöse Schleuse. Dazu wurde eine Ampulle Dobutamin (Dobutamin Carino 250 mg/50 ml Infusionslösung, Carinopharm GmbH, Bonn, DEUTSCHLAND) in eine Perfusor-Spritze aufgezogen und der Perfusor mittels Umrechnungstabelle für 5 Minuten auf  $5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$  eingestellt. Nach jeweils 3 weiteren Minuten wurde die Dobutamin-Konzentration auf 10, 20 bzw.  $40 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min.}$  gesteigert und die globale Myokardfunktion mittels Sonometrics System (SonoSOFT™ Version 3.4.50, Sonometrics Corporation, London, CANADA) unter den jeweiligen Files ermittelt.

Danach wurde der Conductance-Katheter gezogen und ein 6 Fr. Amplatz-Katheter über die venöse Schleuse im Koronarsinus platziert. Ein 0,018" Führungsdraht (Road Runner Extra Support, Cook Denmark Holding ApS, Bjæverskov, DÄNEMARK) wurde nachgelegt, und der Amplatz gegen einen Cournand-Katheter gewechselt. Der Draht konnte nun weiter in die AIV, also die das ischämische Myokard drainierende Koronarvene vorgeschoben werden und der diagnostische Cournand-Katheter durch den SSR-Katheter ersetzt werden. Nach Prüfung der korrekten Lage und dem Ausschluss eines evtl. Shunts mittels Kontrastmittelapplikation durch den SSR Katheter in die AIV, konnte nun mit der Retrograden Druckregulierten Applikation des

AAV2/9- $\beta$ ARK-ct-Konstrukts (**Therapiegruppe, n = 8**) oder der Kochsalzlösung (**Kontrollgruppe, n = 5**) mittels SSR (synchronized suction and retroinfusion) begonnen werden. Idealerweise ließ sich die AIV dabei mit all ihren Verästelungen im Verlauf bis zur Herzspitze hin darstellen (> Abb. 17, Seite 65). Dabei wurden das AAV2/9- $\beta$ ARKct- Konstrukt in einer Konzentration von  $1 \times 10^{12}$  in 25 ml PBS gelöst und mittels Perfusor (Perfusor<sup>®</sup> Secura B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DEUTSCHLAND) über 15 min. direkt in die AIV Appliziert. Nach erfolgter Applikation und Beendigung der SSR wurde der Ballon des SSR-Katheters deflatiert und unter Röntgenkontrolle vorsichtig aus dem Gefäß entfernt. Die chirurgische Wundversorgung und der Rücktransport in die Stallungen erfolgten wie bereits unter Punkt 3.1.1.4. erläutert.

### **3.1.3. Therapie mit Betablockern**

Die Betablockerguppe (**n = 5**) wurde ab dem 14. Versuchstag einmal täglich oral mit Bisoprolol therapiert. Am Versuchstag 14 erfolgte die Applikation abends, ab dem Versuchstag 15 dann immer morgens auf nüchternen Magen. Die Initialdosis in der 1. Woche lag bei 1,25 mg/Tier/Tag, die Erhaltungsdosis ab der 2. Woche bei 2,5 mg/Tier/Tag. Letztere wurde bis zum Versuchsende beibehalten.

**Anmerkung:** n bezieht sich hier auf die Anzahl der auswertbaren Tiere der einzelnen Gruppen und nicht auf die Anzahl der tatsächlich verwendeten Tiere.

### **3.1.4. Versuchstag 56: Hämodynamische Messungen, Sternotomie, Sonomikrometrie und Gewebeentnahme**

Nach Narkoseeinleitung, -fortführung und Überwachung (siehe Punkt 2.10.) wurde mit der Präparation der verbliebenen Gefäßzugänge begonnen. I.d.R. wurden hierzu die rechte oder linke A. carotis externa und die linke oder rechte V. jugularis interna dargestellt. Falls die Präparation der Arterie aufgrund von Vernarbungen/ Verwachsungen nach Wundheilung nicht möglich war, wurde auf die rechte A. femoralis ausgewichen. Hier erfolgte nun wiederum die Einlage einer 9 Fr. Schleuse (Cordis<sup>®</sup>, Reading, Miami, USA) in die Arterie und einer 11 Fr. Schleuse (Cordis<sup>®</sup>, Reading, Miami, USA) in die Vene. Die angiographische Darstellung des linken Ventrikels (LV) wie bereits unter Punkt 3.1.1.1. beschrieben. Danach erfolgte die

erneute Applikation von 2 weiteren, unterschiedlichen Mikrosphärenfarben (FluoSpheres<sup>®</sup> Blood Flow Determination Fluorescent Color Kit #3, polystyrene microspheres, 15 µm Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) unter Baseline- und Pacing- (Reserve, 130 Schläge/min.) Bedingungen über einen 6 Fr. Pigtailkatheter, der über die arterielle Schleuse im LV platziert wurde. Das Pacerkabel wurde im rechten Vorhof des Herzens platziert. Zeitgleich erfolgte ein Abzug des arteriellen Blutes über einen mit der Schleuse verbundenen Druckschlauch durch die Harvardapparatur über 3 min., wie bereits unter 3.1.2. beschrieben. Danach wurde das Referenzblut durch die SPUs (Sample Processing Unit Filters/Set, Angelika Gaiser, Kunststoff- und Metallprodukte GmbH, Kappel-Grafenhausen, DEUTSCHLAND) filtriert und die Mikrosphärenreferenzen dunkel, aufrecht und kühl gelagert (siehe Punkt 2.3.5.).

Auch am Tag 56 wurde die Messung der globalen Myokardfunktion mittels Conductance Katheter vorgenommen. Die Stressmessung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) bzw. des Anstiegs des linksventrikulären Druckes nach der Zeit (dp/dt) unter progredient steigender Dobutaminapplikation wurde ebenfalls mittels Conductance Katheter wie am Tag 14 (Punkt 3.1.2.) durchgeführt. Nachdem die grundlegenden Vergleichsmessungen der globalen Myokardfunktion erhoben waren, wurde das Tier mittels 4 mg Pancuroniumbromid (Pancuronium-Inresa<sup>®</sup>, 4 mg/2 ml N2, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, DEUTSCHLAND) relaxiert und ferner eine Schmerzausschaltung mittels 0,1 mg Fentanyl pro Tier i.v. (Fentanyl<sup>®</sup>-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, DEUTSCHLAND) erzielt. Es folgte die mediane Sternotomie bei der mittels Elektrokauter eine Incision vom Manubrium sterni bis 1 cm kaudal des Processus xiphoideus geführt wurde. Der zunächst oberflächliche Schnitt wurde bis auf den Knochen vertieft und anschließend 1 cm hinter dem Xiphoid, das stumpf frei präparierte Peritoneum angehoben und mittels Scherenschlag durchtrennt. Das Zwerchfell wurde nun stumpf, mittels gedeckter Scherenspitze perforiert und das Sternum mittels Thoraxschere und Thoraxspreitzer in der Medianen, von kaudal nach kranial eröffnet. Der Herzbeutel konnte nun unter Schutz der Herzohren, nach je einem Entlastungsschnitt nach kranial und kaudal, vorsichtig vom Herzen nach dorsal abgestreift werden. Es folgte die Sonomikrometrische Messung im Bereich der AAR, LAD und der RCx, wie bereits unter Punkt 2.5. beschrieben. Danach wurde die LAD in Höhe der ursprünglichen Ballonokklusion, also distal des D1 mittels Nadel und Faden

(Ethibond Excel 0, PSL, 75 cm, EH7111, Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, DEUTSCHLAND) umstochen, umschlungen und die Fadenenden durch einen ca. 2 cm langen Gummischlauch mit einem Lumen von 3 mm gezogen. Das Tier wurde über 2-3 min. mit 5 Volumenprozent Isofluran (Forene® Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DEUTSCHLAND) betäubt und nochmals 0,1 mg Fentanyl pro Tier i.v. (Fentanyl®-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, DEUTSCHLAND) appliziert. Der oben beschriebene Gummischlauch wurde nun entlang des Fadens auf die LAD heruntergezogen und dort unter Druck auf das Gefäß mittels Overhold fixiert. Somit war ein Verschluss der LAD gegenüber der folgenden Methylenblaufärbung (LÖFFLERS Methylenblaulösung, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND) gewährleistet. Nun wurden zunächst 20 ml 1 M-Kaliumchloridlösung (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, DEUTSCHLAND) intrakardial (i.c.) appliziert, was die elektromechanische Entkopplung des Herzens und damit die Euthanasie des Tieres zur Folge hatte. Im Anschluß erfolgte die Applikation von 15 ml Methylenblau i.c. was eine Vitalfärbung des gesamten Herzmuskels außer dem verschlossenen LAD-Bereich nach sich zog. Daraufhin wurde das Herz mittels Scherenschnitten aus dem Thorax gelöst und auf ein Tablett verbracht. Hier wurden nach dem Lösen des Overholds und des Gummischlauchs 10 ml gelöstes TTC (2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND), mittels ein auf eine Spritze (BD Discardit™ II, Becton Dickinson S.A., Fraga, SPANIEN) aufgestecktes 9 Fr. Schleuseninlay (Cordis Corporation, Miami, Florida, USA), über die Aorta direkt in die LAD appliziert. Danach wurde das Herz zunächst in toto Photographiert und mittels Parenchymmesser, beginnend von der Apex (Slice 5) bis zur Herzbasis (Slice 1) hin, in 5 Slices geschnitten. Die 5 Slices wurden ebenfalls, nebeneinander liegend zur späteren Infarktgrößenbewertung photographiert. Danach erfolgte die histologische Gewebeentnahme mittels transmuraler Schnitte aus dem LAD-, AAR- und RCx-Bereich eines jeden der 5 Slices. Ferner wurden auch histologische Proben von Organen wie Skelettmuskulatur, Lunge, Leber, Niere, Milz, Lymphknoten, Aorta und Darm u.a. zum negativen Virustransfektionsnachweis entnommen. Die Histo-/Analyseproben wurden in beschrifteten Histokästchen in Flüssigstickstoff (Linde AG, München, DEUTSCHLAND) aserviert und bei -80°C bis zur Auswertung im Gefrierschrank gelagert.

Die 5 Slices wurden für mindestens eine Woche in 4 % Formalin-Lösung

(Ausgangslösung: Formaldehyd 37 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DEUTSCHLAND) fixiert und dann zwecks Quantifizierung der Mikrosphären wie unter Punkt 2.3.5. beschrieben aufbereitet.

Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte wie unter Punkt 2.7. beschrieben.

Nach Wundverschluss und kühler Zwischenlagerung erfolgte die Entsorgung der toten Tiere durch ein Tierkörperentsorgungsunternehmen (Berndt GmbH, Obererding, DEUTSCHLAND).

## V. STATISTIK

**Alle Ergebnisse werden als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (MEAN ± SEM) angegeben.** Die Daten der jeweiligen Versuchsgruppen wurden zunächst mit einer zweifaktoriellen ANOVA (Analysis of Variance) für wiederholte Messungen auf Signifikanz geprüft.

Bei Signifikanz der ANOVA, schlossen sich Tukey Tests zur Verifizierung signifikanter Unterschiede in den einzelnen Gruppen an.

Bei einparametrischer Fragestellung wurde die einfaktorielle ANOVA durchgeführt, der sich bei Signifikanz ein Vergleich mit dem Student-Newman-Keul-Test anschloss.

Bei einem Vergleich von zwei Parametern wurde ein einseitiger t-Test oder ein gepaarter, zweiseitiger t-Test zur Prüfung auf Signifikanz herangezogen.

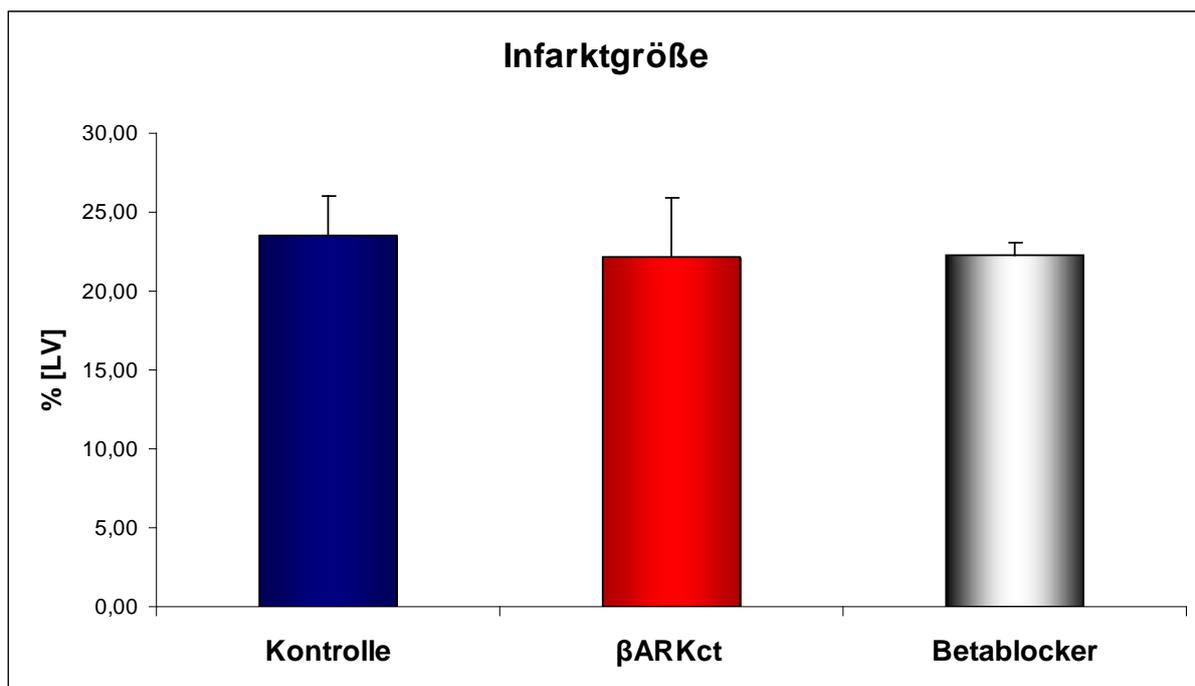
Als signifikantes Ergebnis wurde  $p < 0,05$  angesehen. Die Berechnungen erfolgten mit dem Statistikprogramm SigmaStat 2.0 (Aspire Software International, Ashburn, VA, USA).

## VI. ERGEBNISSE

### 1. Verifizierung des Versuchsmodells

#### 1.1. Infarktgröße

Der am Versuchstag 0, iatrogen mittels 90 minütiger Ballonokklusion gesetzte ischämische Infarkt, wurde post mortem in seinem Ausmaß in Prozent am linken Ventrikel (LV) verifiziert. Dabei zeigte sich für die Infarktgröße kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in der Ausbildung dieser (Kontrolle  $23,5 \pm 2,6$  % vs.  $\beta$ ARKct  $22,2 \pm 3,7$  % vs. Betablocker  $22,3 \pm 0,8$  %,  $p=n.s.$ ) (> Abb. 23). Auch für die Infarktgröße in Prozent an der AAR ergab sich keine signifikante Differenz zwischen den einzelnen Gruppen (Kontrolle  $44,2 \pm 4,3$  % vs.  $\beta$ ARKct  $42,6 \pm 6,9$  % vs. Betablocker  $41,7 \pm 2,5$  %,  $p=n.s.$ ) (o. Abb.).



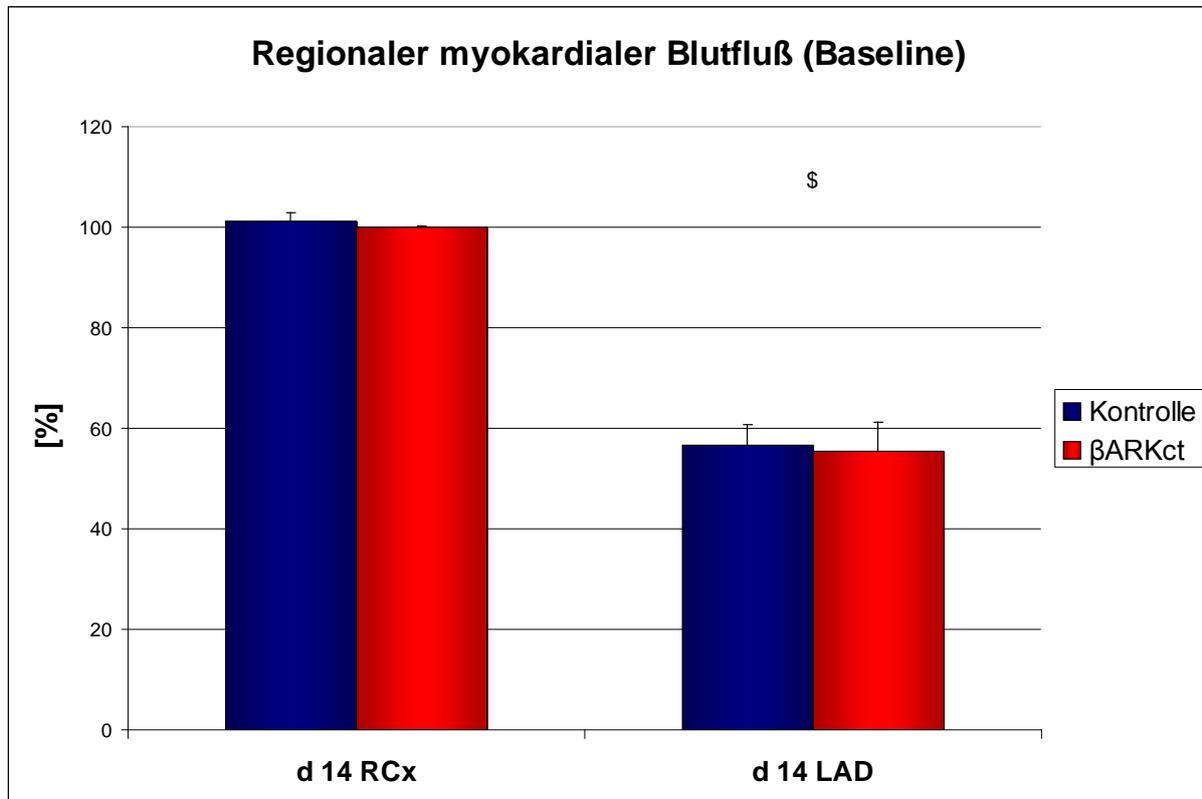
Kontrolle n= 5,  $\beta$ ARKct n=8, Betablocker n=5, MEAN  $\pm$  SEM,  $p=n.s.$

**Abb. 23** Infarktgröße in % des linken Ventrikels.

#### 1.2. Regionaler myokardialer Blutfluss am Versuchstag 14

Die Messung des regionalen myokardialen Blutflusses mittels Mikrosphären, zeigte im Kontrollareal der RCx am Tag 14 (Kontrolle  $101,3 \pm 1,6$  % vs.  $\beta$ ARKct  $99,9 \pm 0,3$

%,  $p=n.s.$ ) einen zu erwartenden unbeeinflussten regionalen myokardialen Blutfluss von ca. 100 % im Vergleich zum LAD-Areal ( $>$  Abb.24).



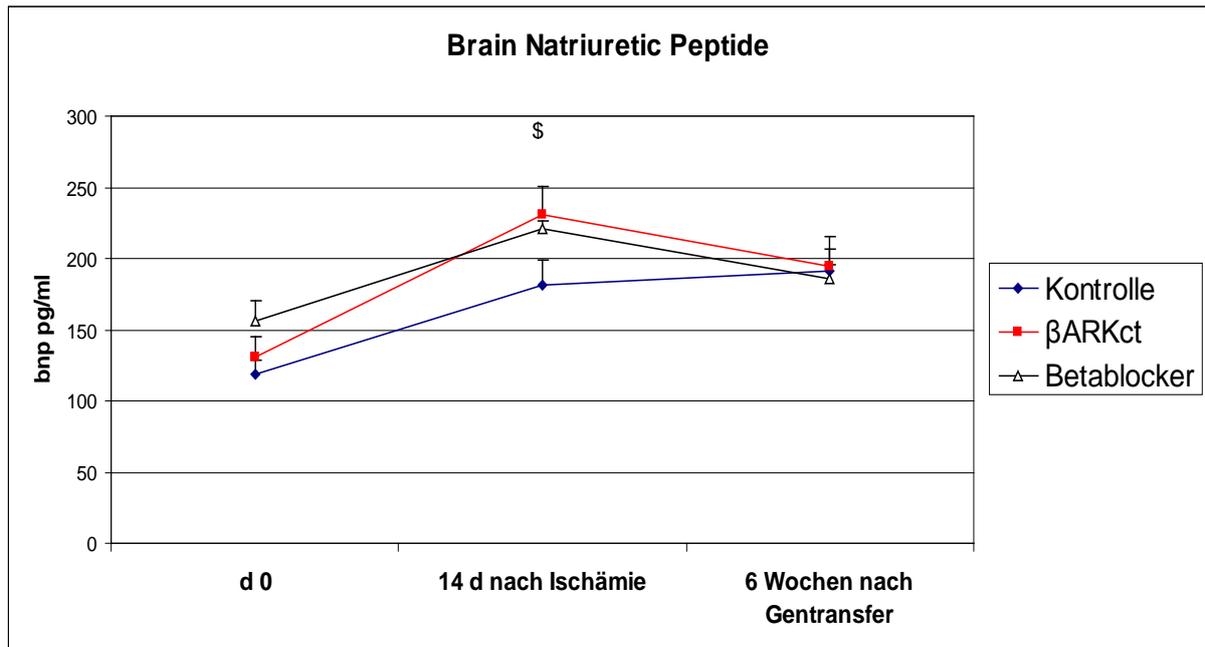
Kontrolle  $n=5$ , beta-ARKct  $n=8$ , \$ MEAN  $\pm$  SEM, d 14 LAD vs. d 14 RCx Baseline,  $p<0,05$ .

**Abb. 24** Vergleich des regionalen myokardialen Blutflusses im Bereich der LAD gegen RCx unter Baselinebedingungen 14 Tage post Infarkt.

