

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR HERZ-, THORAX- UND HERZNAHE GEFÄßCHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. MED. CHRISTOF SCHMID  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Untersuchung zum therapeutischen Potenzial des Hämoxigenase-1  
Proteins in der chronischen Abstoßung einer Organtransplantation

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

*Abed Abu Wasel*

*Aus*

*Israel*

Regensburg 2013

Dekan: Prof. Dr. dent. Dr. med. Torsten E. Reichert

I. Gutachter : PD Dr. med. Tung Yu Tsui

II. Gutachter : PD Dr. med. Camboni Daniele

Tag der mündlichen Prüfung : 21.06.2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	6
1.2 Herztransplantation.....	7
1.3 Hämoxigenase-1.....	10
1.4 Abstoßungsreaktion.....	12
1.4.1. Formen der Abstoßungsreaktion.....	13
1.4.2. Pathogenese der Transplantvaskulopathie.....	15
1.4.3. Therapie und Prävention der Transplantvaskulopathie.....	18
1.5 Korrelation zwischen der Abstoßungsreaktion und HO-1.....	19
<b>2 Material und Methode.....</b>	<b>21</b>
2.1 Klonen von Proteinfragmenten.....	22
2.2 Rekombinante Proteinexpression und Purifikation.....	24
2.3 Identifikation des Proteins mittels SDS-PAGE .....	28
2.4 Prozess der Transplantation.....	32
2.5 Protokolle des Experiments.....	33
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
3.1 Überblick eines Aortenquerschnitt der nicht transplantierten Ratten.....	36
3.2 Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung und Lokalisierung von eGFP bei unterschiedlicher Konzentration bzw. zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	39
3.3 Histologischer Querschnitt durch die Aorta vor und nach der Behandlung.....	42
3.4 Histologischer Querschnitt durch die Aorta mit und ohne Behandlung mittels immunhistologischer Färbung.....	44

3.5	Messung der Dicke der Intima mit und ohne Behandlung.....	47
4	<b>Diskussion.....</b>	<b>48</b>
5	<b>Zusammenfassung und Konsequenzen der Studie.....</b>	<b>51</b>
6	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>
7	<b>Danksagung.....</b>	<b>61</b>
8	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>62</b>
9	<b>Erklärung.....</b>	<b>64</b>



## Abkürzungsverzeichnis

BN	Brown Norway-Ratten
CD	Cluster of Differentiation
CD4	CD4 positive T-Zellen
CMV	Cytomegalovirus
CO	Kohlenmonoxid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	„enhanced“ grün fluoreszierendes Protein
HO-1	Hämoxygenase-1
HTK-L	Histidine-tryptophan-ketoglutarate-Lösung
IL-17	Interleukin-17
GVP	Transplantatvaskulopathie
LEW	LEWIS-Ratten
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
OD	Optische Dichte
OTC-L	Ornithin Transcarbamylase-Lösung
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PTD	Transduktionsdomäne des Proteins
SDS PAGE	Sodium- Dodecyl- Sulfat- Polyacrylamid Gel für die Elektrophorese
TEMED	Tetramethyldiamin

# 1 Einleitung

## 1.1 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die Transplantation beschreibt den Prozess des Transfers von Zellen, Gewebe oder Organen in einen anderen Organismus. Somit kann eine fortgeschrittene Funktionsstörung eines Organs durch die Implantation eines funktionsfähigen, gesunden Organs durch eine Transplantation behoben werden (z.B. Niere, Leber, Lunge, Herz, Pankreas).

Mit großer Geschwindigkeit hat sich die Organtransplantation als Therapie der Wahl für den Ersatz irreversibel geschädigter Organe etabliert. Entscheidenden Einfluss auf den Fortschritt in der Transplantationsmedizin hatten, neben verbesserten operativen und perioperativen Behandlungskonzepten, besonders das zunehmende Verständnis transplantationsimmunologischer Prozesse sowie die Einführung neuer Immunsuppressiva.