Hingegen war der regionale myokardiale Blutfluss der LAD am Tag 14 (Kontrolle  $56,6 \pm 4,2$  % vs. beta-ARKct  $55,3 \pm 6,0$  %,  $p<0,05$  vs. RCx d 14) post Ischämie im Mittel signifikant im Vergleich zum Kontrollareal (RCx) verringert.

### 1.3. Brain Natriuretic Peptide (BNP)

Für die BNP-Konzentrationen im Blutserum als Surrogatmarker für eine bestehende Herzinsuffizienz, ergab sich am Tag 14 nach Ischämie ein signifikanter Anstieg für alle Gruppen bezogen auf ihre Mittelwerte (Kontrolle  $181,8 \pm 17,0$  pg/ml vs. beta-ARKct  $230,9 \pm 19,3$  pg/ml vs. Betablocker  $220,6 \pm 5,5$  pg/ml,  $p<0,05$ ) ( $>$  Abb. 25). Nach Therapie zeigte sich im Gegensatz zur Kontrollgruppe ein Trend zur Normalisierung der Werte ohne jedoch im bestimmten Zeitraum Signifikanz zu erreichen. (d 56: Kontrolle  $191,5 \pm 15,0$  pg/ml vs. beta-ARKct  $195,0 \pm 20,8$  pg/ml vs. Betablocker  $186,0 \pm 9,3$  pg/ml,  $p=n.s.$ ) ( $>$  Abb. 25).

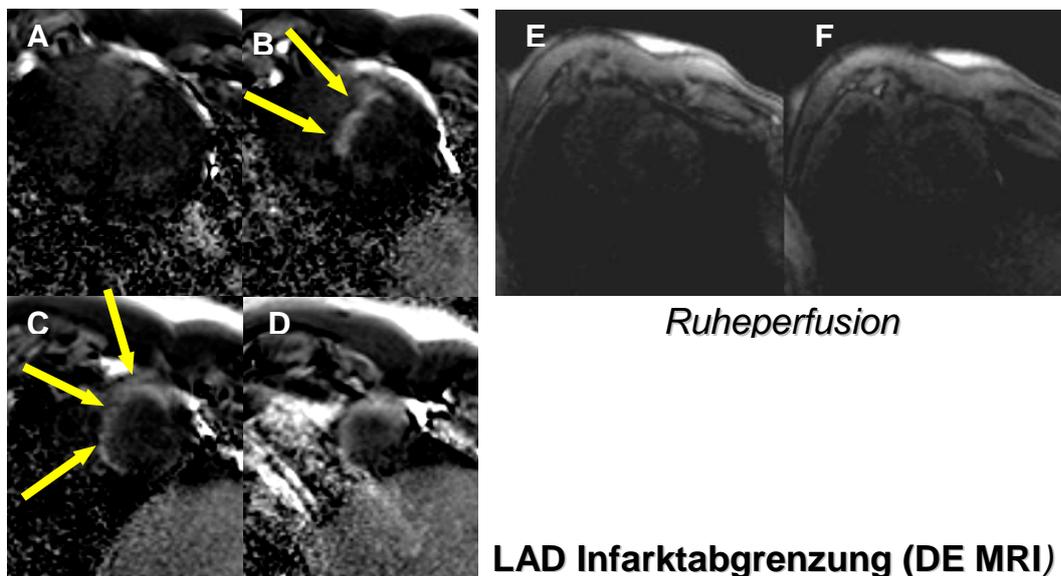


Kontrolle n= 4, βARKct n=7, Betablocker n=4, \$ MEAN ± SEM, p<0,05 vs. vor Ischämie.

**Abb. 25** BNP-Konzentration im Serum in pg/ml.

#### 1.4. MRT Darstellung des Infarkts

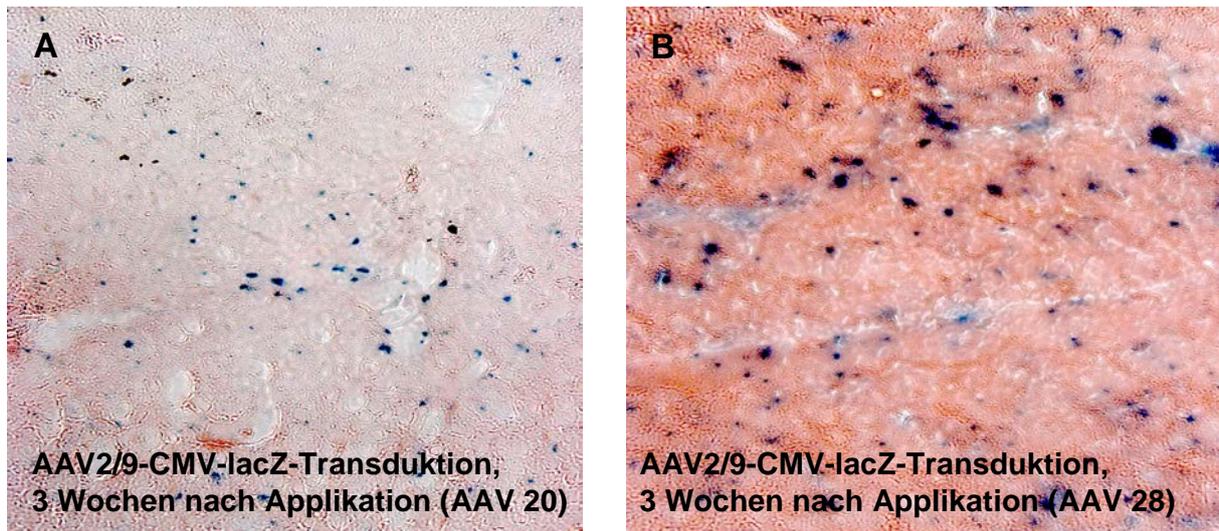
Die Infarktausprägung bzw. -lokalisierung wurde zusätzlich für einige Tiere am Versuchstag 14 mittels MRT erfasst. Zusätzlich erfolgte die Messung der Ruheperfusion (> Abb. 26).



**Abb. 26** Infarktdarstellung (A-D) und Ruheperfusion (E-F) vom Herzen des βARKct-Tieres IS 09 vor Behandlung am d 14.

### 1.5. Nachweis der AAV2/9-lac-Z-Expression

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen den Nachweis für die erfolgreiche AAV2/9-lac-Z-Transduktion mittels X-Gal-Färbung für die Tiere AAV 20 und 28 (> Abb. 27). Die Abbildungen zeigen histologische Schnitte des Herzmuskels nach in vivo Transduktion mit AAV Vektoren, welche für das Gen der beta-Galactosidase = lacZ kodieren.

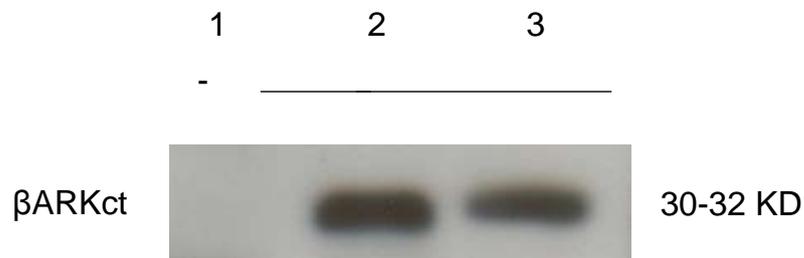


**Abb. 27** Nachweis der lac-Z-Transduktion für die Vorversuche AAV 20 (A) und 28 (B) mittels X-Gal-Färbung

### 1.6. $\beta$ ARKct-Expressionsnachweis

Die adäquate Expression des  $\beta$ ARKct Transgens wurde in vitro in neonatalen Rattenkardiomyozyten und 293 Zellen nach Transfektion mit Plasmiden und anschließendem Immunoblot des Zelllysates getestet (> Abb. 28).

# A

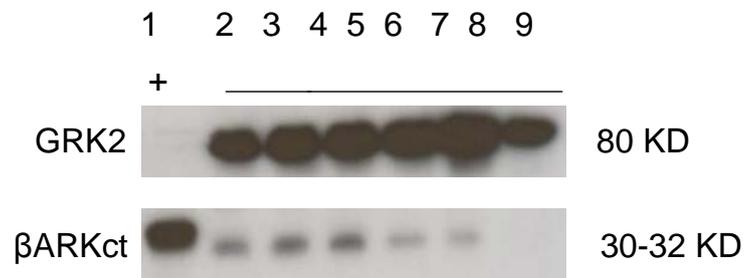


- 1: Ischämie ohne  $\beta$ ARKct-Transduktion (Negativkontrolle)
- 2: In vitro  $\beta$ ARKct-Plasmid in 293 transfiziert (Positivkontrolle)
- 3: AAV2/9- $\beta$ ARKct-Transfektion neonataler Rattenmyozyten

**Abb. 28** Nachweis der  $\beta$ ARKct-Transfektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten in der Zellkultur (A).

Es folgte der Nachweis der  $\beta$ ARKct-Expression im Schweinemyokard mittels Immunoblot des Gewebehomogenates nach in vivo Transduktion mittels AAV Vektoren. Dieser konnte für das Tier IS 38 (Direktinjektion  $1 \times 10^{13}$ ) mittels Western Blot gegen die Positivkontrolle eines  $\beta$ ARKct-Zell-Lysats gezeigt werden (> Abb. 29).

# B



- 1: Positivkontrolle eines βARKct Zell-Lysats  
 2-8: Ischämie mit AAV2/9-βARKct-Transduktion (IS 38 Direktinjektion)  
 9: Ischämie ohne AAV2/9 βARKct-Transduktion (Negativkontrolle)

**Abb. 29** In vivo βARKct-Transduktionsnachweis gegen βARKct-Zell-Lysat (B).

## 2. Hämodynamische Parameter

### 2.1. Globale Myokardfunktion (LVEDP und EF)

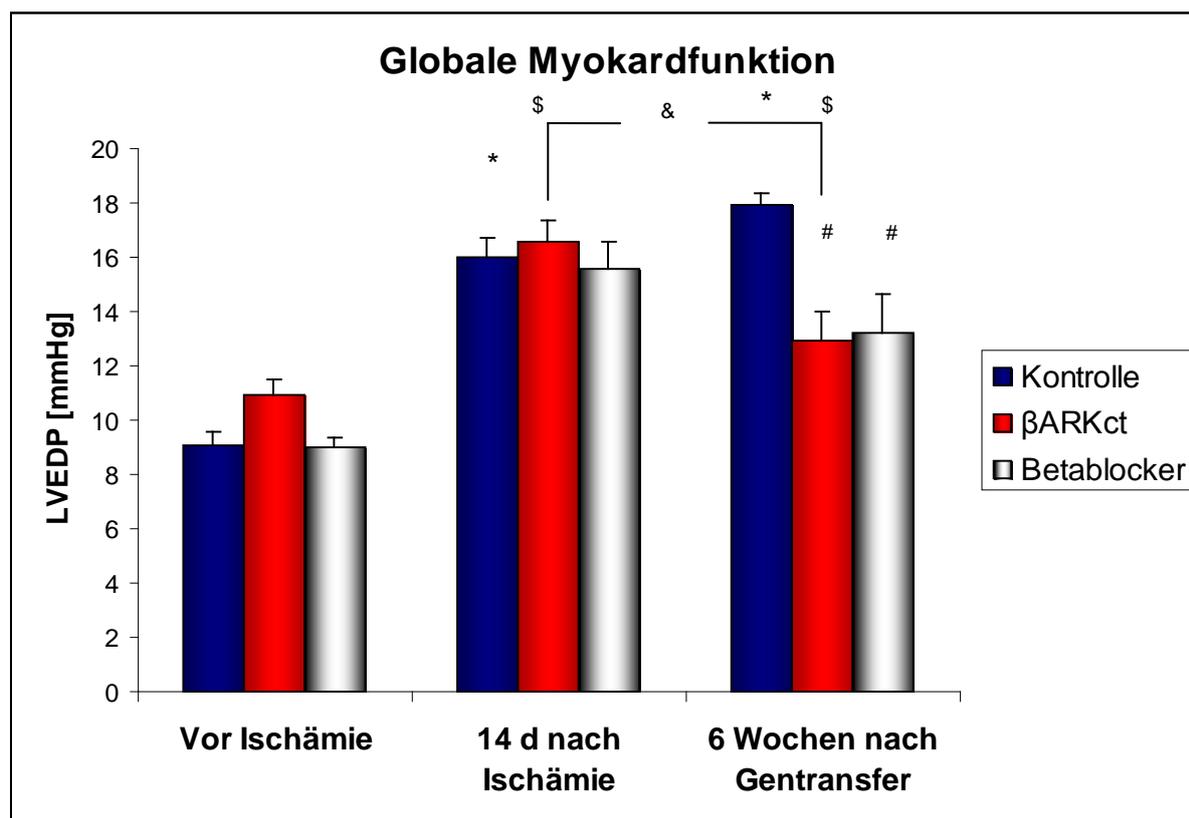
#### 2.1.1. LVEDP

Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) zeigte 14 Tage post Ischämie in allen Gruppen für den Mittelwert eine signifikante pathologische Erhöhung im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert (Kontrolle  $16,0 \pm 0,7$  mmHg,  $p < 0,05$ ,  $n=5$  vs. βARKct  $16,6 \pm 0,8$  mmHg,  $n=8$  vs. Betablocker  $15,6 \pm 1,0$  mmHg,  $p < 0,05$  vs. vor Ischämie (> Abb. 30).

Durch die Gentherapie mit βARKct konnte der LVEDP am Tag 56 bis auf einen Wert von  $12,9 \pm 1,1$  mmHg signifikant normalisiert werden ( $12,9 \pm 1,1$  mmHg,  $p < 0,05$  vs. βARKct d 14). Auch die Betablockertherapie mit Bisoprolol (2,5 mg/d oral) war in der Lage, den LVEDP am Tag 56 auf  $13,3 \pm 1,4$  mmHg zu verbessern. Diese Normalisierung des LVEDP in der βARKct- und Betablockerguppe war gegenüber

der Kontrollgruppe ( $17,9 \pm 0,4$  mmHg,  $p < 0,05$ ) für den Versuchstag 56 signifikant.

Ebenso wies die weitere Verschlechterung des LVEDP am Tag 56 in der Kontrollgruppe eine Signifikanz zum Ausgangswert (vor Ischämie) mit  $p < 0,05$  auf. Für die Mittelwerte aller Gruppen am Tag 56 bestand ebenfalls eine Signifikanz  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert.



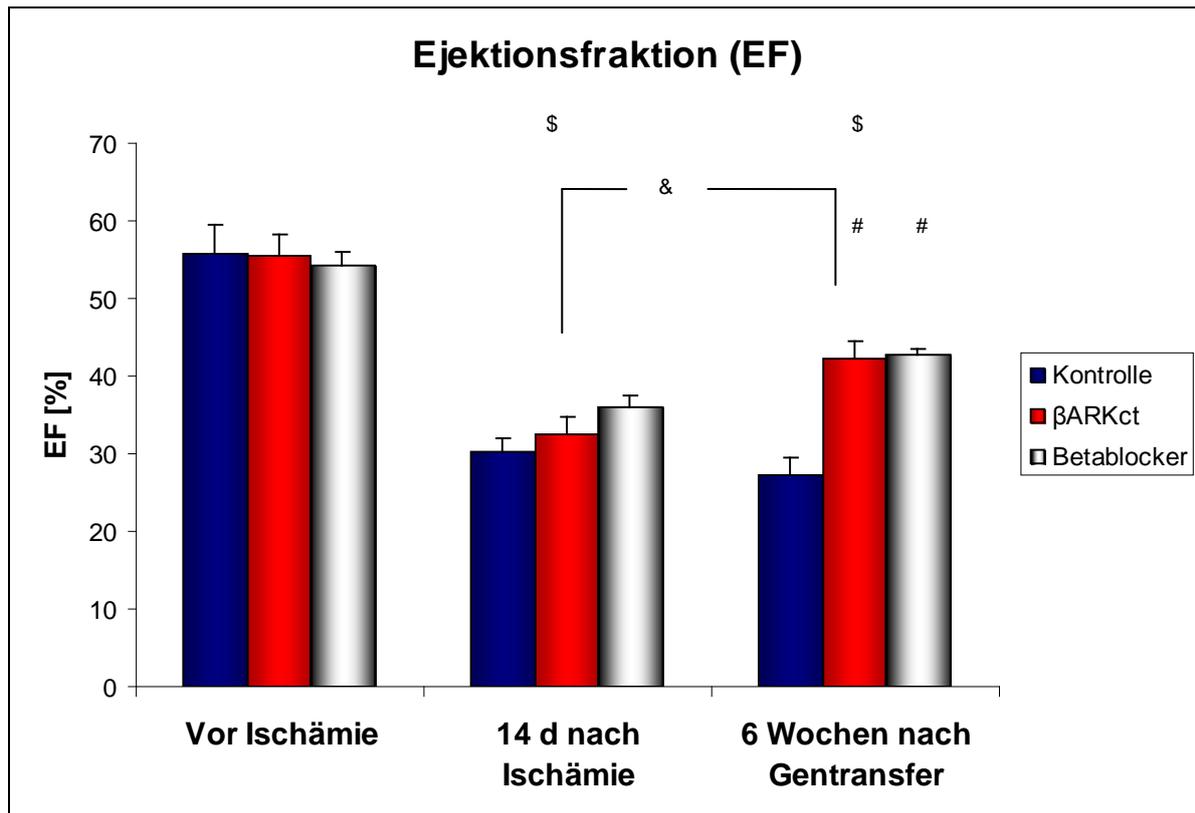
Kontrolle  $n = 5$ ,  $\beta$ ARKct  $n = 8$ , Betablocker  $n = 5$ , \$ MEAN  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$  vs. vor Ischämie; \*  $p < 0,05$  vs. vor Ischämie; #  $p < 0,05$  vs. Kontrolle am Tag 56 (6 Wochen nach Gentransfer); &  $p < 0,05$  vs.  $\beta$ ARKct d 14 nach Ischämie.

**Abb. 30** LVEDP als Maß der globalen Myokardfunktion mit erkennbarer Schädigung des Herzens aller Versuchstiere am Tag 14 post Ischämie und signifikantem therapeutischen Effekt der  $\beta$ ARKct- und Betablocker-Behandlung am Tag 56.

### 2.1.2. Ejektionsfraktion

Die Ejektionsfraktion (EF) war am Tag 14 in allen Versuchsgruppen im Vergleich zum Messzeitpunkt vor Ischämie signifikant reduziert (Kontrolle  $30,2 \pm 1,9$  %,  $p < 0,05$  vs.  $\beta$ ARKct  $32,5 \pm 2,3$  %,  $p < 0,05$  vs. Betablocker  $36,1 \pm 1,5$  %,  $p < 0,05$ ) (> Abb. 31). Diese signifikante Reduktion im Vergleich zum Ausgangswert blieb für alle Gruppen

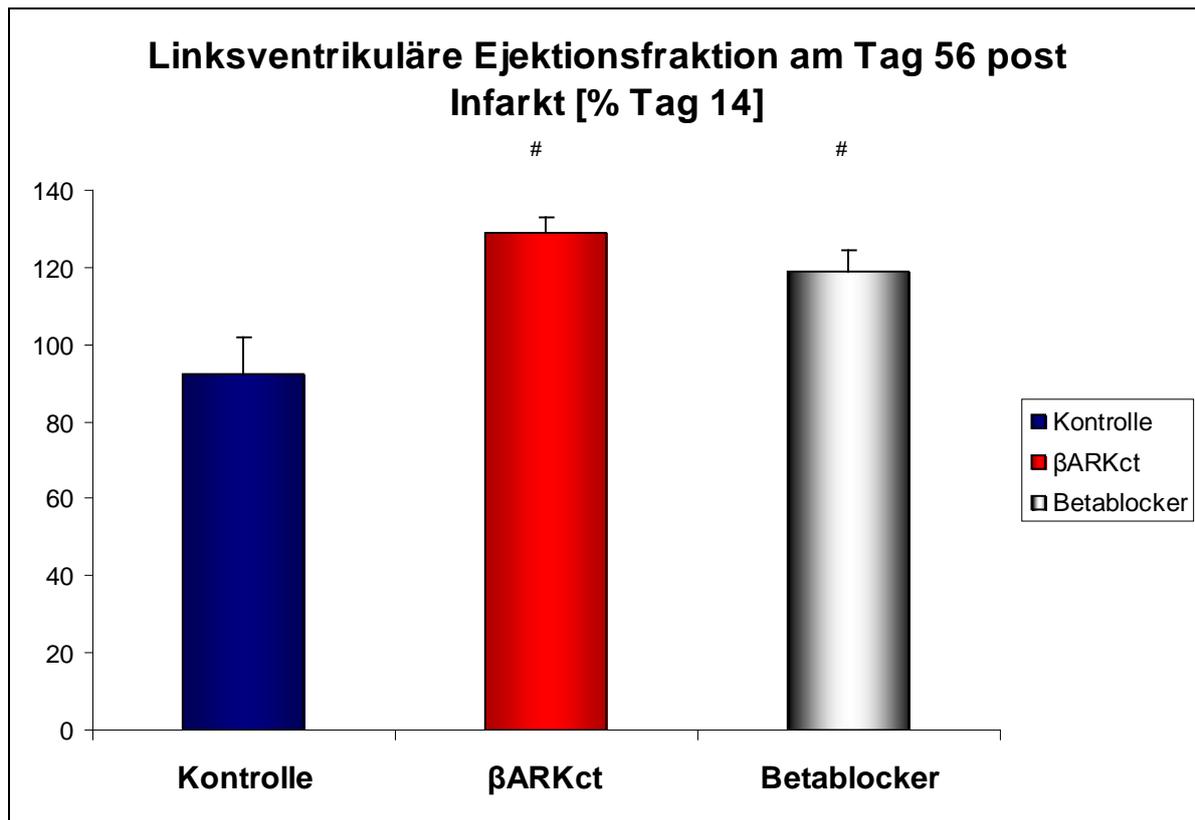
auch am Tag 56 bestehen ( $p < 0,05$ ). Dennoch zeigte sich am Tag 56 eine signifikante Verbesserung der EF in der  $\beta$ ARKct-Gruppe ( $42,1 \pm 2,4$  %,  $p < 0,05$  vs.  $\beta$ ARKct d 14 nach Ischämie), wie auch in der Betablockergruppe ( $42,7 \pm 0,8$  %,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu Tag 14, während sich die EF der Kontrollgruppe weiter verschlechterte ( $27,4 \pm 2,0$  %).