Leider bleibt das Immunsystem die entscheidende Hürde nach der Transplantation, da es im Laufe der Entwicklungsgeschichte sehr effektive Mechanismen zu Bekämpfung von körperfremden Materialien und Geweben entwickelt hat. Diese Mechanismen sind entscheidend an der Abstoßungsreaktion nach Organtransplantation beteiligt.

Die Kenntnisse und das Verständnis dieser Mechanismen sind von großer Bedeutung. Dies gilt sowohl für die Entwicklung von neuen Strategien zur Prävention von Abstoßungsreaktionen, als auch für die Entwicklung neuer Medikamente zur Therapie nach Transplantationen. Therapien von Abstoßungsreaktionen bestehen in der Regel durch die Unterdrückung der Immunreaktion, welche durch das transplantierte Gewebe ausgelöst. Durch eine herabgesetzte Immunreaktion soll ein längeres Überleben des Transplantates ermöglicht werden.

Hämoxygenase-1 (HO-1) ist ein multifunktionelles Protein, das die Reaktion von Häm zu Kohlenmonoxid (CO), Biliverdin und freiem Eisen katalysiert. Tierexperimentelle Versuche haben gezeigt, dass eine Überexpression von HO-1 im

Transplantationsmodell zu einer Protektion des Transplantates gegenüber Ischämie- und Reperfusionsschäden sowie akuter und chronischer Abstoßung führt.

Diese Arbeit setzt sich nun mit dem Einsatz des Proteins HO-1 hinsichtlich seines Potentials für einen therapeutischen Effekt auf die chronische Abstoßungsreaktion bzw. die Transplantvaskulopathie auseinander.

## **1.2 Herztransplantation**

Die Herztransplantation ist trotz Verbesserung der medikamentösen Therapiemöglichkeiten und alternativer Operationsverfahren derzeit immer noch die einzige Möglichkeit Patienten mit schweren Herzerkrankungen ein Weiterleben zu ermöglichen.

Mit einer Überlebensrate von ca. 80-85% nach einem Jahr, von über 70% nach 3 Jahren und von 60-70% nach 5 Jahren (3,23,70), hat sich die Herztransplantation zu einer anerkannten therapeutischen Option entwickelt.

Durch die Zunahme der Anzahl der Herztransplantationen in den letzten 20 Jahren (weltweit ca. 40.000) hat diese Therapie einen festen Platz in unserem Gesundheitssystem erlangt.

Die erste Transplantation am Menschen wurde am 03. Dezember 1967 von dem südafrikanischen Chirurgen Christiaan Barnard in Kapstadt durchgeführt (76). Bereits ein Jahr später wurden weltweit über 100 Herzen transplantiert, wobei aber die Ein-Jahres-Überlebensrate die 30% Marke nie überstieg. Erst durch die Einführung des Cyclosporin A (Botel) in den 80er Jahren konnte durch die Anhebung der Ein-Jahres-Überlebensrat auf 80 % die Prognose entscheidend verbessert werden. Insbesondere ist hier N. Shumway zu benennen, dessen Forschungsarbeiten in Stanford (USA) die Entwicklung der Herztransplantation wesentlich vorangebracht haben (76).

Nachdem 1969 unter Rudolf Zenker in München zwei Herztransplantationen durchgeführt worden waren, erfolgte die erste erfolgreiche Herztransplantation in Deutschland 1981 am Deutschen Herzzentrum München durch F. Sebening und E. Struck. Durch die Etablierung anerkannter immunsuppressiver Protokolle stieg die

Anzahl der Transplantationszentren weltweit an, wobei gegenwärtig in Deutschland an 32 Zentren Herztransplantationen durchgeführt werden können.

Aufgrund des Organmangels werden heute in Deutschland fast nur noch herzinsuffiziente Patienten von der Hochdringlichkeits-Liste transplantiert. Durchschnittlich stehen deutschlandweit ca. 40 bis 80 Patienten auf der höchsten Dringlichkeitsstufe. Die derzeit durchschnittliche Wartezeit für ein Herz im Hochdringlichkeits-Status beträgt acht bis zwölf Monate (78).