Kontrolle n= 5,  $\beta$ ARKct n=7, Betablocker n=5, \$ MEAN  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$  vs. vor Ischämie; #  $p < 0,05$  vs. Kontrolle am Tag 56 (6 Wochen nach Gentransfer); &  $p < 0,05$  vs.  $\beta$ ARKct d 14 nach Ischämie.

**Abb. 31** EF der 3 Gruppen im zeitlichen Verlauf mit signifikanter Verschlechterung der EF aller Versuchstiere am Tag 14 und 56 im Vergleich zum Ausgangswert (MEAN  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ ) und signifikanter Verbesserung unter  $\beta$ ARKct- und Betablocker-Behandlung am Tag 56 im Vergleich zu Kontrollgruppe am Tag 56.

Die Effektivität der  $\beta$ ARKct- und Betablocker-Therapie lässt sich noch besser durch die Darstellung der prozentualen Entwicklung der EF am Tag 56 im Vergleich zum Tag 14 post Ischämie verdeutlichen. Auch hier zeigte sich eine signifikante Verbesserung der EF in % im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle  $92,2 \pm 9,5$  % Tag 14 vs.  $\beta$ ARKct  $129,1 \pm 4,1$  % Tag 14,  $p < 0,05$  vs. Betablocker  $119,1 \pm 5,2$  % Tag 14,  $p < 0,05$ ) (> Abb. 32).

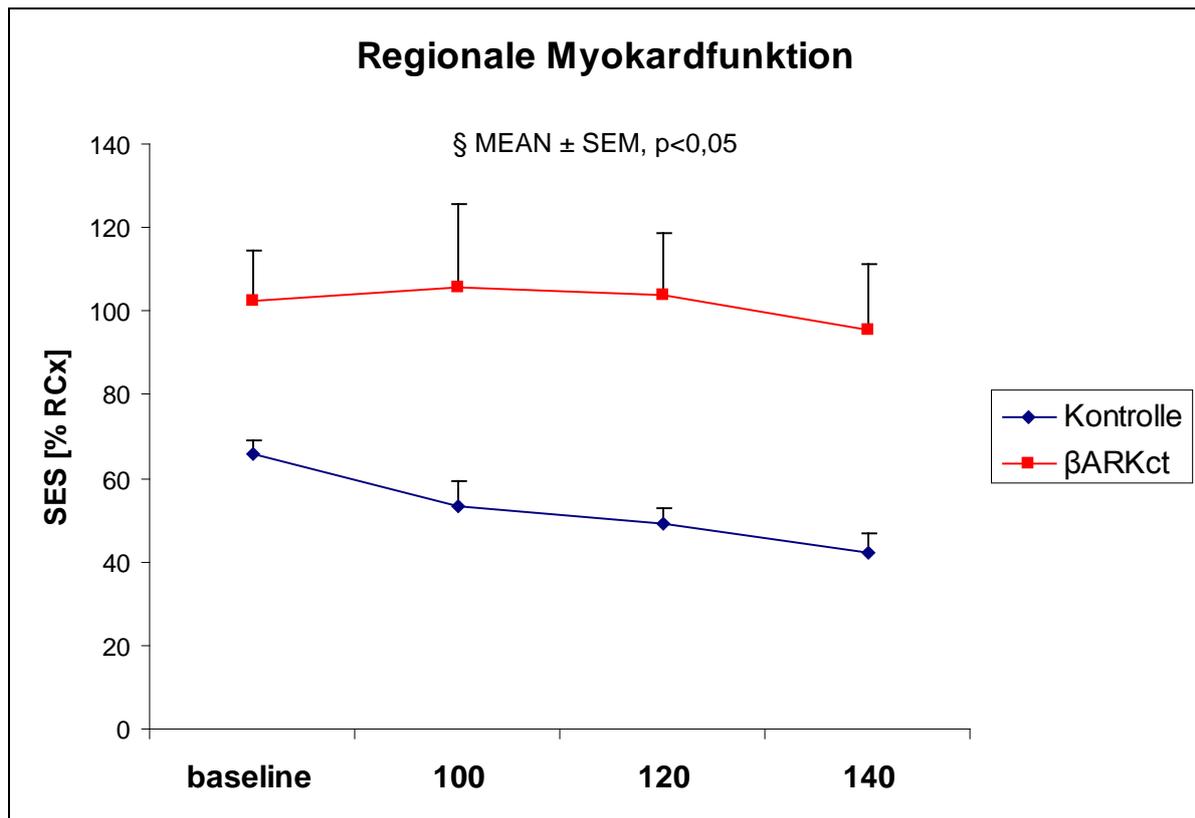


Kontrolle n= 5, βARKct n=7, Betablocker n=5, # MEAN ± SEM, p<0,05 vs. Kontrolle am Tag 56.

**Abb. 32** Linksventrikuläre EF am Tag 56 bezogen auf die prozentuale Veränderung zum Tag 14 post Infarkt.

## 2.2. Regionale Myokardfunktion

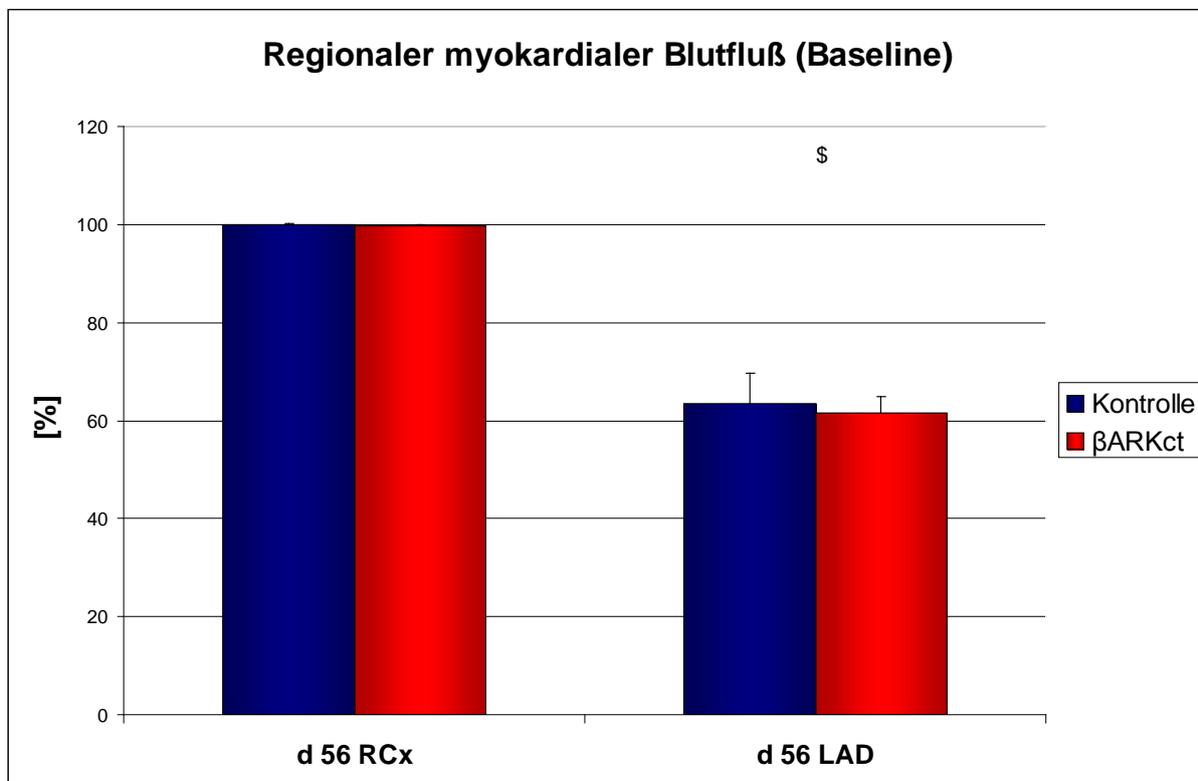
Die Quantifizierung der regionalen Myokardfunktion mittels der Subendokardialen-Segment-Verkürzung (SES) in % der nicht-ischämischen RCx-Region am Versuchstag 56, wies eine progrediente Reduktion der myokardialen Kontraktilität in der Kontrollgruppe im Vergleich zur βARKct-Gruppe unter Reservebedingungen (rechts atrialem Pacing 80, 100, 120, und 140 Schläge/min.) auf. Dabei zeigte die βARKct-Gruppe selbst unter Pacing 140 Schläge/Minute im Mittel eine signifikant bessere Kontraktilität als die Kontrollgruppe (Kontrolle  $42,2 \pm 4,5$  % vs. βARKct  $95,6 \pm 15,6$  % (MEAN ± SEM), p<0,05) (> Abb. 33).



Kontrolle n= 5, βARKct n=7, § MEAN ± SEM, p<0,05 für βARKct vs. Kontrolle

**Abb. 33** Subendokardiale-Segment-Verkürzung (SES) in % der nicht-ischämischen RCx-Region am Versuchstag 56 mit stabiler Kontraktilität der βARKct-Gruppe unter Baseline- und Reservebedingungen (rechts atriales Pacing 80, 100, 120, und 140 Schläge/min.) signifikant für den Mittelwert (MEAN ± SEM), p<0.05) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

### 2.3. Regionaler myokardialer Blutfluss



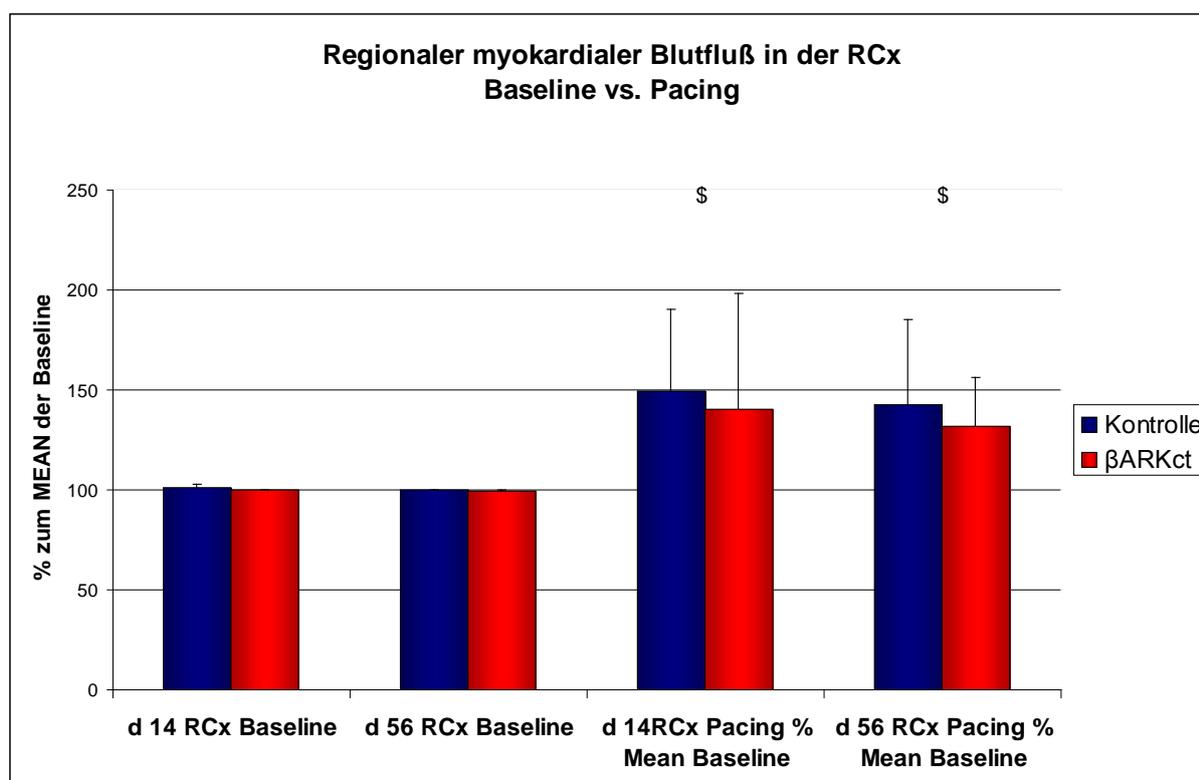
Kontrolle n= 5, βARKct n=8, \$ MEAN ± SEM d 56 LAD vs. d56 RCx Baseline, p<0,05.

**Abb. 34** Vergleich des regionalen myokardialen Blutflusses im Bereich der LAD gegen RCx unter Baselinebedingungen 56 Tage post Infarkt.

Die Messung des regionalen myokardialen Blutflusses mittels Mikrosphären, zeigte im Kontrollareal der RCx am Tag 56 (Kontrolle  $100,1 \pm 0,1$  % vs. βARKct  $99,7 \pm 0,3$  %, p=n.s.), wie auch schon am Tag 14, einen unbeeinflussten regionalen myokardialen Blutfluss von ca. 100 % im Vergleich zum LAD-Areal (> Abb. 34).

Der regionale myokardiale Blutfluss der LAD am Tag 56 (Kontrolle  $63,4 \pm 6,2$  vs. βARKct  $61,6 \pm 3,3$  % vs. Betablocker 63,9 %, p<0,05 vs. RCx d 56) war post Ischämie im Mittel signifikant im Vergleich zum Kontrollareal (RCx) verringert (> Abb. 34). Unter baseline Bedingungen kam es zudem weder in der Kontrollgruppe, noch in der behandelten Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der Perfusion am Tag 56 im Vergleich zu Tag 14 (> Abb. 24 und 34).

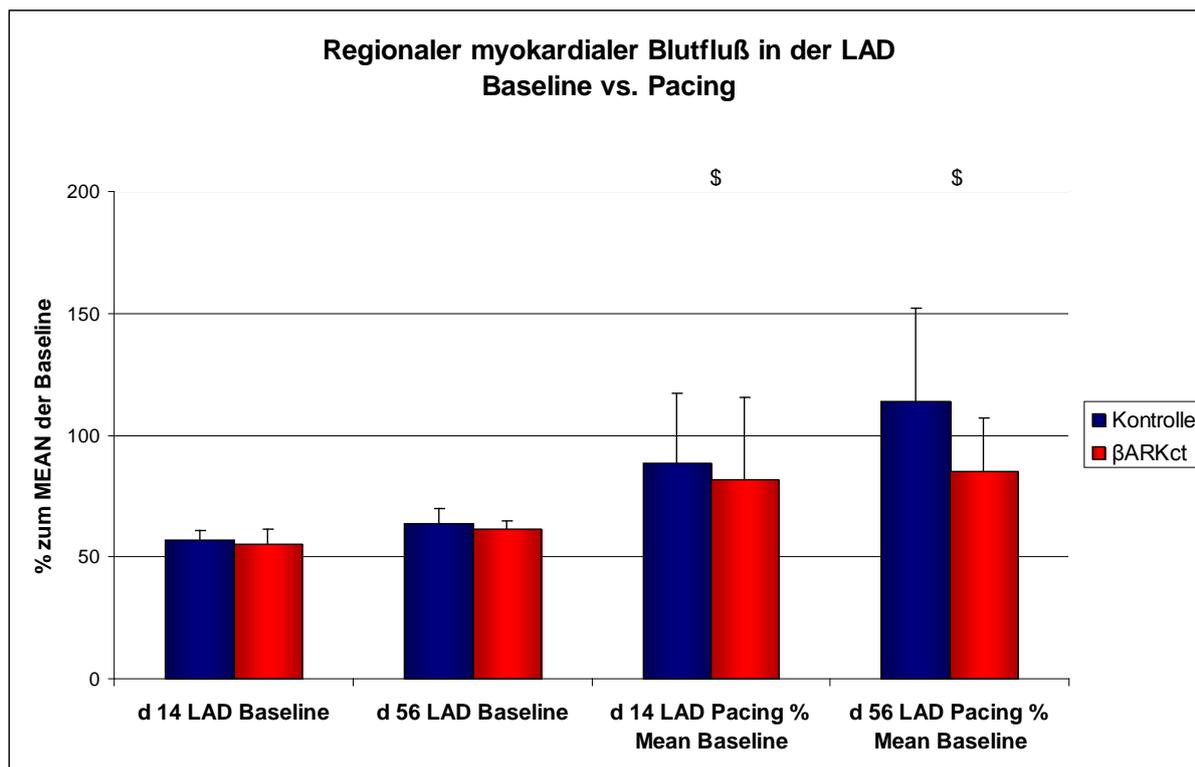
Unter rechts atrialem Pacing (130 Schläge/min.) kam es im RCx perfundierten Kontrollgebiet sowohl am Tag 14 als auch am Tag 56 zu einem relevanten Anstieg der Myokardperfusion, der in beiden Gruppen gleichwertig ausfiel. (d14: Kontrolle  $149,7 \pm 40,5$  % vs.  $\beta$ ARKct  $140,6 \pm 57,7$  %,  $p < 0,05$  vs. d 14 RCx Baseline) (> Abb. 35). (d 56: Kontrolle  $142,6 \pm 42,8$  % vs.  $\beta$ ARKct  $131,6 \pm 24,5$  %,  $p < 0,05$  vs. d 56 RCx Baseline).



Kontrolle n= 5,  $\beta$ ARKct n=8, \$ MEAN  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$  vs. d 14 RCx Baseline bzw. vs. d 56 RCx Baseline.

**Abb. 35** Vergleich des regionalen myokardialen Blutflusses der RCx d 14 und d 56 Baseline gegen d 14 und d 56 unter rechts atrialem Pacing (130 Schläge/min.) in Prozent zum Mean der Baseline.

Auch im LAD-Areal konnten vergleichend für die Tage 14 und 56 im Mittel ein signifikanter Unterschied zwischen Pacing und Baseline berechnet werden (Kontrolle  $88,4 \pm 28,5$  % vs.  $\beta$ ARKct  $81,7 \pm 34,0$  %,  $p < 0,05$  vs. d 14 LAD Baseline bzw. Kontrolle  $113,7 \pm 38,3$  % vs.  $\beta$ ARKct  $84,8 \pm 22,2$  %,  $p < 0,05$  vs. d 56 LAD Baseline) (> Abb. 36).



Kontrolle n= 5, βARKct n=8, \$ MEAN ± SEM, p<0,05 vs. d 14 LAD Baseline bzw. vs. d 56 LAD Baseline.

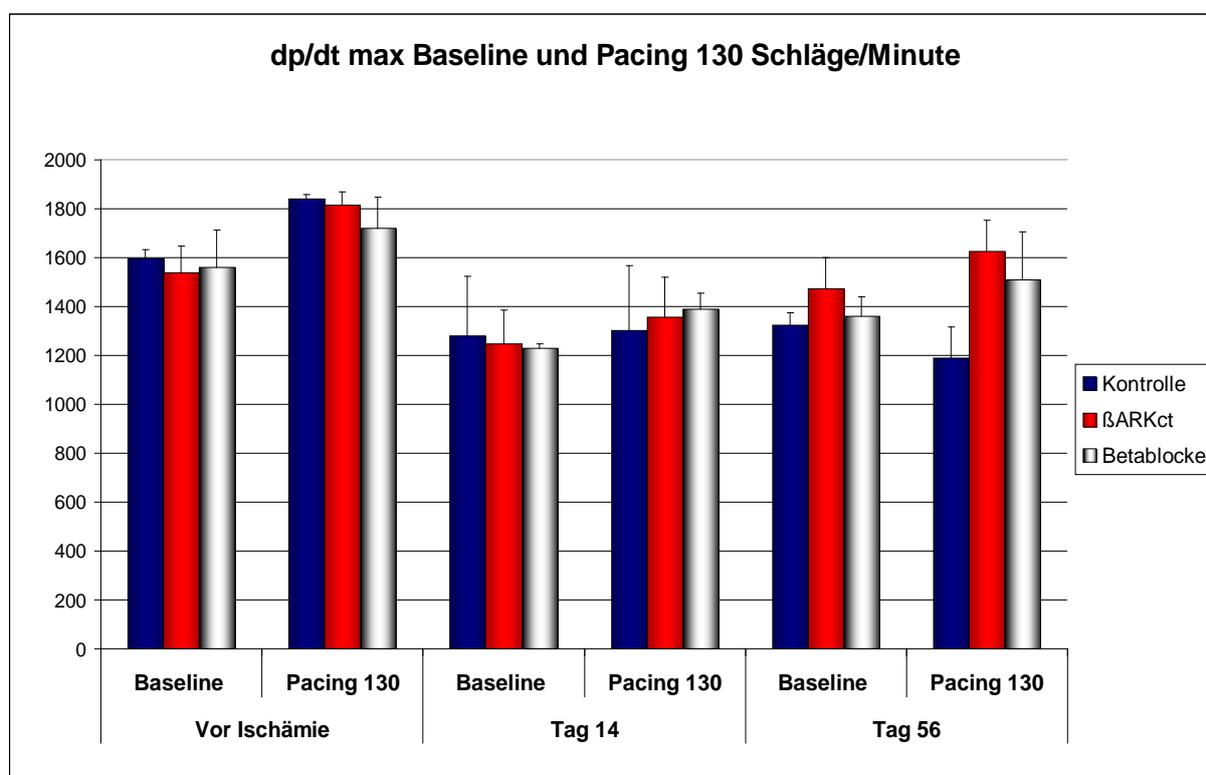
**Abb. 36** Vergleich des regionalen myokardialen Blutflusses der LAD d 14 und d 56 Baseline gegen d 14 und d 56 unter rechts atrialem Pacing (130 Schläge/min.) in Prozent zum Mittelwert der Baseline.