Während in den Jahren von 1998 bis 2001 die Zahl der Patienten auf der Warteliste für eine Herztransplantation stetig abnahm, zeigt sich seit 2001 eine deutliche Trendumkehr (Abb. 1.1). Es ist eine kontinuierliche Zunahme der wartenden Patienten zu beobachten. Zeitgleich ist die Zahl der jährlichen Herztransplantationen tendenziell eher rückläufig.

Die Ursachen dieser Entwicklung sind multifaktoriell. Eine Erklärung könnte sein, dass zu Beginn dieses Jahrtausends die Einführung einer verbesserten konservativen Therapie der terminalen Herzinsuffizienz – wie zum Beispiel Betablocker sowie biventrikuläre Schrittmacher – zunächst zu einer Abnahme der Meldungen für eine Herzverpflanzung geführt hatte, dann jedoch nach Ausschöpfung dieser Möglichkeiten die Transplantation zu einem späteren Zeitpunkt dennoch nötig wurde.

Eine weitere Erklärung ist die allgemeine demografische Entwicklung mit der Zunahme der Inzidenz von terminaler Herzerkrankung. Im Jahr 2001 konnte man davon ausgehen, dass für einen Patienten auf der Warteliste innerhalb eines Jahres ein Organ zur Verfügung stehen würde. Im Jahr 2008 hingegen standen 873 Patienten nur noch 382 Transplantationen gegenüber, sodass für viele Patienten die Transplantation zu spät kam.

Die durchschnittliche Überlebenszeit der Transplantate beträgt inzwischen  $8,3 \pm 1$  Jahre nach Operation, eine Zeit, in der die Patienten auf die kontinuierliche Einnahme von Immunsuppressiva angewiesen sind. Erst durch die Entwicklung dieser Medikamente, die die Abstoßung des fremden Organs verhindern, konnten langfristig erfolgreiche Transplantationen gelingen. Zugleich spielen diese Substanzen jedoch auch eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Entwicklung des

limitierenden Faktors der Transplantatlebensdauer schlechthin, der koronaren Transplantvaskulopathie (TVP) (22).

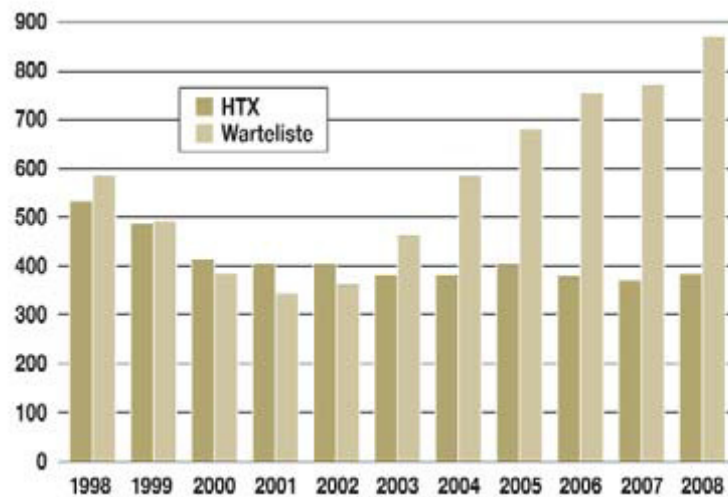
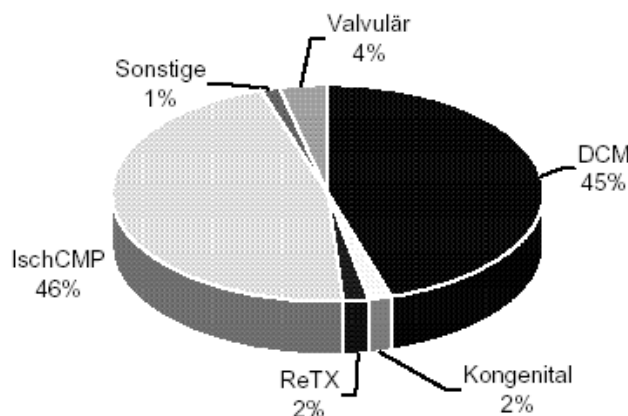


Abbildung 1.1: Entwicklung der Warteliste auf ein Herz und Anzahl der Herztransplantationen in Deutschland (Daten bei Eurotransplant 2008: URL: [www.eurotransplant.nl](http://www.eurotransplant.nl))

Zu den häufigsten Grunderkrankungen, die zu einer Herztransplantation führen können, zählen die koronare Herzerkrankung und die dilatative Kardiomyopathie (Abb. 1.2) (3).