#### 2.4. Kontraktilitätsindex dp/dt

Für die systolische Anstiegsgeschwindigkeit des linken Ventrikels nach der Zeit (dp/dt max) ergab sich 14 Tage post Infarkt unter Baseline- und Pacing-Bedingungen (130 Schläge/min.) zunächst ein für alle Gruppen homogener, nicht signifikanter infarktbedingter Abfall gegenüber den am Versuchstag 0 erhobenen Ausgangswerten (Baseline Kontrolle d 0  $1597,5 \pm 36,7$  mm Hg vs. Baseline Kontrolle d 14  $1281,6 \pm 240,3$  mmHg; Baseline βARKct d 0  $1539,3 \pm 107,5$  mmHg vs. Baseline βARKct d 14  $1246,7 \pm 139,9$  mmHg und Baseline Betablocker d 0  $1561,3 \pm 150,9$  mmHg vs. Baseline Betablocker d 14  $1230,0 \pm 17,9$  mmHg, p=n.s.) bzw. (p=n.s. d 0 Pacing 130 Kontrolle/βARKct/Betablocker vs. d 14 Pacing 130 Kontrolle/βARKct/Betablocker) (> Abb. 37).

Am Tag 56 konnte im Vergleich zum Tag 14 in beiden Therapiegruppen (βARKct und Betablocker) ein deutlicher, wenngleich auch nicht signifikanter Wiederanstieg der dp/dt Mittelwerte sowohl unter Baseline als auch unter Pacingbedingungen

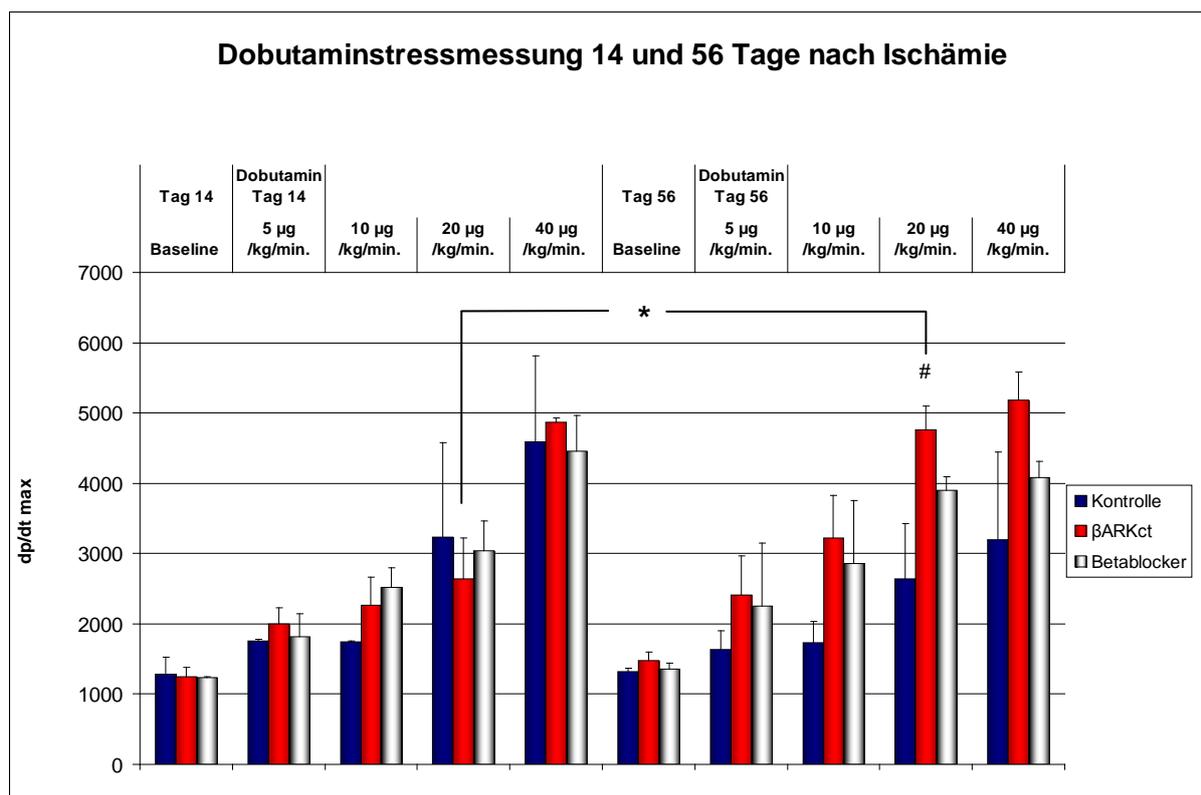
beobachtet werden (Baseline  $\beta$ ARKct d 56  $1473,4 \pm 127,7$  mmHg bzw. Pacing  $\beta$ ARKct d 14  $1357,3 \pm 164,4$  mmHg vs.  $\beta$ ARKct d 56  $1626,5 \pm 127,8$  mmHg und Baseline Betablocker d 56  $1361,1 \pm 77,9$  mmHg bzw. Pacing Betablocker d 14  $1389,6 \pm 17,9$  mmHg vs. Betablocker d 56  $1509,3 \pm 197,8$  mmHg,  $p=n.s.$  vs. d 14 Baseline und d 14 Pacing), während sich die Kontrolle unter Baselinebedingungen nur geringgradig erholte (Baseline Kontrolle d 56  $1324,8 \pm 49,2$  mmHg,  $p=n.s.$  vs. d 14 Baseline) und unter Belastung bzw. Reservebedingungen (Pacing 130) sogar noch weiter in ihrer Kontraktionsleistung abfiel (Pacing Kontrolle d 14  $1301,3 \pm 264,4$  mmHg vs. Kontrolle d 56  $1188,9 \pm 125,9$  mmHg,  $p=n.s.$  vs. d 14 Pacing) (> Abb. 37).



Baseline: Kontrolle  $n=4$ ,  $\beta$ ARKct  $n=8$ , Betablocker  $n=4$  vor Ischämie und an d 56,  $n=3$  d 14, dp/dt max MEAN  $\pm$  SEM,  $p=n.s.$  für d 14 Baseline vs. d 56 Baseline bzw.

Pacing 130: Kontrolle  $n=3$ ,  $\beta$ ARKct  $n=5$ , Betablocker  $n=4$  vor Ischämie, Kontrolle  $n=5$ ,  $\beta$ ARKct  $n=8$ , Betablocker  $n=3$  d 14 und Kontrolle  $n=2$ ,  $\beta$ ARKct  $n=5$ , Betablocker  $n=4$  d 56 dp/dt max MEAN  $\pm$  SEM,  $p=n.s.$  für d 14 Pacing vs. d 56 Pacing.

**Abb. 37** dp/dt max unter Baselinebedingungen sowie rechtsatrialem Pacing an Tag 0, 14 und 56.



βARKct d 14 n=4, βARKct d 56 n=6, dp/dt max \* MEAN ± SEM, p<0,05 für βARKct 20 µg/kg/min. Dobutamin d 56 vs. βARKct 20 µg/kg/min. Dobutamin 14 d nach Ischämie sowie Kontrolle d 56 n=3, βARKct d 56 n=6, dp/dt max # MEAN ± SEM, p<0,05 für βARKct 20 µg/kg/min. Dobutamin d 56 vs. Kontrolle 20 µg/kg/min. Dobutamin d 56 vor Sternotomie

**Abb. 38** dp/dt max unter Baseline und Dobutaminstressmessung an Tag 14 und 56.

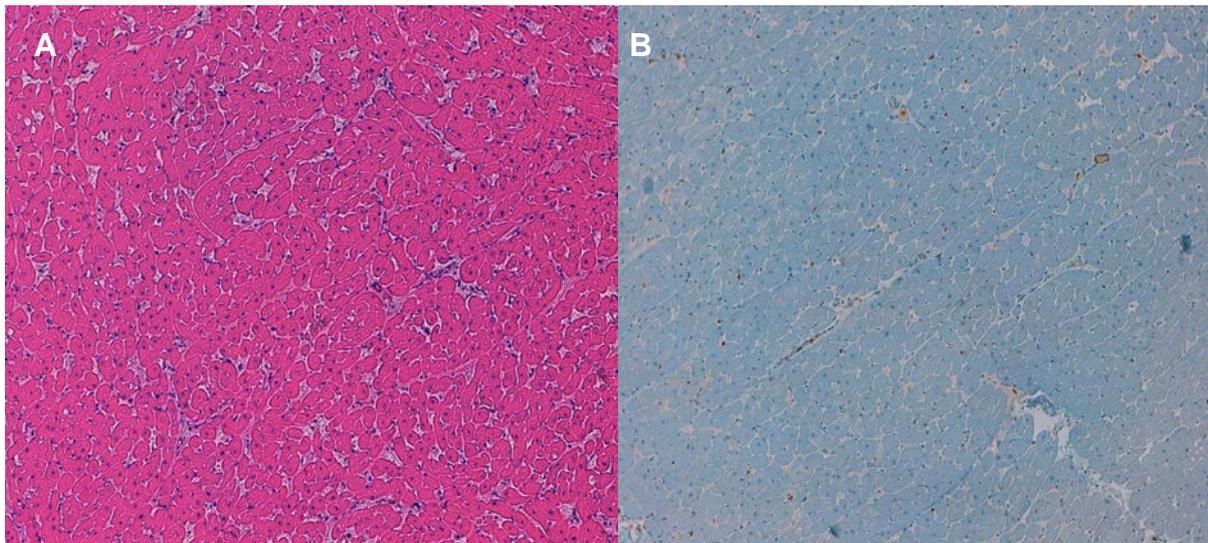
Die positiv inotrope Dobutaminwirkung spiegelte sich deutlich in einem korrelierten Anstieg des dp/dt mit steigender Dobutaminkonzentration wider. Dabei kam es zunächst an Tag 14 bei steigender Dobutaminkonzentration zu einem für alle Gruppen homogenen Anstieg des dp/dt, der sich bei gleicher Dobutaminkonzentration zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nicht signifikant unterschied (p=n.s. Kontrolle vs. βARKct vs. Betablocker d 14 Baseline, Dobutamin 5, 10, 20 und 40 µg/kg/min.) (> Abb. 38).

Am Tag 56 zeigte sich bei einer Dobutaminkonzentration von 20 µg/kg/min. eine signifikante Verbesserung der Kontraktilität für die βARKct-Gruppe im Vergleich zur gleichen Konzentration an Tag 14 (βARKct d 14 Dobutamin 20 µg/kg/min. 2636,4 ± 587,3 mmHg vs. βARKct d 56 Dobutamin 20 µg/kg/min. 4760,0 ± 344,2 mmHg). Ferner konnte auch eine signifikant gesteigerte Kontraktionsleistung für die βARKct-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 56 für diese Konzentration nachgewiesen werden (βARKct d 56 Dobutamin 20 µg/kg/min. 4760,0 ± 344,2 mmHg vs. Kontrolle d 56 Dobutamin 20 µg/kg/min. 2644,6 ± 780,1 mmHg, p<0,05) (> Abb.

38).

### 3. Histopathologische Auswertungen

Von allen Tieren der  $\beta$ ARKct-Gruppe wurden Myokardproben aus dem Area at Risk-Areal zur histopathologischen Analyse in das Pathologische Institut der Ludwig-Maximilians-Universität gegeben, um gegebenenfalls pathologische Nebenwirkungen des AAV2/9 mediierten  $\beta$ ARKct Gentransfers am Herzen nachzuweisen. Dabei ergab die Begutachtung keinen ausreichenden Anhalt für das Vorliegen einer Entzündung bzw. einer Myokarditis in den Proben. Vereinzelt lagen T-Zellen (CD3) im Myokard vor (> Abb. 39). In der Probe "IS 38 DI-2" ließen sich nur geringgradig frische Nekrosen des Myokards nachweisen. Ansonsten zeigten sich lediglich ältere, vernarbte Infarktareale bei Zustand nach LAD-Okklusion.



**Abb. 39** Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung des Schweinemyokards ohne pathologischen Befund (A) und CD3-Immunhistochemie mit vereinzelt intramyokardialen T-Zellen (B) am Beispiel der IS 15.

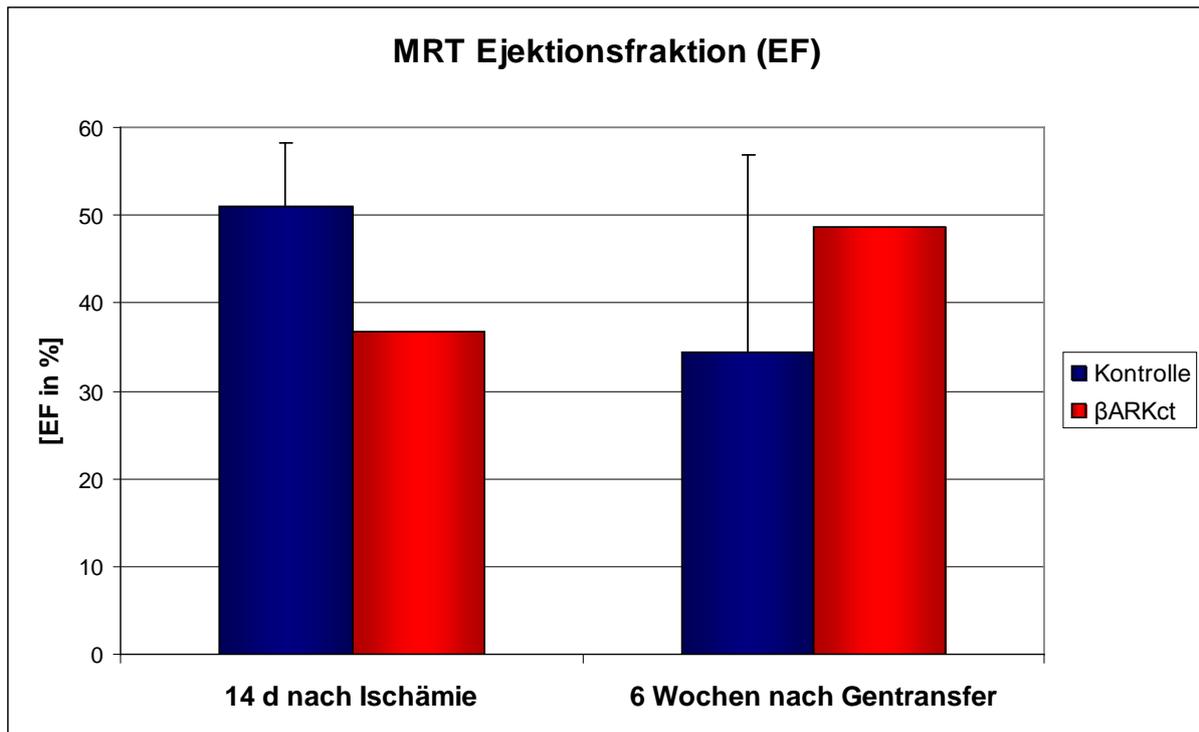
Paraffin-Block / Tiernr.	Entzündung	frische Myokard-Nekrosen	intramyokardiale T-Zellen (CD3)	sonstige
IS 9	keine	keine	minimal	-
IS 10	keine	keine	minimal	-
IS 15	keine	keine	minimal	-
IS 17	keine	keine	minimal	-
IS 19	keine	keine	minimal	narbig fibrosierte Infarktareal-Anteile
IS 22	keine	keine	minimal	-
IS 25	sehr geringe lymphozytäre Infiltrate	keine	gering	-
IS 26	keine	keine	minimal	-
IS 38 DI-1	keine	keine	minimal	narbig fibrosierte Infarktareal-Anteile
IS 38 DI-2	keine	kleine Areale (ca. 5-10 %)	minimal	narbig fibrosierte Infarktareal-Anteile (90 %)

**Tabelle 5:** Histopathologische Ergebnisse der  $\beta$ ARKct-transduzierten Myokardproben. IS = Ischämie, DI = Direktinjektion. Anmerkung: Bei der Probe IS 38 DI erfolgte eine histopathologische Beurteilung von zwei Myokardproben (IS 38 DI-1 und -2).

## 4. MRT (Magnetresonanztomographie)

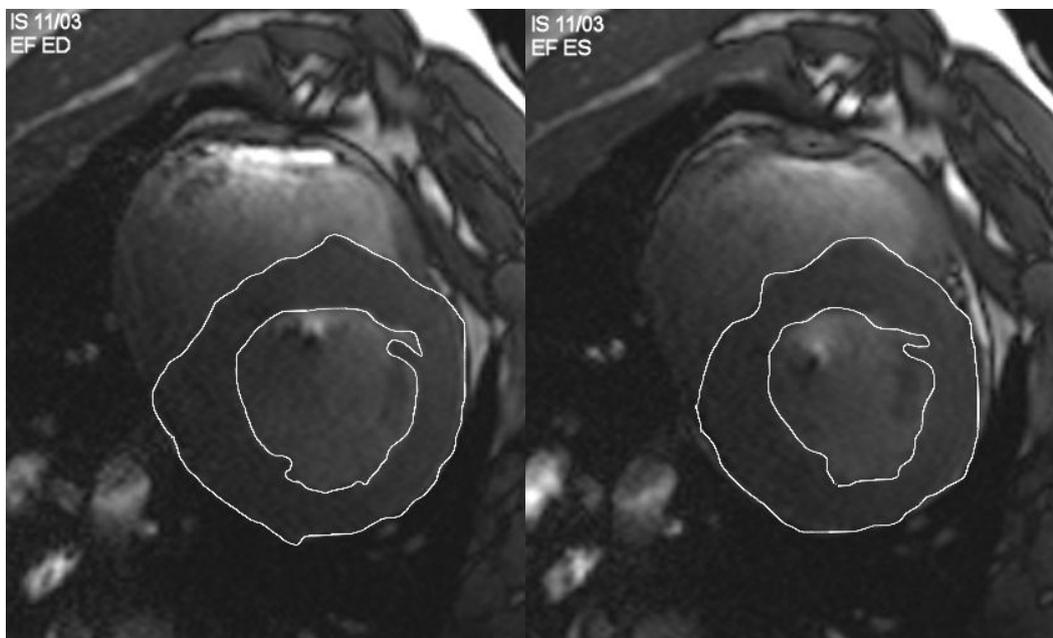
### 4.1. MRT Ejektionsfraktionsmessung

Ein zusätzlicher Vergleich der Kontrollgruppe mit der  $\beta$ ARKct-Gruppe konnte durch am Tag 14 und Tag 56 durchgeführte MRT-Untersuchungen gewonnen werden. Dabei zeichnete sich für die im MRT berechnete Ejektionsfraktion ein ähnlicher Effekt, wie bei der mittels Angiographie ermittelten EF ab. Die Kontrolltiere fielen im Vergleich zum Tag 14 am Tag 56 weiter mit der EF ab, während das  $\beta$ ARKct behandelte Tier am Tag 56 einen signifikanten Anstieg der EF im Vergleich zum Tag 14 und der Kontrollgruppe aufzeigte (Kontrolle  $34,4 \pm 22,4$  % n=2 vs.  $\beta$ ARKct  $48,6$  % n=1 (p=n.s.) (> Abb. 40). Aufgrund der geringen Gruppengröße können diese Ergebnisse jedoch nur als exemplarisch ergänzend zu den bisher eruierten angesehen werden.

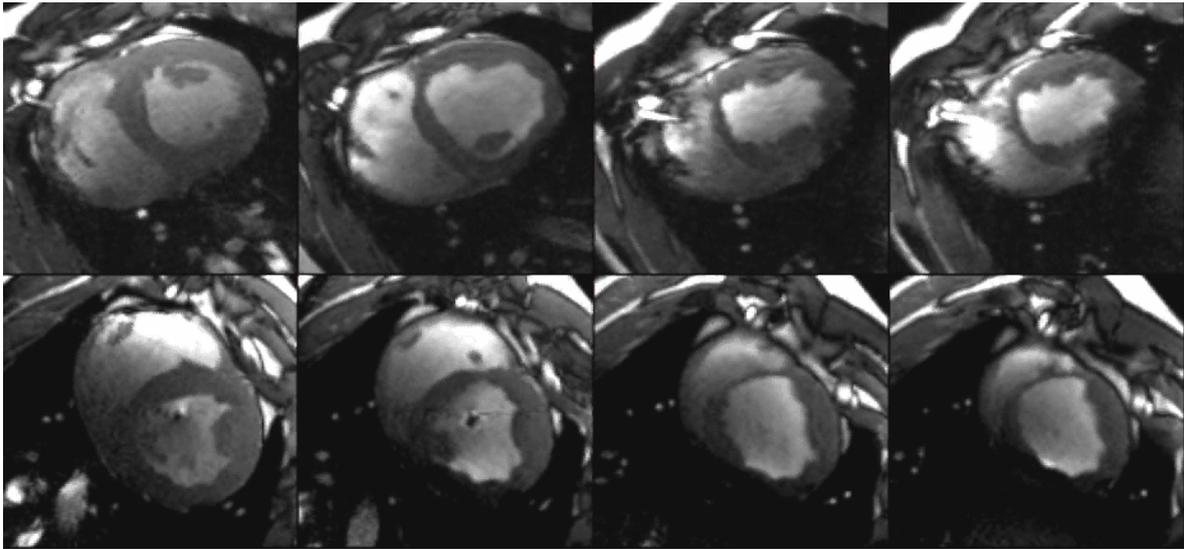


Kontrolle n= 2, βARKct n=1, βARKct d 56 vs. βARKct 14 d nach Ischämie;  
βARKct vs. Kontrolle am d 56.

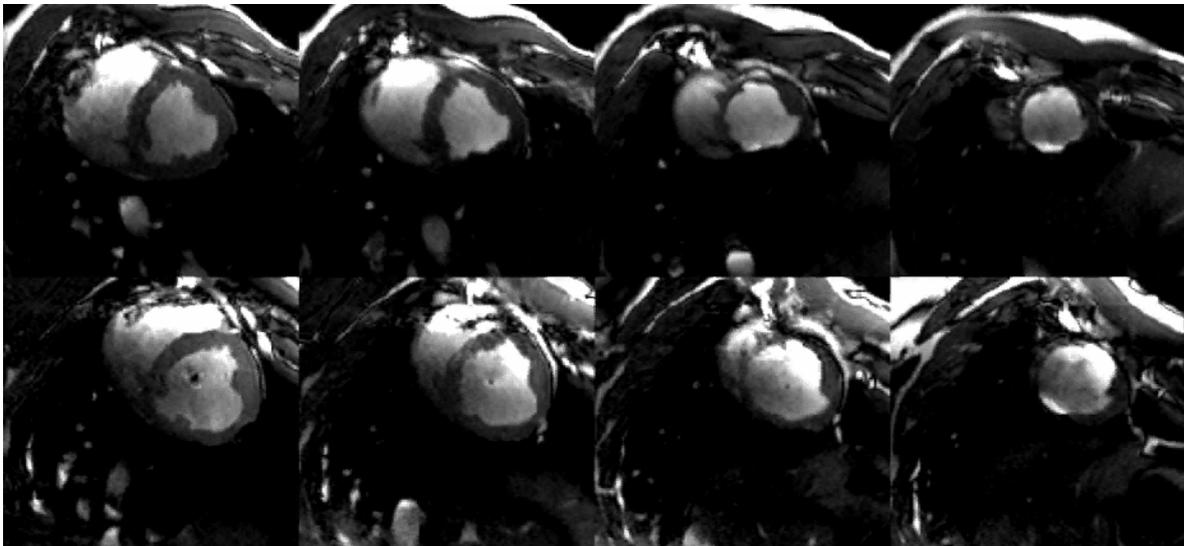
**Abb. 40** MRT-Ejektionsfraktion Kontrolle (n=2) vs. βARKct (n=1).



**Abb. 41** MRT-Ejektionsfraktion am Beispiel der Ischämie 11 (Kontrolltier). Links die enddiastolische EF, rechts die endsystolische EF.

**Kurzachsen Cine MRT: 3 Tesla****EF 44 %****EF 26 %**

**Abb. 42** Funktion Kontrolltier IS 11 im Verlauf EF 44 % am d 14 und EF 26 % am d 56.

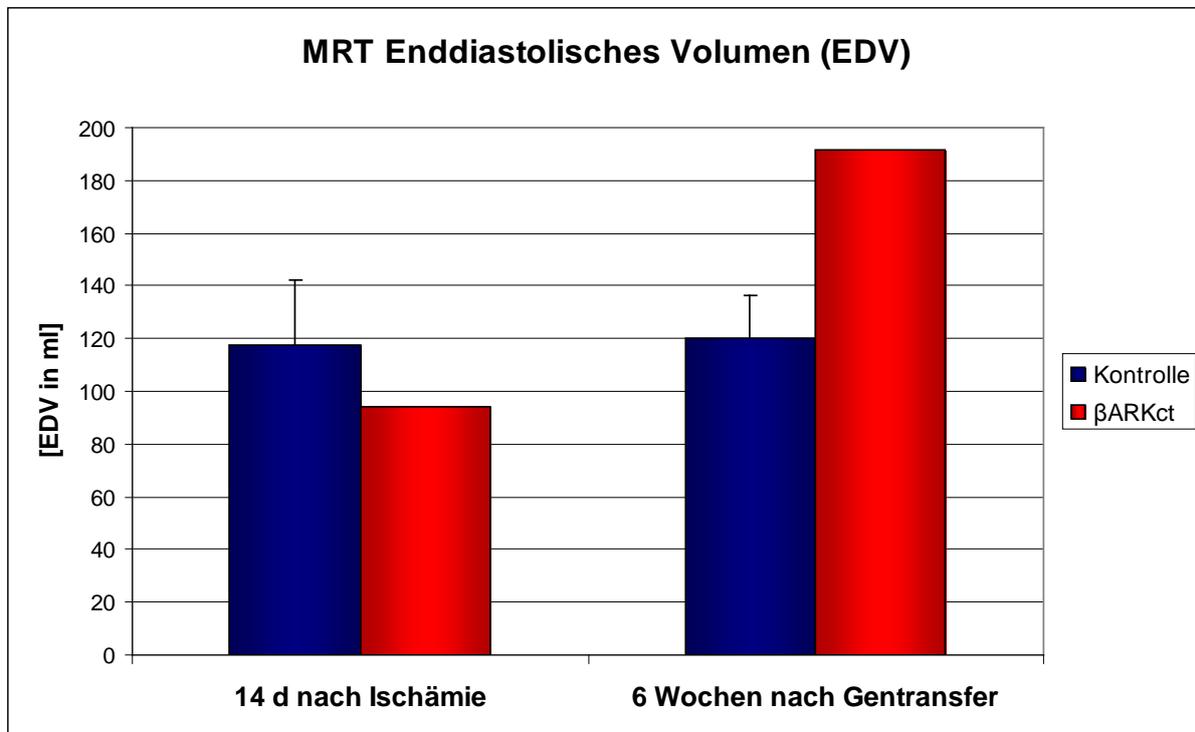
**Kurzachsen Cine MRT: 3 Tesla****EF 37 %****EF 49 %**

**Abb. 43** Funktion  $\beta$ ARKct-Tier IS 19 im Verlauf EF 37 % am d 14 und EF 49 % am d 56.

**4.2. Messung des enddiastolischen Volumens mittels MRT**

Die Ergebnisse der MRT-EF korrelierten mit denen für das mittels MRT gemessene Enddiastolische Volumen (EDV). Auch hier zeigte sich eine deutliche Steigerung des

Enddiastolischen Volumens bei dem  $\beta$ ARKct-Tier ( $\beta$ ARKct 94,1 ml vs.  $\beta$ ARKct 191,8 ml, n=1). Die beiden Kontrolltiere konnten das EDV hingegen nur geringgradig steigern. (Kontrolle  $120,2 \pm 16,2$  ml n=2 vs.  $\beta$ ARKct 191,8 ml, n=1) (> Abb. 44).

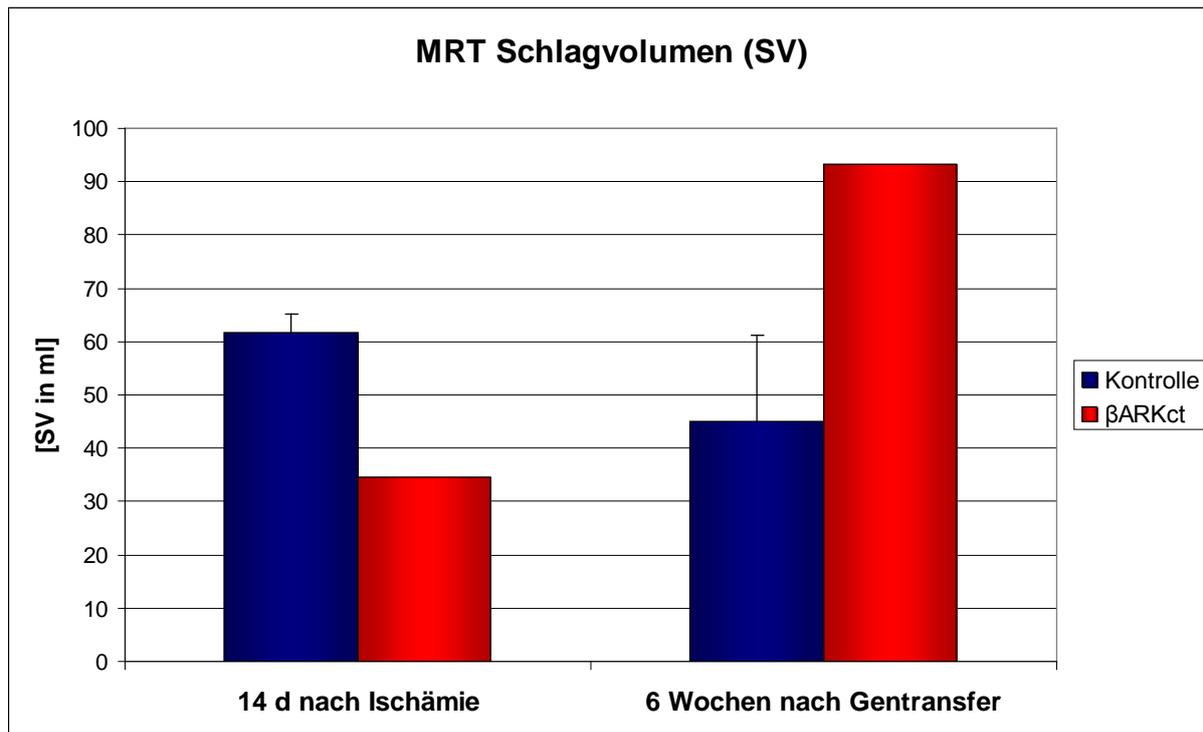


Kontrolle n= 2,  $\beta$ ARKct n=1,  $\beta$ ARKct d 56 vs.  $\beta$ ARKct 14 d nach Ischämie sowie  $\beta$ ARKct vs. Kontrolle am d 56.

**Abb. 44** Vergleich des mittels MRT gemessenen Enddiastolischen Volumens am d 14 und d 56 post Ischämie  $\beta$ ARKct-Tier.

#### 4.3. Bestimmung des Schlagvolumens mittels MRT

Für die Berechnung des Schlagvolumens (SV = Enddiastolisches Volumen – Endsystolisches Volumen) ergab sich ein gravierender Unterschied für den Vergleich des  $\beta$ ARKct-Tieres am Tag 14 und 56 ( $\beta$ ARKct 34,6 ml vs.  $\beta$ ARKct 93,3 ml, n=1). Für die Differenz zur Kontrollgruppe am Tag 56 ergab sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied (Kontrolle  $45,0 \pm 32,5$  ml n=2 vs.  $\beta$ ARKct 93,3 ml, n=1) (> Abb. 45).



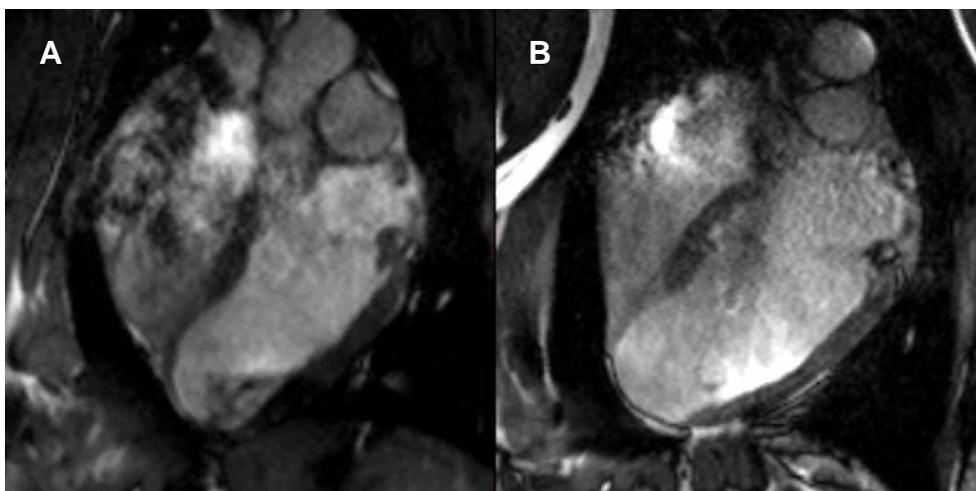
Kontrolle n= 2, betaARKct n=1, betaARKct d 56 vs. betaARKct 14 d nach Ischämie; betaARKct d 56 vs. Kontrolle d 56.

**Abb. 45** Vergleich des mittels MRT gemessenen Schlagvolumens am d 14 und d 56 post Ischämie.

#### 4.4. MRT Verlaufvergleich im 4-Kammerblick

Der Funktionsverlauf im MRT 4-Kammerblick, vor und nach Behandlung mit betaARKct, zeigte in der MRT-Bildserie eine deutliche Verbesserung der Kontraktilität für den Tag 56 gegenüber dem Tag 14 (> Abb. 46).

#### 4-Kammer Cine MRT: 3 Tesla



**Abb. 46** IS 09 (betaARKct-Tier) vor AAV2/9-betaARKct-Transduktion am d 14 (A) und 56 d nach Gentherapie (B).

## VII. DISKUSSION

### 1. AAV2/9 mediierte $\beta$ ARKct-Gentherapie als potentielle Therapieform in der chronischen Herzinsuffizienz

Grundsätzlich stellt die Entwicklung neuer Medikamente, die auf molekularer Ebene vom Zellinneren aus auf den  $\beta$ -Rezeptor wirken ein großes Potential dar. Hierdurch könnte eine komplett neue Klasse von Medikamenten entstehen, die möglicherweise eine deutlich höhere Effizienz als die momentan verfügbaren kardiovaskulären Therapeutika besitzen<sup>40</sup>. Die in den letzten Jahrzehnten eingesetzten Medikamente versuchen die neurohumorale Stimulation des Herzens zu blockieren.  $\beta$ -Blocker und die Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms zielen darauf ab, das Herz symptomatisch zu entlasten<sup>40</sup>. Zusammen mit Aldosteronantagonisten und Diuretika stellen sie die Standardtherapie in der Behandlung der Herzinsuffizienz dar. Doch ist selbst die Kombination dieser Agentien fern davon, die ideale Therapieform darzustellen, da sie bisher nicht in der Lage ist eine Heilung herbeizuführen<sup>1; 35</sup>. Zudem lässt sich in den letzten Jahren eine Stagnation in der Entwicklung neuer pharmakologischer, kardiovaskulär wirksamer Therapeutika feststellen<sup>35</sup>.

Der Einsatz von  $\beta$ -Adrenozeptor-Signaltransduktionskomponenten in der Gentherapie der Herzinsuffizienz (HI) ist bereits seit vielen Jahren in der Debatte<sup>112</sup>. Es ist offensichtlich, dass die Änderungen im myokardialen  $\beta$ -Adrenozeptor-System die negative Entwicklung einer Herzinsuffizienz im Menschen nicht nur begleiten, sondern diese auch forcieren. Diese zeigt sich zum einen in der Abnahme der  $\beta$ 1-adrenergen-Rezeptoren um 50 % und zum anderen in der funktionalen Entkopplung der im Myokard verbleibenden  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-adrenergen-Rezeptoren<sup>1; 35</sup>. Dabei ist die Regulation der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Signaltransduktionskaskade von fundamentaler Bedeutung für die physiologische Homöostase und die molekulare Antwort auf physiologische Perturbation im kardiovaskulären System<sup>23</sup>.

Erste Versuche des  $\beta$ ARKct-Gentransfers und der -Überexpression an kultivierten ventrikulären herzinsuffizienten Rattenkardiomyozyten, die aus spontaneously hypertensive heart failure (SHHF)-Ratten isoliert wurden, wiesen eine Normalisierung der kontraktilen Dysfunktion auf<sup>113</sup>. Dieser auf Einzelmyozytenebene beobachtete Effekt wurde von einer Umkehr der  $\beta$ AR-Entkopplung begleitet, der durch die

Zelluläre cAMP-Produktion gemessen wurde <sup>113</sup>. Andere wissenschaftliche Studien der chronischen Herzinsuffizienz in Mäuse- und Kaninchenmodellen <sup>114</sup> konnten bereits zeigen, dass die  $\beta$ -adrenerge-Rezeptor-Signaltransduktion durch Überexpression von  $\beta_2$ -adrenergen-Rezeptoren oder durch die Inhibition von GRK2 (=  $\beta$ ARK1) durch  $\beta$ ARKct verbessert wird und dadurch die Entwicklung einer Kardiomyopathie verhindert werden kann <sup>1; 34; 46; 47; 49</sup>. So ist  $\beta$ ARKct z.B. in der Lage, Schäden, die unter chronischer myokardialer Ischämie auftreten zu verringern <sup>114</sup>. Daneben konnte auch eine Unterbindung der kontraktile Dysfunktion in vivo, eine signifikante Erhöhung des Überlebens und verbesserte Belastungstoleranz gezeigt werden <sup>113</sup>. Aber auch vaskuläre Erkrankungen scheinen abhängig vom G-Protein gekoppelten Rezeptor-Signaling zu sein, denn in einem Rattenmodell der arteriellen Restenose konnte durch gezielte  $G_{\beta\gamma}$ -Inhibition mittels  $\beta$ ARKct eine signifikante Reduktion der intimalen Hyperplasie erzielt werden <sup>1</sup>.

Viele experimentelle Daten weisen also darauf hin, dass das  $\beta$ -adrenerge-Rezeptor-Signaltransduktionssystem eine Schlüsselrolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen spielt und somit einen wichtigen therapeutischen Ansatz zur Verbesserung der Funktion des Herzens darstellt <sup>1</sup>. Die Inhibition von GRK2 könnte somit eine signifikante Verbesserung der Therapie der Herzinsuffizienz ermöglichen <sup>115</sup>. Die Gentherapie bietet hier die Möglichkeit gezielt einzelne Proteine bzw. Rezeptoren zu beeinflussen. Als gentherapeutische Vektoren haben sich Systeme basierend auf Adeno-assoziierten Viren bewährt, die eine stabile langandauernde Expression bei fehlender Humanpathogenität gewährleisten <sup>1; 17; 55</sup>.

Um eine mögliche Anwendung eines AAV2/9- $\beta$ ARKct-Gentransfers in der Humanmedizin zu verifizieren, haben wir uns daher entschlossen, die kardiovaskulären Effekte einer myokardialen  $\beta$ ARKct-Langzeitüberexpression in einem präklinischen Schweinmodell der chronischen Herzinsuffizienz zu eruieren.

## 2. Anforderungen an das Versuchsmodell

### 2.1. Tierexperimentelles Modell der chronischen Herzinsuffizienz

Das Schwein steht dem Menschen bezüglich seiner Herzanatomie und -physiologie sehr nahe<sup>116-119</sup>. So ist nicht nur die Koronar Anatomie, sondern auch die Verteilung des Blutflusses in den verschiedenen Arealen und Strukturen des Schweineherzens mit der des Menschen vergleichbar<sup>119</sup>. Vor allem die koronare und kollaterale Zirkulation ist der des Menschen am nächsten<sup>120</sup>. Auch weisen Schweine, analog zum Menschen<sup>120</sup>, aufgrund der geringen Anzahl koronarer Kollateralen<sup>117, 121-122</sup> unter akuter myokardialer Ischämie einen kollateralen Blutfluss von nahezu 0 auf, während der Hund, als früher klassisch eingesetztes kardiologisches Versuchstier, einen extensiven kollateralen Restfluss zeigt<sup>120; 121</sup>. So führt eine akute koronare Okklusion beim Schwein sehr schnell zu einem transmuralen Infarkt, der anatomisch gesehen, die gesamte Area at Risk mit einschließt. Dabei ist die Infarktbildung ca. 45 Minuten nach Beginn der Okklusion fast vollständig abgeschlossen<sup>120</sup>.

Im Gegensatz dazu beträgt der canine kollaterale Restfluss bei Okklusion einer epikardialen Koronararterie subendokardial 5 - 10 ml/min./100g und subepikardial zwischen 20 und 30 ml/min./100 g<sup>120</sup>, was vor allem aus einer homogenen Distribution des Blutflusses in den Randbezirken des ischämischen Areals resultiert<sup>121</sup>. Nach 3 stündiger Okklusion zeigt sich beim Hund eine finale Infarktgröße, die ca. 75 % der anatomischen Area at Risk mit einschließt<sup>120</sup>. Anders als beim Menschen oder dem Schwein, antworten die Gefäße des Hundes in einem potentiellen Ischämiegebiet dabei nicht mit Gefäßwachstum. Weitere Kollateralen bilden sich lediglich in einer begrenzten subepikardialen Zone von ca. 3-4 mm an der lateralen Grenze zum ischämischen Myokard bis in das normal perfundierte Gewebe aus<sup>120</sup>.

Darüber hinaus beinhalten die Vorteile des Schweins gegenüber dem Hund als Versuchstier, neben der vorgenannten anatomischen und physiologischen Ähnlichkeit zum Menschen, eine bessere Konstitution sowie ethische und ökonomische Gesichtspunkte<sup>118</sup>. Dies und die Tatsache, dass das Schweineherz auf Manipulationen sogar empfindlicher als das menschliche reagiert, macht das Schwein zum optimalen Versuchstier für ein Großtiermodell der chronischen Herzinsuffizienz.

## 2.2. Grundlegende Anforderungen an eine erfolgreiche Gentherapie

Folgende grundlegende Anforderungen werden an eine erfolgreiche Gentherapie gestellt:

1. Eine stabile Langzeitexpression
2. Ein Ausbleiben der Immunantwort und sofern möglich, fehlende Toxizität
3. Eine hohe Wirksamkeit bzgl. der kardiomyozytären Transduktion mit ausreichend hohen Expressionsspiegeln, die auch physiologische Effekte zur Folge haben
4. Eine hohe Spezifität der kardiomyozytären Transduktion und damit die Eingrenzung evtl. toxischer Nebenwirkungen
5. Klar beschriebene schädliche/nützliche molekulare Ziele

und

6. Mittel, um diese Zielmoleküle in einer hinreichend großen Anzahl von Kardiomyozyten zu manipulieren<sup>35</sup>.

Die Transduktion der Kardiomyozyten durch den AAV2/9-medierten-Gentransfer erlaubt eine stabile Langzeitexpression von Transgenen, wie unserem  $\beta$ ARKct – Peptid, im Zielgewebe und hat damit das Potential für eine hochspezifische Behandlung<sup>56; 61; 63; 64; 65</sup>.

Da Adeno-assoziierte-Viren, im Gegensatz zu den Adenoviren, potentiell keine schädliche, inflammatorische Immunantwort verursachen, für den Menschen nicht pathogen sind, und auch die Morphologie und das Wachstum der transfizierten Zellen nicht beeinflussen, scheint mit ihnen der ideale Vektor gefunden zu sein<sup>1; 17; 55</sup>. Der Gewebetropismus des von uns verwendeten AAV2/9, in Kombination mit dem kardiospezifischen MLC-Promoter rundet die Effizienz und Sicherheit dieses Vektorsystems ab<sup>60; 67</sup> und sorgt für eine hohe Spezifität der Transduktion mit daraus resultierender physiologischer Wirkung.

Die nützlichen Ziele vorliegender Studie liegen in der Inhibition der GRK2-Aktivität durch die kompetitive Bindung der überexprimierten  $\beta$ ARKct an die  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des G-Protein-gekoppelten-Rezeptors. Durch die Unterbindung der aus einer GRK2-Kopplung resultierenden Phosphorylierung des Rezeptors, wird die Normalfunktion

der  $\beta$ -adrenergen-Rezeptor-Signaltransduktionskaskade wiederhergestellt<sup>114; 75</sup>.

Durch die Verwendung der selektiven druckregulierten Retroinfusion und die daraus resultierende verlängerte Kontaktzeit<sup>123</sup> konnte die Transduktion einer großen Anzahl von Kardiomyozyten sichergestellt werden.

Standardisierte Bedingungen des Versuchsaufbaus, der Ischämiezeit sowie eine Randomisierung der Tiere schufen die Voraussetzungen für eine objektive und reproduzierbare Generierung der Versuchsdaten. Dies wurde zusätzlich durch die strikte Einhaltung eines vorgeschriebenen Versuchsprotokolls gewährleistet.

### **3. Reliabilität und Validität des Versuchsmodells**

Die Schädigung des Herzens wurde in vorliegender Studie am Versuchstag 0 durch eine 90 minütige Ballon-Okklusion der LAD distal des ersten Diagonalastes (D1) reproduzierbar durchgeführt. Alle Tiere im Versuch wiesen am Versuchstag 14 post Ischämie deutliche Anzeichen einer linksventrikuläre Herzinsuffizienz in Form eines signifikanten, pathologischen LVEDP-Anstiegs<sup>114</sup> und eines signifikanten Absinkens der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) auf. Als weiterer Surrogatmarker kam es zu einem signifikanten Anstieg der Brain Natriuretic Peptide-Serumkonzentration<sup>124; 70</sup>. Die Veränderung dieser Parameter lassen sich auch in humanen Patienten mit akuter oder chronischer Herzinsuffizienz nachweisen<sup>124</sup>.

Für den regionalen myokardialen Blutfluss zeigte sich im LAD-Areal am Tag 14 ein signifikanter Abfall der Mittelwerte aller Gruppen gegenüber dem Kontrollareal (RCx). D.h. der regionale myokardiale Blutfluss im LAD-Areal war gegenüber dem RCx Areal kennzeichnend reduziert.

Die Reproduzierbarkeit der Infarktinduzierung konnte sowohl für die Infarktgröße in % am linken Ventrikel, als auch für die Infarktgröße in % am postokklusiven Versorgungsgebiet (Area at risk) bewiesen werden. Diese wiesen zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf und zeigten damit ein identisches Ausmaß. Dies belegt zum einen die tatsächliche Infarzierung der Herzen und validiert zum anderen die Reliabilität des hier verwandten Infarktmodells.

Dennoch eignet sich die hier angewandte Methode der eindimensionalen Flächenanteilsberechnung des Infarkts am linken Ventrikel nur bedingt, um eine

genaue Aussage über die tatsächliche Infarktgröße zu erhalten. Im Rahmen einer neuen Studie, sollte die Infarktgrößenbestimmung daher besser anhand einer wesentlich aussagekräftigeren, dreidimensionalen Volumenanteilsberechnung erfolgen<sup>96; 104</sup>.

Ferner konnte in vorliegender Arbeit der AAV2/9- $\beta$ ARKct-Transduktionsnachweis erbracht werden. Dies geschah sowohl *in vitro*, durch die Transfektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten (Western Blot), wie auch *in vivo*, durch die Transduktion der Schweinekardiomyozyten mit lacZ als Markergen (Histologie) bzw. der Überexpression von  $\beta$ ARKct (Western Blot).

Aufgrund der relativ geringen Konzentration des  $\beta$ ARKct-Proteins in den Kardiomyozyten nach retrograder Applikation in einer Konzentration von AAV2/9- $\beta$ ARKct  $1 \times 10^{12}$  gc mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion in die anteriore interventrikuläre Vene, gelang der Direktnachweis mittels Proteinanalyse durch Western Blot nicht. Dies lag an der relativ niedrigen Ausgangskonzentration des AAV2/9- $\beta$ ARKct-Konstrukts, das leider bis zum Ende der Studie nicht in einer wesentlich höheren Konzentration hergestellt werden konnte. Daher wurde einem weiteren Tier AAV2/9- $\beta$ ARKct in einer Konzentration von  $1 \times 10^{13}$  gc mittels Direktinjektion retrograd in das LAD-Areal appliziert. Diese Applikationsform eignet sich jedoch nur für den Nachweis, da durch die Direktinjektionsnadel des Katheters eine vermeidbare Läsion im Gefäß und Myokard gesetzt und eine Expression nur auf der Injektionsseite gewährleistet wird<sup>1</sup>.

Die Direktinjektion des AAV-Vektors in die ventrikuläre Wand zeigte eine signifikante Induktion der Expression des Transgens. Dank der daraus resultierenden deutlich höheren Protein-Gewebekonzentration konnte für dieses Tier der eindeutige Transduktionsnachweis erbracht werden. Der Protein-Nachweis ist somit, wie auch die Effekte einer  $\beta$ ARKct-Gentherapie<sup>51</sup>, Konzentrationsabhängig und weist somit eine starke Korrelation zwischen der Vektordosis und der Transduktionseffizienz auf<sup>64</sup>.

Um die Effekte von  $\beta$ ARKct auf molekularer Ebene besser beurteilen zu können, sollte in zukünftigen präklinischen Großtierstudien eine Messung der  $\beta$ AR-Dichte, der Adenylylcyclase- sowie der GRK2-Aktivität erfolgen<sup>114</sup>. In Versuchen zur akuten Ischämie am Kaninchenherzen konnten hier schon Effekte wie eine verminderte  $\beta$ AR-Dichte und verringerte basale und agonist-stimulierte Adenylylcyclase-Aktivität sowohl im ischämischen Infarktareal, wie auch im nicht ischämischen Anteil des

linken Ventrikels beobachtet werden<sup>114</sup>. Diese Ergebnisse sind auch unter chronischer Herzinsuffizienz zu erwarten<sup>114; 75</sup>.

#### **4. Gentransfer des ischämischen Myokards mittels Selektiver druckregulierter Retroinfusion**

Die von uns eingesetzte selektive druckregulierte Retroinfusion konnte sowohl in in vivo Experimenten, als auch in Patienten bereits protektive Eigenschaften gegen die akute myokardiale Ischämie zeigen<sup>68, 93-94, 123</sup>. Durch diese Technik ist es möglich Medikamente, Genkonstrukte oder Zellen direkt in das ischämische Zielareal einzubringen, wo diese dann ihre kardioprotektiven Effekte potenziert entfalten können<sup>123</sup>. Dabei hängt die Effizienz der Retroinfusion zum einen von der selektiven Katheterisierung der das ischämische Gebiet drainierenden Vene ab, ohne dabei jedoch den antegraden Blutfluss in nicht ischämisches Gewebe zu beeinflussen<sup>68</sup>. Zum anderen ist sie von der Druckregulierung des retrograden Flusses, die eine Grundvoraussetzung für die Optimierung der Effektivität durch das Verhindern einer Unter- oder Überperfusion des ischämischen Myokardareals darstellt, abhängig<sup>68</sup>.

Frühere Studien zum perkutanen transluminalen Gentransfer, wie z. B. die systemische intravenöse oder intraarterielle Injektion, zeigten eine vergleichsweise geringe myokardiale Genexpression<sup>123</sup>. Weitere Versuche mit einer perikardialen Applikation von adenoviralen Vektoren konnten zwar die systemische Kontamination mit dem Virus limitieren, waren jedoch bezüglich der Genexpression auf das parietale und viszerale Perikard limitiert<sup>123</sup> und selbst nach Doxycyclin-Vorbehandlung nicht in der Lage eine myokardiale Genexpression mit einer homogenen transmuralen Verteilung zu gewährleisten<sup>123</sup>. Ein wichtiger limitierender Faktor hierfür liegt auch in der zu kurzen Verweildauer des adenoviralen Vektors auf den Endothelzellen<sup>123</sup>.

Die Verlängerung der Kontaktzeit des zu applizierenden Agens durch die selektive druckregulierte Retroinfusion in die Koronarvene führt zu einer erhöhten Konzentration<sup>123</sup> und damit verbesserten Gewebefixierung. So konnte in angiographischen Studien an Menschen und Schweinen eine um bis zu zehnfach verlängerte Kontaktzeit erzielt werden<sup>68</sup>. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass durch die selektive druckregulierte Retroinfusion die myokardialen Konzentrationen von Betablockern und Kalziumantagonisten im ischämischen

Myokard erhöht wurden<sup>68, 123</sup>.

Dem Konzept der regionalen Medikamentenapplikation mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion folgend, zeigten Versuche mit adenovirus mediiertem reporter Gentransfer eine wesentliche Erhöhung der Transferrate mittels selektiver druckregulierter Retroinfusion im Vergleich zu einer antegraden Applikation in die LAD<sup>68, 123</sup>. Dabei erfuhren die RCx-Region und auch andere Organe laut PCR keinerlei Transfektion. Dennoch kann eine systemische Kontamination aufgrund venovenöser und venoarterieller Shunts nicht vollständig ausgeschlossen werden<sup>68</sup>.

Wenngleich die myokardiale  $\beta$ ARKct-Proteinkonzentration nach selektiver druckregulierter Retroinfusion von  $\beta$ ARKct ( $1 \times 10^{12}$  gc) in unserer Studie nicht ausreichend war, um sie direkt mittels Western Blot nachzuweisen, war sie dennoch hoch genug, um hämodynamisch messbare, therapeutische Effekte zu erzielen.

## **5. AAV2/9- $\beta$ ARKct-Gentherapie verbessert die kardiale Funktion in einem Modell der chronischen Herzinsuffizienz**

Die GRK2-Inhibition durch  $\beta$ ARKct-Überexpression führte zu einer signifikanten Verbesserung der linksventrikulären Funktion (LVEDP) und konnte damit, ähnlich wie in den vorangegangenen Studien am Kleintier<sup>114</sup>, das Ausmaß der experimentell induzierten Herzinsuffizienz deutlich verringern. Die Ejektionsfraktion als Kontraktilitätsparameter der auxotonen Phase der Herzkontraktion sowie als Maß für die Ventrikelentleerung konnte ebenfalls signifikant verbessert werden. Für den Kontraktilitätsindex dp/dt zeigte sich nach Gentherapie am Tag 56 für die  $\beta$ ARKct-Gruppe ein Wiederanstieg unter Baseline- und Pacingbedingungen. Dieser fiel unter Belastung mit Dobutamin signifikant für eine Dobutaminkonzentration von  $20 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ . sowohl gegenüber der Kontrolle am Tag 56, wie auch gegenüber der  $\beta$ ARKct-Gruppe am Tag 14 bei gleicher Konzentration aus. Die BNP-Serumspiegel normalisierten sich, wenngleich auch nicht in signifikantem Ausmaß.

Für die regionale Myokardfunktion in Form der Subendokardialen-Segment-Verkürzung zeigte sich eine signifikante Aufrechterhaltung der Kontraktilität selbst unter Reservebedingungen gegenüber der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrollgruppe eine signifikante Verringerung der Kontraktilität. Dies

Korreliert mit Ergebnissen, die bereits für in vitro Versuche an einzelnen Kardiomyozyten<sup>113</sup>, wie auch am Kleintier<sup>114</sup> gezeigt werden konnten.

Da eine Steigerung der Kontraktilität nicht mit einer Verbesserung der Durchblutung einhergeht, blieb der regionale Myokardiale Blutfluss in der LAD über die Zeit für die Baseline, wie auch für die Bedingungen erhöhter koronarer Reserve konstant.

Auch die Wandbelastungsstörungen als Funktionsparameter des linken Ventrikels waren bei den  $\beta$ ARKct-Tieren unter Dobutaminapplikation deutlich geringer ausgeprägt, was sich in einer verbesserten Kontraktilität widerspiegelte<sup>113; 114</sup>.

Ergänzend hierzu unterstrichen die mittels MRT generierten Daten die bisherigen Erkenntnisse. Neben dem Anstieg der Ejektionsfraktion gegenüber der Kontrollgruppe, deren noch weiter abgesunkene EF für eine dauerhafte und irreparable Herzinsuffizienz mit verminderter Dehnbarkeit des linken Ventrikels sprach, zeigte sich auch für das Schlagvolumen des im MRT gemessenen  $\beta$ ARKct-Tieres ein deutlicher Anstieg und damit eine Verbesserung bezüglich der Ventrikelentleerung, der Kontraktilität und Dehnbarkeit des linken Ventrikels.

Dabei kann die Verbesserung der Kontraktilität als Zeichen einer inotropen Langzeitunterstützung des Herzens ohne nachteilige Effekte angesehen und zusätzlich auf eine Umkehr des myokardialen Remodellings zurückgeführt werden<sup>112</sup>.

Zusätzlich waren wir durch den AAV2/9- $\beta$ ARKct Gentransfer in der Lage eine ausreichend hohe und lang anhaltende Genexpression zu generieren, die auch physiologische Effekte erzielte.

## **6. AAV2/9- $\beta$ ARKct-Gentherapie und die Betablocker-Therapie verbessern die Anzeichen einer Herzinsuffizienz in vergleichbarem Ausmaß**

Die am Versuchstag 14 begonnene Therapie mit dem Betablocker Bisoprolol konnte die globale Myokardfunktion in Form des LVEDP und der EF im Vergleich zur Kontrolle signifikant verbessern. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der  $\beta$ ARKct- und der Betablockergruppe. Ebenso konnte ein Absinken der BNP-Serumwerte mittels der Betablockertherapie in vergleichbarem Ausmaß zur

$\beta$ ARKct-Gentherapie erzielt werden. Die Betablocker-Therapie war ferner in der Lage, die Kontraktilität (dp/dt) unter Reservebedingungen (Pacing 130) im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu verbessern.

Auch wenn die Prognose vieler Patienten mit Herzinsuffizienz durch eine Betablockertherapie nachhaltig positiv beeinflusst werden kann, ist eine Heilung durch diese Therapieform jedoch nicht gegeben<sup>125</sup>. Dennoch ist sie heute ein fester Bestandteil zahlreicher Behandlungen.

## 7. Ausblick

Prinzipiell sollte es das Ziel der Gentherapie der Herzinsuffizienz sein, die molekularen Schlüsselmechanismen im kardialen Gewebe so zu beeinflussen, dass dadurch das Remodelling positiv beeinflusst, und die Kontraktilität wiederhergestellt wird<sup>35</sup>. Diese Effekte konnten wir für  $\beta$ ARKct in vorliegender Studie aufzeigen.

Dennoch gibt es auch hier eine Reihe limitierender Effekte. Zum Beispiel können wir nicht voraussagen inwieweit eine  $\beta$ ARKct-Gentherapie in der Lage ist, mit einer in der Klinik üblichen Kombinationstherapie, wie z. B. einem ACE-Hemmer und einem Betablocker zu konkurrieren.

Momentan erscheint die Pharmakotherapie gegenüber der Gentherapie noch sicherer, da diese zum richtigen Zeitpunkt und in der richtigen Dosierung appliziert werden kann, während durch die Gentherapie ein Protein in unkontrollierbarer Konzentration über einen längeren, unbestimmten Zeitraum exprimiert wird<sup>11</sup>. Dabei ist gerade die Gewebekonzentration an  $\beta$ ARKct für die kardioprotektiven Effekte entscheidend<sup>51</sup>. So ist ein molares Verhältnis von 3:1 für  $\beta$ ARKct zu GRK2 nötig, um eine tatsächliche Funktionsverbesserung am insuffizienten Herzen zu erzielen<sup>51</sup>. Könnte jedoch ein direkter pharmakologischer Effekt auf die GRK2 erzielt werden, würde dies zu einer Verbesserung der globalen kontraktilen Funktion des Herzens während akuter oder chronischer myokardialer Ischämie oder Myokardinfarkt führen<sup>114</sup>. Der Einsatz von Catecholaminen, intra-aortalen Ballonpumpen oder auch ventrikulären Unterstützungssystemen könnte dadurch genauso reduziert werden, wie ausgedehnte intensivmedizinische Aufenthalte<sup>114</sup>. Auch die Anzahl der Krankenhausaufenthalte könnten eventuell limitiert werden<sup>114</sup>.

Auch ist bisher noch nichts über die Langzeiteffekte einer solchen Gentherapie bekannt. Es gibt bisher nur relativ wenige Daten über die tatsächliche Expressionsdauer von  $\beta$ ARKct im Myokard. In Mäuseversuchen konnte ein Expressionsanstieg nach AAV2/9 medierter Gentherapie mit einem anderen Konstrukt bis zum Tag 56 bestimmt werden<sup>65</sup>. Von der Adenovirus-Vektor medierten transgenen  $\beta$ ARKct-Expression in vivo ist bekannt, dass sie nach 2-3 Tagen nach dem Gentransfer ihren Höhepunkt erreicht und dann allmählich, aufgrund der Immunreaktion des Wirtes oder aufgrund des Abschaltens eines Promotors abfällt<sup>126</sup>.

Da die in vivo Infektiosität von Adeno-Viren oder auch Adeno-Assoziierten Viren im Gegensatz zur in vitro Infektiosität nicht 100 % erzielt<sup>113</sup>, werden trotz einer hohen natürlichen Affinität des AAV2/9 für kardiales Gewebe auch andere Organe außer dem Herzen transduziert<sup>65</sup>. Daher stellt sich die Frage, ob eine Erhöhung der Virus-Vektorkonstrukt-Konzentration nicht nur zu einer Verstärkung der erwünschten Effekte führt, oder ob dadurch unerwünschte Nebenwirkungen entstehen. Dies muss vor einem Einsatz am Menschen durch weitere Studien verifiziert werden.

Obwohl keine klare Überlegenheit der  $\beta$ ARKct-Gentherapie gegenüber der Betablockertherapie erkennbar ist, könnte diese Therapieform dennoch eine Alternative für Patienten mit einer zu erwartenden oder bestehenden Medikamentenunverträglichkeit oder bei Compliance-Problemen darstellen. Auch bestünde die Möglichkeit, Arzneimittelwechselwirkungen dank der  $\beta$ ARKct-Gentherapie zu umgehen. Patienten, die unerwünschte Nebenwirkungen in der Standardtherapie aufzeigen, könnten ebenso davon profitieren.

Sofern dies nicht gegeben ist, könnte evtl. auch eine Kombinationstherapie mit einem Betablocker angewandt werden<sup>50; 127</sup>, da Studien mit Calsequestrin-überexprimierenden Mäusen in einem Modell der Herzinsuffizienz in Kombination mit einer  $\beta$ ARKct-Expression und der dauerhaften Applikation von Metoprolol zu einer Erhöhung der Überlebensrate<sup>128</sup> und verbesserter kardialer Funktion im Vergleich zur Einzeltherapie führten<sup>129; 75</sup>. Dies spricht dafür, dass die GRK2-Inhibition wenig mit dem Agonismus der  $\beta$ -Adrenozeptoren gemein hat und sich beide Therapieformen ergänzen könnten um durch Reduktion der myokardialen GRK2-Spiegel und -Aktivität sowie durch Verhinderung der pathologischen  $\beta$ -Adrenergen Desensitivierung<sup>127</sup> letale Arrhythmien zu reduzieren und wünschenswerte

Remodellingprozesse zu begünstigen<sup>22</sup>.

Aufgrund einer nur einmalig erforderlichen Applikation im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung und der darauf folgenden myokardialen Langzeitexpression von  $\beta$ ARKct<sup>64</sup> stellt die  $\beta$ ARKct-Gentherapie eine kostengünstige Alternative zur konventionellen Therapie dar.

Obwohl viele Beweise die Theorie einer biochemischen Basis der Dysfunktion auf der Ebene der Kardiomyozyten unterstützen<sup>130</sup>, sind viele andere, für eine fortschreitende Herzinsuffizienz entscheidenden Mechanismen noch nicht entschlüsselt<sup>51</sup>. So besteht die Möglichkeit, dass die Inhibition anderer  $G_{\beta\gamma}$ -mediierter Signaltransduktionen<sup>75</sup> wie z.B. die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-kinase und der  $I_{K, Ach}$ -Kanäle einen positiven Beitrag zu dem Effekt von  $\beta$ ARKct unter Herzinsuffizienz beisteuern<sup>51</sup>. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass eine  $\beta$ ARKct-Überexpression auch die Phosphorylierung anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, wie z.B. Endothelin- und Angiotensin-Rezeptoren verhindert, wengleich dies mit einer verstärkten Signalwirkung dieser Rezeptorsysteme verbunden wäre<sup>51</sup>. Daher wird es in Zukunft eine steigende Anzahl von Molekülen, die als potentielle Ziele für die Behandlung der humanen Herzinsuffizienz in Frage kommen, geben<sup>35</sup>. Weitere intensive Forschung und ausgiebige Großtierversuche werden notwendig sein, bevor klinische Studien unternommen werden können<sup>35, 112</sup>. Eine voranschreitende Entwicklung der Virusvektoren wird dabei eine ebenso entscheidende Rolle spielen, wie Modifikationen der Gentransfermethoden<sup>35, 112, 130</sup>. Weiterführende präklinische Studien sollten den Effekt einer  $\beta$ ARKct-Gentherapie in Abhängigkeit von der Dosis testen. Ferner wäre es sinnvoll, auf die Anwesenheit von anti-AAV Antikörpern und die Sicherheit des Gentransfers zu prüfen<sup>112</sup>. Ein toxikologisches Profil, das potentielle Organschäden aufdeckt und eine pathologische Beurteilung von Entzündungsreaktionen sollte ebenfalls eingeschlossen werden<sup>112</sup>. Auch könnten die Effekte des Gentransfers auf die Energetik des Herzens sowie Arrhythmien aufgezeigt und die Kompatibilität mit bereits bestehenden Therapieformen der Herzinsuffizienz (ACE-Hemmer oder Betablocker) erforscht werden<sup>112</sup>.

Obwohl viele verschiedene Mechanismen an der Entstehung und Ausprägung einer Herzinsuffizienz beteiligt sind<sup>51</sup>, zielen die meisten therapeutischen Regimes immer noch auf extrakardiale Ziele, wie z.B. die Reduktion der Nachlast, ab<sup>130</sup>.

Anstrengungen, die kardiale Leistung zu verbessern, worin die essentielle Herausforderung in der Behandlung der Herzinsuffizienz liegt, sind weitestgehend auf eine inotrope Kurzzeitunterstützung limitiert<sup>130</sup>. So scheinen die eine Herzinsuffizienz begleitenden biochemischen Veränderungen auf der Ebene der Kardiomyozyten eher schädlich als protektiv zu sein. Erhöhte Spiegel von  $\beta$ ARK1 im Rahmen einer bestehenden Herzinsuffizienz, von denen man einst annahm, dass sie das Herz vor inotropen Stress schützen, verursachen einen Verlust der Kontraktilität, wie auch der inotropen Reserve<sup>130</sup>.

In diesem Modell konnten wir zeigen, dass die Inhibition von GRK2 (=  $\beta$ ARK1) eine molekulare Therapieform zur Verminderung der kardialen Dysfunktion in einem Schweinmodell der chronischen Herzinsuffizienz darstellt. Diese Erkenntnisse könnten einen wichtigen Beitrag für die Entwicklung klinisch relevanter Therapieverfahren zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz leisten<sup>50</sup>.

## VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Die akute und chronische myokardiale Ischämie geht trotz erhöhter endogener Catecholaminspiegel mit einer Desensitivierung der  $\beta$ -adrenozeptor-Signaltransduktionskaskade einher. Dies ist auf eine Aktivierung der G-Proteingekoppelten-Rezeptor-Kinase2 (GRK2), auch  $\beta$ ARK1 genannt, unter diesen Umständen zurückzuführen. Die Inhibition von GRK2 durch die Überexpression seines c-terminalen Peptids  $\beta$ ARKct (GRKct) konnte bereits eine Verbesserung der myokardialen Funktion in verschiedenen Nagetier- und Kaninchenmodellen des akuten Myokardinfarkts oder der chronischen Herzinsuffizienz zeigen. Daher wollten wir eruieren, ob eine Adeno-assoziierte-Virusvektor medierte Gentherapie von  $\beta$ ARKct in der Lage ist, die myokardiale Funktion in einem präklinischen Schweinemodell der chronischen Herzinsuffizienz aufrecht zu erhalten.

**Methoden:** An Schweinen (n=5 Kontrolle, n=8  $\beta$ ARKct, und n=5 Betablocker) wurden am Versuchstag 0 zunächst globale myokardiale Funktionsmessungen (Hämodynamik, Angiographie) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine 90 minütige perkutane Okklusion des Ramus interventricularis anterior (left anterior descending artery (LAD)), an die sich eine Reperusionsphase anschloss, um die Entwicklung einer chronischen Herzinsuffizienz zu induzieren. 14 Tage später wurden die hämodynamischen Messungen wiederholt, und zusätzlich durch die Messung des regionalen myokardialen Blutflusses sowie MRT-Messungen ergänzt, um die ventrikuläre Dysfunktion zu verifizieren. Nach Randomisierung erfolgte für die Kontrollgruppe eine selektive druckregulierte Retroinfusion mit 0,9 % NaCl-Lösung in die Vena interventricularis anterior (AIV), für die  $\beta$ ARKct-Gruppe eine selektive druckregulierte Retroinfusion mit einem kardioselektiven, stabil und lange exprimierenden AAV2/9- $\beta$ ARKct-Viruskonstrukt in die AIV und für die Betablockerguppe eine Behandlung mit Bisoprolol (2,5 mg/d oral). Die globale und regionale myokardiale Funktion wurde erneut 6 Wochen später (am Tag 56 der Studie) bestimmt. Für einige Tiere erfolgte wieder die MRT-Messung. Die Schweine wurden nun euthanasiert, das Herz entnommen und die Infarktgröße indirekt über die TTC-Färbung bestimmt. Es folgten Gewebeentnahmen für weitere Analysen (Histopathologie, Proteinnachweis, Mikrosphärenmessungen).

**Ergebnisse:** Die Überexpression von  $\beta$ ARKct verbesserte die linksventrikuläre

Ejektionsfraktion im Vergleich zur Kontrolle 56 Tage nach Induzierung der Herzinsuffizienz ( $27,4 \pm 2,0$  % Kontrolle vs.  $42,1 \pm 2,4$  %  $\beta$ ARKct vs.  $42,7 \pm 0,8$  Betablocker (MEAN  $\pm$  SEM, #:p<0,05). Der LVEDP sank signifikant nach  $\beta$ ARKct-Gentherapie, aber stieg in der Kontrollgruppe ( $17,9 \pm 0,4$  mmHg Kontrolle vs.  $12,9 \pm 1,1$  mmHg  $\beta$ ARKct, (MEAN  $\pm$  SEM, #:p<0,05)). Die Betablockergruppe war ebenfalls in der Lage die linksventrikuläre Funktion zu verbessern, jedoch nicht in dem Ausmaß wie  $\beta$ ARKct. Der Kontraktilitätsindex dp/dt wies bei einer Dobutaminkonzentration von 20  $\mu$ g/kg/min. für die  $\beta$ ARKct-Gruppe an Tag 56 eine signifikante Steigerung der Kontraktilität im Vergleich zur gleichen Konzentration an Tag 14 ( $\beta$ ARKct d 14 Dobutamin 20  $\mu$ g/kg/min.  $2636,4 \pm 587,3$  mmHg vs.  $\beta$ ARKct d 56 Dobutamin 20  $\mu$ g/kg/min.  $4760,0 \pm 344,2$  mmHg, \*:p<0,05) sowie gegenüber der Kontrollgruppe an Tag 56 für diese Konzentration ( $\beta$ ARKct d 56 Dobutamin 20  $\mu$ g/kg/min.  $4760,0 \pm 344,2$  mmHg vs. Kontrolle d 56 Dobutamin 20  $\mu$ g/kg/min.  $2644,6 \pm 780,1$  mmHg, #:p<0,05) auf. Zusätzlich war die Subendokardiale-Segmentverkürzung (SES) in % der nicht ischämischen RCx-Region als Maß für die regionale myokardiale Funktion in der  $\beta$ ARKct-Gruppe verbessert ( $42,2 \pm 7,8$  % Kontrolle vs.  $95,6 \pm 15,6$  %  $\beta$ ARKct (MEAN  $\pm$  SEM) Pacing 140, \$:p<0,05). Im Gegensatz dazu gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Ausmaßes des Infarktareals zwischen den einzelnen Gruppen ( $23,5 \pm 2,6$  % Kontrolle vs.  $22,2 \pm 3,7$  %  $\beta$ ARKct vs.  $22,3 \pm 0,8$  % Betablocker (MEAN  $\pm$  SEM), Infarktgröße in % des LV, p=n.s.). Der regionale myokardiale Blutfluss wies nach der ischämischen Schädigung unter Ruhebedingungen für alle Gruppen im LAD-Bereich keine signifikanten Veränderungen am Tag 56 auf ( $63,4 \pm 6,2$  % Kontrolle vs.  $61,6 \pm 3,3$  %  $\beta$ ARKct vs.  $63,9$  % Betablocker (MEAN  $\pm$  SEM) Baseline, p=n.s. vs. d 14 LAD). Des Weiteren waren wir in der Lage die DNA-Expression von AAV2/9 in den Kardiomyozyten nachzuweisen und die generierten Ergebnisse durch die Messungen im MRT zu verifizieren. Histopathologisch zeigten sich im transduzierten Myokard keinerlei Anzeichen für eine Entzündung.

**Schlussfolgerung:** Die Kardioselektive AAV2/9-medierte Gentherapie mit  $\beta$ ARKct verbessert die globale and regionale myokardiale Funktion in einem präklinischen Schweinmodell trotz initial gleichmäßig ausgebildeter Infarktgrößen über alle Gruppen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die AAV-medierte kardiale Gentherapie einen möglichen, neuen Therapieansatz darstellt und legen nahe, dass eine Langzeitgentherapie mit  $\beta$ ARKct in Zukunft eine mögliche Therapieform für Patienten

mit chronischer Herzinsuffizienz sein kann.

## IX. SUMMARY

Acute and chronic myocardial ischemia is accompanied by a desensitization of the beta-adrenoreceptor pathway despite increased levels of endogenous catecholamines. This is due to an activation of the G-protein-coupled receptor kinase2 (GRK2 or  $\beta$ ARK1) in these conditions. Inhibition of GRK2 by over expression of its c-terminal peptide  $\beta$ ARKct (GRKct) has been shown to improve myocardial function in various rodent and rabbit models of acute myocardial infarction or chronic heart failure. We therefore wanted to test, if adeno-associated viral vector mediated gene therapy of  $\beta$ ARKct is able to preserve myocardial function in a preclinical pig model.

**Methods:** At day 0 pigs (n=5 control group, n=8  $\beta$ ARKct group and n=5 betablocker group) underwent measurement of global myocardial function (haemodynamics, angiography). Afterwards, percutaneous left anterior descending artery (LAD) occlusion for 90 min. followed by reperfusion, to induce development of chronic heart failure. 14 days later baseline haemodynamics measurements were performed again and were supplemented by the measurement of the regional myocardial blood flow and MRT measurements, to verify the presence of left ventricular dysfunction. After randomization control was treated with 0.9 % NaCl solution by selective pressure regulated retroinfusion (SSR) into the anterior interventricular vein (AIV), SSR  $\beta$ ARKct Gene transfer into the AIV followed by using a cardioselctive AAV2/9- $\beta$ ARKct viral vector construct with a stable long term expression. The betablocker group was treated by daily oral administration of 2.5 mg Bisoprolol. Global and regional myocardial function was determined again 6 weeks later (day 56 of the study). For some animals MRT measurement took place once again. Pigs were then sacrificed, the heart removed and infarct size was determined indirectly using TTC staining. Tissue was harvested for further analysis (histopathology, protein verification, microsphere measurement).

**Results:** Overexpression of  $\beta$ ARKct ameliorated left ventricular ejection fraction compared to controls 56 days after induction of heart failure ( $27.4 \pm 2.0$  % control vs.  $42.1 \pm 2.4$  %  $\beta$ ARKct vs.  $42.7 \pm 0.8$  % betablocker (MEAN  $\pm$  SEM, #:p<0.05). LVEDP was preserved after  $\beta$ ARKct gene therapy, but elevated in the control group ( $17.9 \pm 0.4$  mmHg control vs.  $12.9 \pm 1.1$  mmHg  $\beta$ ARKct, (MEAN  $\pm$  SEM, #:p<0.05)). The

betablocker group was able to amend left ventricular function too, but not in the same dimension as  $\beta$ ARKct did. The contractility index dp/dt yielded a significant augmentation of contractility at a Dobutamine concentration of 20  $\mu$ g/kg/min for the  $\beta$ ARKct group at day 56 compared to the same concentration at day 14 ( $\beta$ ARKct d 14 Dobutamine 20  $\mu$ g/kg/min 2636.4  $\pm$  587.3 mmHg vs.  $\beta$ ARKct d 56 Dobutamine 20  $\mu$ g/kg/min 4760.0  $\pm$  344.2 mmHg, \*:p<0.05) as well as compared to the control at day 56 at this concentration ( $\beta$ ARKct d 56 Dobutamine 20  $\mu$ g/kg/min 4760.0  $\pm$  344.2 mmHg vs. control d 56 Dobutamine 20  $\mu$ g/kg/min 2644.6  $\pm$  780.1 mmHg, #:p<0.05). Additionally, subendocardial segment shortening (SES) in % of the non-ischemic RCx-region as a measure of regional myocardial function was improved in the  $\beta$ ARKct group (42.2  $\pm$  7.8 % control vs. 95.6  $\pm$  15.6 %  $\beta$ ARKct (MEAN  $\pm$  SEM) pacing 140, \$:p<0.05). In contrast to that, there was no significant difference detectable in the area of infarction between the groups (23.5  $\pm$  2.6 % control vs. 22.2  $\pm$  3.7 %  $\beta$ ARKct vs. 22.3  $\pm$  0.8 % betablocker (MEAN  $\pm$  SEM), infarct size in % of AAR, p=n.s.). At day 56 regional myocardial blood flow did not show any significant alteration after ischemia for all groups under baseline conditions in the area of the LAD (63.4  $\pm$  6.2 % control vs. 61.6  $\pm$  3.3 %  $\beta$ ARKct vs. 63.9 % betablocker (MEAN  $\pm$  SEM) Baseline, p=n.s. vs. d 14 LAD). Furthermore we were able to verify DNA expression of the AAV9 in cardiomyocytes and to verify the generated results through MRT measurements. Histopathological no signs of inflammation in the transduced myocardium were found.

**Conclusions:** AAV2/9-mediated selective cardiac gene therapy with  $\beta$ ARKct ameliorates global and regional myocardial function in a preclinical pig model despite equal degree of initial myocardial infarction. These findings show that AAV mediated cardiac gene therapy is a feasible approach and suggest that long term gene therapy with  $\beta$ ARKct is suitable for patients with chronic heart failure.

## X. LITERATURVERZEICHNIS

1. Eckhart AD, Koch WJ. Beta-Adrenergic gene therapy for cardiovascular disease. *Curr Control Trials Cardiovasc Med* 2000; 1:131-4.
2. Priebe HJ. Triggers of perioperative myocardial ischaemia and infarction. *Br J Anaesth* 2004; 93:9-20.
3. Gajos G. Optimal treatment for patients after myocardial infarction: some current concepts and controversies. *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118:43-51.
4. Bristow MR. Mechanistic and clinical rationales for using beta-blockers in heart failure. *J Card Fail* 2000; 6:8-14.
5. Parsi RAP, Elke. *Kardiologie · Angiologie*. 1. Auflage ed. München/Jena: Urban & Fischer Verlag; 2001; 159-89.
6. Kastrati A, Mehilli J, Schuhlen H, et al. A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel. *N Engl J Med* 2004; 350:232-8.
7. Thomas GS, Peter M.; Grace, Andrew. IN FOCUS *Kardiologie*. München/Jena,: ELSEVIER Urban & Fischer; 2008; 34-36.
8. Zwiener U. *Allgemeine und klinische Pathophysiologie*. Jena - Stuttgart: Gustav Fischer Verlag Jena - Stuttgart; 1993; 359-60; 365-78.
9. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91:2488-96.

10. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003; 361:13-20.
11. El-Armouche A, Eschenhagen T. Beta-adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 2009; 14:225-41.
12. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 1984; 311:819-23.
13. Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:248-54.
14. Pousset F, Isnard R, Lechat P, et al. Prognostic value of plasma endothelin-1 in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 1997; 18:254-8.
15. Estler C-JS, H. *Pharmakologie und Toxikologie Für Studium und Praxis*. 6 ed. Stuttgart - New York: Schattauer GmbH Verlag für Medizin und Naturwissenschaften; 2007; 10-16; 118-40; 481-82.
16. Barry WH. Mechanical dysfunction of the heart during and after ischemia. Unraveling the causes. *Circulation* 1990; 82:652-4.
17. Aktories KF, U; Hofmann, F; Starke, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10. ed. München: Elsevier GmbH München, Urban & Fischer Verlag München; 2009; 16-24; 25-26; 118-21; 141-42; 179-84; 196-98; 421-23.
18. Frey H-HL, W. . *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 2. ed. Stuttgart: Enke Verlag Stuttgart; 2002; 58-66; 71-73.

19. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 1999; 18:1723-9.
20. Hill SJ. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1:S27-37.
21. Kaumann AJ, Molenaar P. Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997; 355:667-81.
22. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* 2002; 415:206-12.
23. Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99:570-82.
24. W. Forth DH, W. Rummel, K. Starke. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7 ed. Heidelberg - Berlin - Oxford: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin - Oxford; 1996; 12-16; 115-20; 161-70; 182-86; 393.
25. Carman CV, Benovic JL. G-protein-coupled receptors: turn-ons and turn-offs. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8:335-44.
26. Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Mol Pharmacol* 2003; 63:9-18.
27. Pleger ST, Boucher M, Most P, Koch WJ. Targeting myocardial beta-adrenergic receptor signaling and calcium cycling for heart failure gene therapy. *J Card Fail* 2007; 13:401-14.
28. Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB J* 1990; 4:2881-9.

29. Krupnick JG, Benovic JL. The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38:289-319.
30. Lefkowitz RJ, Whalen EJ. beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:162-8.
31. Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:653-92.
32. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982; 307:205-11.
33. Penela P, Murga C, Ribas C, Tutor AS, Peregrin S, Mayor F, Jr. Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2006; 69:46-56.
34. Koch WJ, Rockman HA, Samama P, et al. Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor. *Science* 1995; 268:1350-3.
35. Vinge LE, Raake PW, Koch WJ. Gene therapy in heart failure. *Circ Res* 2008; 102:1458-70.
36. Ping P, Gelzer-Bell R, Roth DA, Kiel D, Insel PA, Hammond HK. Reduced beta-adrenergic receptor activation decreases G-protein expression and beta-adrenergic receptor kinase activity in porcine heart. *J Clin Invest* 1995; 95:1271-80.
37. Ungerer M, Bohm M, Elce JS, Erdmann E, Lohse MJ. Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 1993; 87:454-63.

38. Anderson KM, Eckhart AD, Willette RN, Koch WJ. The myocardial beta-adrenergic system in spontaneously hypertensive heart failure (SHHF) rats. *Hypertension* 1999; 33:402-7.
39. Harris CA, Chuang TT, Scorer CA. Expression of GRK2 is increased in the left ventricles of cardiomyopathic hamsters. *Basic Res Cardiol* 2001; 96:364-8.
40. Koch WJ. Heart failure gene therapy: closer to reality. Professor Walter Koch speaks to Christine Forder, commissioning editor. *Future Cardiol* 2009; 5:117-9.
41. Hansen JL, Theilade J, Aplin M, Sheikh SP. Role of G-protein-coupled receptor kinase 2 in the heart--do regulatory mechanisms open novel therapeutic perspectives? *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16:169-77.
42. Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ. The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase. *J Biol Chem* 1993; 268:8256-60.
43. Keys JR, Koch WJ. The adrenergic pathway and heart failure. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59:13-30.
44. Drazner MH, Peppel KC, Dyer S, Grant AO, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Potentiation of beta-adrenergic signaling by adenoviral-mediated gene transfer in adult rabbit ventricular myocytes. *J Clin Invest* 1997; 99:288-96.
45. Dorn GW, 2nd, Tepe NM, Lorenz JN, Koch WJ, Liggett SB. Low- and high-level transgenic expression of beta2-adrenergic receptors differentially affect cardiac hypertrophy and function in Galphaq-overexpressing mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:6400-5.

46. Shah AS, White DC, Emani S, et al. In vivo ventricular gene delivery of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. *Circulation* 2001; 103:1311-6.
47. White DC, Hata JA, Shah AS, Glower DD, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Preservation of myocardial beta-adrenergic receptor signaling delays the development of heart failure after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:5428-33.
48. Williams ML, Hata JA, Schroder J, et al. Targeted beta-adrenergic receptor kinase (betaARK1) inhibition by gene transfer in failing human hearts. *Circulation* 2004; 109:1590-3.
49. Raake PW, Vinge LE, Gao E, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure. *Circ Res* 2008; 103:413-22.
50. Koch WJ. Genetic and phenotypic targeting of beta-adrenergic signaling in heart failure. *Mol Cell Biochem* 2004; 263:5-9.
51. Tachibana H, Naga Prasad SV, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Rockman HA. Level of beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibition determines degree of cardiac dysfunction after chronic pressure overload-induced heart failure. *Circulation* 2005; 111:591-7.
52. Ellegast J. *Klinische Pharmakologie*. 1 ed. München: Elsevier GmbH, München - Urban & Fischer Verlag München Jena 2008; 28.
53. Pölzl G. Herzinsuffizienz und Beta-Blocker. *J Kardiol* 2003:17-9.
54. Scholz H, Schwabe U. *Taschenbuch der Arzneibehandlung*. 13 ed. Berlin - Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2005; 453.

55. Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther* 2005; 5:299-310.
56. Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, et al. Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* 2004; 78:6381-8.
57. Atchison RW, Casto BC, Hammon WM. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science* 1965; 149:754-6.
58. Burdorf L. Selektiver Gentransfer in Rattenherzen Transduktion mittels AAV-2 im heterotopen abdominellen Transplantationsmodell [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2008; 14-15.
59. Buning H, Ried MU, Perabo L, et al. Receptor targeting of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 2003; 10:1142-51.
60. Leberherz C, Maguire A, Tang W, Bennett J, Wilson JM. Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J Gene Med* 2008; 10:375-82.
61. Sharma A, Ghosh A, Hansen ET, Newman JM, Mohan RR. Transduction efficiency of AAV 2/6, 2/8 and 2/9 vectors for delivering genes in human corneal fibroblasts. *Brain Res Bull* 2010; 81:273-8.
62. Xiaofeng J, Burdorf L, Hinkel R, et al. Optimization of delivery of adeno-associated virus mediated gene transfer to a transplanted heart in a rat model. *Exp Clin Transplant* 2009; 7:184-7.
63. Bish LT, Morine K, Sleeper MM, et al. 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* 2008; 19:1359-68.

64. Miyagi N, Rao VP, Ricci D, et al. Efficient and durable gene transfer to transplanted heart using adeno-associated virus 9 vector. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27:554-60.
65. Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, et al. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res* 2006; 99:e3-9.
66. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, et al. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:1525-39.
67. Pacak CA, Sakai Y, Thattaliyath BD, Mah CS, Byrne BJ. Tissue specific promoters improve specificity of AAV9 mediated transgene expression following intra-vascular gene delivery in neonatal mice. *Genet Vaccines Ther* 2008; 6:13.
68. Boekstegers P. Perspectives on selective retroinfusion of coronary veins as an alternative approach for myocardial gene transfer and angiogenesis. *J Invasive Cardiol* 2001; 13:339-42.
69. von Degenfeld G, Raake P, Kupatt C, et al. Selective pressure-regulated retroinfusion of fibroblast growth factor-2 into the coronary vein enhances regional myocardial blood flow and function in pigs with chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1120-8.
70. Berendes E, Van Aken H, Raufhake C, Schmidt C, Assmann G, Walter M. Differential secretion of atrial and brain natriuretic peptide in critically ill patients. *Anesth Analg* 2001; 93:676-82.
71. Furger P. *Labor quick*. 1 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2009; 95-97.

72. Tokudome T, Kishimoto I, Horio T, et al. Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. *Circulation* 2008; 117:2329-39.
73. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332:78-81.
74. Hoppe UC, Bohm M, Dietz R, et al. [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 2005; 94:488-509.
75. Suzuki Y, Nakano K, Sugiyama M, Imagawa J. betaARK1 inhibition improves survival in a mouse model of heart failure induced by myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44:329-34.
76. Sulyma MG, Wormer, E.J. CIBA Lexikon Herz-Kreislauf. 1992/1993 ed. München: Medikon Verlag München; 1992/93; 455; 1023-24.
77. Franklin DL, Van Citters RL, Rushmer RF. Left ventricular function described in physical terms. *Circ Res* 1962; 11:702-11.
78. Boekstegers P, Raake P, Al Ghobainy R, et al. Stent-based approach for ventricle-to-coronary artery bypass. *Circulation* 2002; 106:1000-6.
79. Austin GE, Tuvlin MB, Martino-Salzman D, et al. Determination of regional myocardial blood flow using fluorescent microspheres. *Am J Cardiovasc Pathol* 1993; 4:352-7.
80. Thein E, Raab S, Harris AG, Messmer K. Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of blood flow. *Comput Methods Programs Biomed* 2000; 61:11-21.

81. Thein E, Becker M, Anetzberger H, Hammer C, Messmer K. Direct assessment and distribution of regional portal blood flow in the pig by means of fluorescent microspheres. *J Appl Physiol* 2003; 95:1808-16.
82. Abel FL, Cooper RH, Beck RR. Use of fluorescent latex microspheres to measure coronary blood flow distribution. *Circ Shock* 1993; 41:156-61.
83. Prinzen FW, Glenny RW. Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1467-75.
84. Thein E, Raab S, Harris AG, et al. Comparison of regional blood flow values measured by radioactive and fluorescent microspheres. *Eur Surg Res* 2002; 34:215-23.
85. Glenny RW, Bernard S, Brinkley M. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol* 1993; 74:2585-97.
86. Heymann MA, Payne BD, Hoffman JI, Rudolph AM. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* 1977; 20:55-79.
87. Kowallik P, Schulz R, Guth BD, et al. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation* 1991; 83:974-82.
88. Walter B, Bauer R, Gaser E, Zwiener U. Validation of the multiple colored microsphere technique for regional blood flow measurements in newborn piglets. *Basic Res Cardiol* 1997; 92:191-200.
89. Pearse DB, Dahms TE, Wagner EM. Microsphere-induced bronchial artery vasodilation: role of adenosine, prostacyclin, and nitric oxide. *Am J Physiol* 1998; 274:H760-8.

90. Sato K, Wu T, Laham RJ, et al. Efficacy of intracoronary or intravenous VEGF165 in a pig model of chronic myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:616-23.
91. Raab S, Thein E, Harris AG, Messmer K. A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *Am J Physiol* 1999; 276:H1801-6.
92. Tsurumi Y, Takeshita S, Chen D, et al. Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* 1996; 94:3281-90.
93. Boekstegers P, Giehl W, von Degenfeld G, Steinbeck G. Selective suction and pressure-regulated retroinfusion: an effective and safe approach to retrograde protection against myocardial ischemia in patients undergoing normal and high risk percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1525-33.
94. Boekstegers P, Peter W, von Degenfeld G, et al. Preservation of regional myocardial function and myocardial oxygen tension during acute ischemia in pigs: comparison of selective synchronized suction and retroinfusion of coronary veins to synchronized coronary venous retroperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:459-69.
95. Boekstegers P, von Degenfeld G, Giehl W, et al. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins. *Gene Ther* 2000; 7:232-40.
96. Boekstegers P, Diebold J, Weiss C. Selective ECG synchronised suction and retroinfusion of coronary veins: first results of studies in acute myocardial ischaemia in dogs. *Cardiovasc Res* 1990; 24:456-64.

97. Stern MD, Silverman HS, Houser SR, et al. Anoxic contractile failure in rat heart myocytes is caused by failure of intracellular calcium release due to alteration of the action potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:6954-8.
98. Kihara Y, Grossman W, Morgan JP. Direct measurement of changes in intracellular calcium transients during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. *Circ Res* 1989; 65:1029-44.
99. Bugge-Asperheim B, Leraand S, Kiil F. Local dimensional changes of the myocardium measured by ultrasonic technique. *Scand J Clin Lab Invest* 1969; 24:361-71.
100. Boekstegers P, Weidenhofer S, Kapsner T, Werdan K. [Continuous measurement of peripheral oxygen availability in skeletal muscle of patients with infection]. *Infusionsther Transfusionsmed* 1993; 20 Suppl 1:21-8; discussion 8.
101. Harada K, Friedman M, Lopez JJ, et al. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1996; 270:H1791-802.
102. von Degenfeld G, Giehl W, Boekstegers P. Targeting of dobutamine to ischemic myocardium without systemic effects by selective suction and pressure-regulated retroinfusion. *Cardiovasc Res* 1997; 35:233-40.
103. Urheim S, Edvardsen T, Torp H, Angelsen B, Smiseth OA. Myocardial strain by Doppler echocardiography. Validation of a new method to quantify regional myocardial function. *Circulation* 2000; 102:1158-64.
104. Kupatt C, Wichels R, Deiss M, et al. Retroinfusion of NFkappaB decoy oligonucleotide extends cardioprotection achieved by CD18 inhibition in a preclinical study of myocardial ischemia and retroinfusion in pigs. *Gene Ther* 2002; 9:518-26.

105. Hagl S, Heimisch W, Meisner H, et al. [Direct measurement of papillary muscle dynamics in the intact canine left ventricle during acute coronary occlusion (author's transl)]. *Thoraxchir Vask Chir* 1976; 24:303-8.
106. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112:195-203.
107. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:3116-20.
108. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76:4350-4.
109. Kupatt C, Hinkel R, Lamparter M, et al. Retroinfusion of embryonic endothelial progenitor cells attenuates ischemia-reperfusion injury in pigs: role of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase. *Circulation* 2005; 112:1117-22.
110. Raake PW, Hinkel R, Muller S, et al. Cardio-specific long-term gene expression in a porcine model after selective pressure-regulated retroinfusion of adeno-associated viral (AAV) vectors. *Gene Ther* 2008; 15:12-7.
111. Raake P, von Degenfeld G, Hinkel R, et al. Myocardial gene transfer by selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins: comparison with surgical and percutaneous intramyocardial gene delivery. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1124-9.
112. Rengo G, Lympieropoulos A, Leosco D, Koch WJ. GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2010 Jun; 298(6):H2032-8.

113. Eckhart AD, Koch WJ. Expression of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor reverses dysfunction in failing cardiomyocytes. *Mol Ther* 2002; 5:74-9.
114. Tevæearai HT, Walton GB, Keys JR, Koch WJ, Eckhart AD. Acute ischemic cardiac dysfunction is attenuated via gene transfer of a peptide inhibitor of the beta-adrenergic receptor kinase (betaARK1). *J Gene Med* 2005; 7:1172-7.
115. Tevæearai HT, Eckhart AD, Koch WJ. Gene-mediated inhibition of the beta-adrenergic receptor kinase: a new therapeutic strategy for heart failure. *Minerva Cardioangiol* 2001; 49:389-94.
116. Geary GG, Smith GT, McNamara JJ. Defining the anatomic perfusion bed of an occluded coronary artery and the region at risk to infarction. A comparative study in the baboon, pig and dog. *Am J Cardiol* 1981; 47:1240-7.
117. Schaper W, Jageneau A, Xhonneux R. The development of collateral circulation in the pig and dog heart. *Cardiologia* 1967; 51:321-35.
118. Swindle MM. Swine as replacements for dogs in the surgical teaching and research laboratory. *Lab Anim Sci* 1984; 34:383-5.
119. Weaver ME, Pantely GA, Bristow JD, Ladley HD. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res* 1986; 20:907-17.
120. Schaper W, Gorge G, Winkler B, Schaper J. The collateral circulation of the heart. *Prog Cardiovasc Dis* 1988; 31:57-77.
121. Sjoquist PO, Duker G, Almgren O. Distribution of the collateral blood flow at the lateral border of the ischemic myocardium after acute coronary occlusion in the pig and the dog. *Basic Res Cardiol* 1984; 79:164-75.

122. White FC, Bloor CM. Coronary collateral circulation in the pig: correlation of collateral flow with coronary bed size. *Basic Res Cardiol* 1981; 76:189-96.
123. Boekstegers P, Kupatt C. Current concepts and applications of coronary venous retroinfusion. *Basic Res Cardiol* 2004; 99:373-81.
124. Rothenburger M, Stypmann J, Bruch C, et al. Aminoterminal B-type pro-natriuretic peptide as a marker of recovery after high-risk coronary artery bypass grafting in patients with ischemic heart disease and severe impaired left ventricular function. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25:596-602.
125. Griffin PP, Schubert-Zsilavec M, Stark H. Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren: Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *Pharmazie in unserer Zeit* 2004; 33:442-9.
126. Luo Z, Akita GY, Date T, et al. Adenovirus-mediated expression of beta-adrenergic receptor kinase C-terminus reduces intimal hyperplasia and luminal stenosis of arteriovenous polytetrafluoroethylene grafts in pigs. *Circulation* 2005; 111:1679-84.
127. Petrofski JA, Koch WJ. The beta-adrenergic receptor kinase in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35:1167-74.
128. Eckhart AD, Fentzke RC, Lepore J, et al. Inhibition of betaARK1 restores impaired biochemical beta-adrenergic receptor responsiveness but does not rescue CREB(A133) induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:669-77.
129. Harding VB, Jones LR, Lefkowitz RJ, Koch WJ, Rockman HA. Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:5809-14.

- 
130. Koch WJ. Gene transfer of beta-adrenergic signaling components for heart failure. *J Card Fail* 2002; 8:S526-31.

## **XI. AUS TEILEN DIESER ARBEIT BEREITS HERVORGEGANGENE PUBLIKATIONEN**

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:**

**M. Thormann**, R. Hinkel, A. Wucherer, C. El-Aouni, C. Lebherz, C. Kupatt, O. Müller, J. Kleinschmidt, P. Boekstegers. *“AAV9 mediated beta-adrenergic receptor kinase C-terminal peptide ( $\beta$ ARKct) gene therapy ameliorates cardiac function in a pig model of chronic heart failure”* anlässlich der 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. **Abstract und Postervortrag P1294.**  
Clin Res Cardiol 98, Suppl 1, April 2009

**Michael Thormann**, Corinna Lebherz, Rabea Hinkel, Alexander Wucherer, Chiraz El-Aouni, Christian Kupatt, Oliver Müller, Jürgen Kleinschmidt, and Peter Boekstegers. **Abstract 3983:** *“AAV9 Mediated G-protein Receptor Inhibition by Beta-adrenoreceptor Kinase Carboxyl-terminus Ameliorates Cardiac Function in a Pig Model of Chronic Heart Failure”*  
Circulation, Nov 2009; 120: S900.

C. Lebherz, **M. Thormann**, C. El-Aouni, C. Kupatt, O. J. Müller, J. A. Kleinschmidt, P. Boekstegers. **P1299** – *“AAV9 Mediated G-protein Receptor Inhibition by Beta-adrenoreceptor Kinase Carboxyl-terminus Ameliorates Cardiac Function in a Pig Model of Chronic Heart Failure comparable to beta-blocker”*  
Clin Res Cardiol 99, Suppl 1, April 2010

## XII. WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN

### 2011 Abstracts und Poster:

**Michael Thormann**, Johannes Postrach, Rabea Hinkel, Maximilian Schmidt, Andreas Bauer, Lars Burdorf, Eckart Thein, Bruno Reichart, Michael Schmoeckel, Paolo Brenner, Christian Kupatt. *“AAV2/9-mediated gene transfer of thymosin  $\beta$ 4 demonstrates first cardioprotective effects in a porcine model of heterotopic heart allotransplantation”* anlässlich der 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. Abstract und Postervortrag P722. Clin Res Cardiol 100, Suppl 1, April 2011

### 2010 Originalarbeiten:

Christian Kupatt, MD, Rabea Hinkel, DVM, Achim Pfosser, MD, Chiraz El-Aouni, PHD, Alexander Wuchrer, MD, Andrea Fritz, MD, Franziska Globisch, MD, **Michael Thormann, DVM**, Jan Horstkotte, MD, Corinna Lebherz, MD, Eckart Thein, DVM, Andrea Banfi, PHD, Peter Boekstegers, MD. *“Cotransfection of Vascular Endothelial Growth Factor-A and Platelet Derived Growth Factor-B Via Recombinant Adeno-Associated Virus Resolves Chronic Ischemic Malperfusion”* Journal of the American College of Cardiology Vol. 56, No. 5, 2010

A. Bauer, J. Postrach, **M. Thormann**, S. Blanck, C. Faber, B. Wintersperger, S. Michel, J.M. Abicht, F. Christ, C. Schmitz, M. Schmoeckel, B. Reichart, P. Brenner. *“First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation”* Xenotransplantation 2010; 17:243-9.

### Abstracts und Poster:

R. Hinkel, A. Pfosser, **M. Thormann**, C. Lebherz, A. Wuchrer, F. Globisch, C. El-Aouni, A. Banfi, P. Boekstegers, C. Kupatt. P689 – *“Overexpression of VEGF-A and PDGF-B via adeno-associated viral vectors resolves mal-perfusion in chronic ischemia: Role of vessel maturation”* Clin Res Cardiol 99, Suppl 1, April 2010

R. Hinkel, B. Petersen, **M. Thormann**, J. C. Horstkotte, A. Wuchrer, M. Schmoeckel, H. Niemann, C. Kupatt. P185 – *“hHO-1 overexpression in transgenic pigs attenuates ischemia/reperfusion injury after acute myocardial infarction”* Clin Res Cardiol 99, Suppl 1, April 2010

C. Lebherz, **M. Thormann**, C. El-Aouni, C. Kupatt, O. J. Müller, J. A. Kleinschmidt, P. Boekstegers. P1299 – *“AAV9 Mediated G-protein Receptor Inhibition by Beta-adrenoreceptor Kinase Carboxyl-terminus Ameliorates Cardiac Function in a Pig Model of Chronic Heart Failure comparable to beta-blocker”*  
Clin Res Cardiol 99, Suppl 1, April 2010

2009

**Originalarbeiten:**

**Michael Thormann**, Corinna Lebherz, Rabea Hinkel, Alexander Wuchrer, Chiraz El-Aouni, Christian Kupatt, Klinikum der Univ. München, Munich, Germany; Oliver Müller, Jürgen Kleinschmidt, Klinikum der Univ. Heidelberg, Heidelberg, Germany; Peter Boekstegers, Klinikum der Univ. München, Munich, Germany. *“AAV9 Mediated G-protein Receptor Inhibition By Beta-adrenoreceptor Kinase Carboxyl-terminus Ameliorates Cardiac Function In A Pig Model Of Chronic Heart Failure”* Abstract (19293) und Vortrag anlässlich der Scientific Sessions der American Heart Association 2009, Orlando, Florida, USA;  
Circulation, Nov 2009; 120: S900.

**M. Thormann**, R. Hinkel, A. Wucherer, C. El-Aouni, C. Lebherz, C. Kupatt, O. Müller, J. Kleinschmidt, P. Boekstegers. *“AAV9 mediated beta-adrenergic receptor kinase C-terminal peptide ( $\beta$ ARKct) gene therapy ameliorates cardiac function in a pig model of chronic heart failure”* anlässlich der 75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie. Abstract und Postervortrag P1294.  
Clin Res Cardiol 98, Suppl 1, April 2009

**Abstracts und Poster:**

Achim Pfusser, Rabea Hinkel, **Michael Thormann**, Corinna Lebherz, Alexander Wuchrer, Franziska Globisch, Chiraz El-Aouni, Andrea Banfi, Peter Boekstegers, and Christian Kupatt. Abstract 5590: *“Therapeutic Neovascularization by AAV 2/9-based Gene Transfer of hVEGF-A and hPDGF-b in Chronic Ischemia (Pig and Rabbit Model)”*  
Circulation, Nov 2009; 120: S1123.

Rabea Hinkel, Björn Petersen, **Michael Thormann**, Jan Horstkotte, Alexander Wuchrer, Michael Schmoeckel, Heiner Niemann, and Christian Kupatt. Abstract 5059: *“hHO-1 Overexpression in Transgenic Pigs is Cardioprotective After Acute Myocardial Ischemia and Reperfusion”*  
Circulation, Nov 2009; 120: S1042.

C. Schäfer, W. Assmann, R. Sroka, **M. Thormann**, A. Wagner, B. Göke, J. Schirra. *„Etablierung eines Tiermodells zur Induktion einer fibrotischen Stenose im DHC“* Poster anlässlich der 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion für gastroenterologische Endoskopie

C. Schäfer, W. Assmann, R. Sroka, **M. Thormann**, A. Wagner, B. Göke, J. Schirra. „*Evaluation fibrotischer Gallengangs-Stenosen durch die konfokale Laserendomikroskopie (CFE)*“ Poster anlässlich der 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion für gastroenterologische Endoskopie

2008

**Abstracts und Poster:**

R. Hinkel, M. Fydanaki, Ch. El-Aouni, **M. Thormann**, H. Held, C. Kupatt, P. Boekstegers. “*Consistent Improvement of Regional Perfusion and Function following Selective Pressure-regulated Retroinfusion of Ad HIF-1 $\alpha$ /VP 16 in a Percutaneous Pig Model of Chronic Ischemia*”  
Circulation. 2008;118: 18S\_456. (Poster)

R. Hinkel, **M. Thormann**, C. Lebherz, A. Wuchrer, Ch. El-Aouni, A. Banfi, P. Boekstegers, C. Kupatt. “*Induction of therapeutic neovascularization by AAV-based gene transfer of hVEGF-A and hPDGF in a preclinical pig model*”  
J Vasc Res. 2008

R. Hinkel, **M. Thormann**, J. C. Horstkotte, C. El-Aouni, A. Arnold, W. Alexander, E. Hannappel, I. Bock-Marquette, M. DiMaio, P. Boekstegers, C. Kupatt. “*Cardioprotective Potential of Thymosin  $\beta$ 4 after Ischemia/Reperfusion in a Preclinical Pig Model*”  
Clin Res Cardiol 97- Suppl 1, 2008; V1608, (Vortrag)

A. Pfosser, F. Globisch, C. El-Aouni, C. Dinges, A. Fritz, S. Sultana, R. Hinkel, **M. Thormann**, C. Lebherz, A. Banfi, P. Boekstegers, C. Kupatt. “*Therapeutic neovascularization by AAV2/9 based gene transfer of hVEGF-A and hPDGF in the ischemic hindlimb (rabbit model)*”  
Circulation. 2008; 118:18S\_279. (Poster)

R. Hinkel, **M. Thormann**, C. El Aouni, A. Arnold, A. Wuchrer, E. Hannappel, I. Bock-Marquette, A. Hatzopoulos, P. Boekstegers, C. Kupatt. “*Thymosin beta 4 mediates cardioprotection after ischemia/reperfusion in a preclinical pig model*”  
European Heart Journal (2008) 29 (Abstract Supplement), 668. (Poster)

### **XIII. DANKSAGUNG**

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Peter Boekstegers möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas danken. Er stellte die Rahmenbedingungen zur Verfügung und hat mich stets sowohl methodisch als auch inhaltlich in dieser Arbeit unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. vet. Rüdiger Wanke, meinem Betreuer an der Tiermedizinischen Fakultät, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Kupatt, möchte ich mich für die Anregungen zu strukturiertem und wissenschaftliches Arbeiten bedanken. Ich durfte viel von ihm lernen.

Mein Dank gilt auch den Kooperations-Partnern PD Dr. med. Jürgen Kleinschmidt und Dr. med. Oliver Müller vom Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ) für die Virusvektorproduktion und ihre Unterstützung in molekularbiologischen Fragen.

Frau Dr. hum. Biol. Chiraz El-Aouni und Frau Susanne Helbig, die maßgeblich für den Transfektionsnachweis und die Mikrosphärenbestimmung verantwortlich waren, möchte ich für ihre analytische und molekularbiologische Unterstützung herzlich danken.

Ferner gilt mein Dank Frau Dr. med. vet. Rabea Hinkel, die mich in diese wissenschaftliche Arbeit einführte und mir bei der Versuchsdurchführung stets hilfreich zur Seite stand. Auch für ihre wissenschaftliche Beratung und Hilfestellung bei der Ergebnisbeurteilung ein herzliches Dankeschön.

Frau PD Dr. med. Corinna Leberz danke ich vielmals für die fachliche Beratung und konstruktive Hilfe bzgl. der Ergebnisinterpretation.

Herrn Dr. med. Claudius Faber ein herzliches Dankeschön für die histopathologische Befundung der Myokardproben.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl danke ich für die Bereitstellung des Großtier-OPs zur Durchführung unserer Versuche im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin.

Des Weiteren hat mich Herr Dr. med. vet. Eckart Thein fachlich unterstützt und mir oft mit Rat und Tat beiseite gestanden. Vielen Dank!

Herrn Diplom-Physiker Dr. Jürgen Peters möchte ich für seine Hilfe bezüglich statistischer Fragestellungen ganz herzlich danken.

Ferner möchte ich noch Herrn cand. med. Alexander Arnold, Herrn cand. med. Alexander Wuchrer, Herrn cand. med. Carlo Jung und Frau cand. Dr. med. vet. Christine Rothe für ihre Assistenz während der Versuche herzlich danken.

Der BMBF und der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit in meinen Vorhaben unterstützten und mir stets die Freiheit und das Vertrauen gaben mein Leben selbstbestimmt zu verwirklichen.

Ebenso gilt mein Dank meiner Lebensgefährtin für Ihre Bestärkung und Unterstützung hinsichtlich dieser Arbeit.