### ISHLT Indikationen



DCM: dilatative Kardiomyopathie  
 IschCMP: Ischämische Kardiomyopathie  
 ReTX: Retransplantation

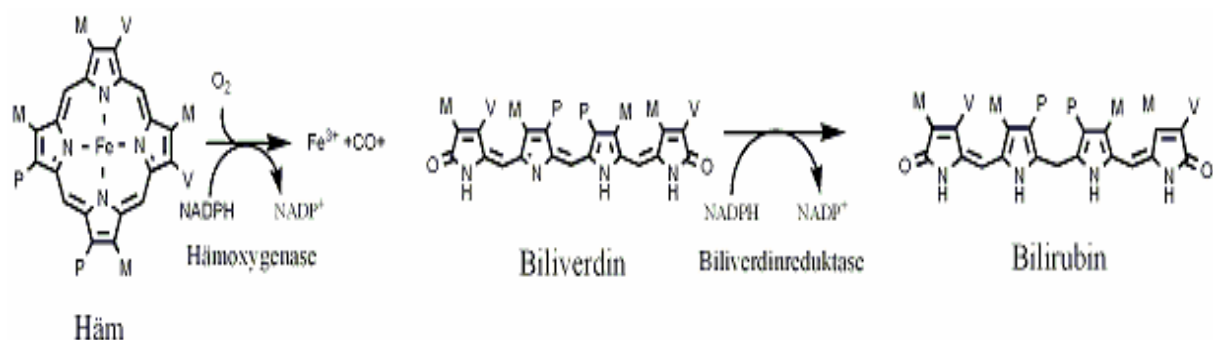
Abbildung 1.2: Indikationen für eine Herztransplantation (ISHLT-Bericht 2001).

Abstoßungsreaktionen treten mit unterschiedlicher Häufigkeit auf: In der Regel handelt es sich in der Anfangsphase um leichte bis mittelschwere akute Abstoßungen, die mit Kortison therapiert werden. Als chronische Abstoßungsreaktionen bezeichnet man die "Transplantatvaskulopathie". Dabei handelt es sich um eine fortschreitende Verdickung der Gefäßwände der Herzkranzarterien. Neben Abstoßungsreaktionen sind Infektionen in der frühen postoperativen Phase die häufigsten Komplikationen einer Herztransplantation. Falls es zu irreversiblen Schädigungen des transplantierten Herzens kommt, ist eine erneute Herztransplantation unter bestimmten Voraussetzungen möglich, jedoch sind die Ergebnisse bei Retransplantationen nicht ganz so günstig wie bei Erstoperationen.

Trotz aller Fortschritte (Entwicklung neuer Medikamente und Verbesserung der diagnostischen Maßnahmen), die v.a. zu einer kontinuierlichen Verbesserung der Transplantatfunktion in der frühen Phase führten, sind die Langzeitergebnisse häufig noch unbefriedigend. Der zunehmende Verlust von Organtransplantaten nach Monaten bis Jahren, für den in erster Linie die chronische Transplantatdysfunktion verantwortlich gemacht wird, stellt eines der herausragenden aktuellen Probleme der Transplantationsmedizin dar. Aus diesen Gründen werden weitere Forschungen durchgeführt um diese Problematik zu minimieren.

### 1.3 Hämoxygenase-1

Das HO-1 ist ein induzierbares Enzym, welches Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid oxidiert und abbaut (Abb. 1.3). Biliverdin wird weiter zu Bilirubin reduziert (58).



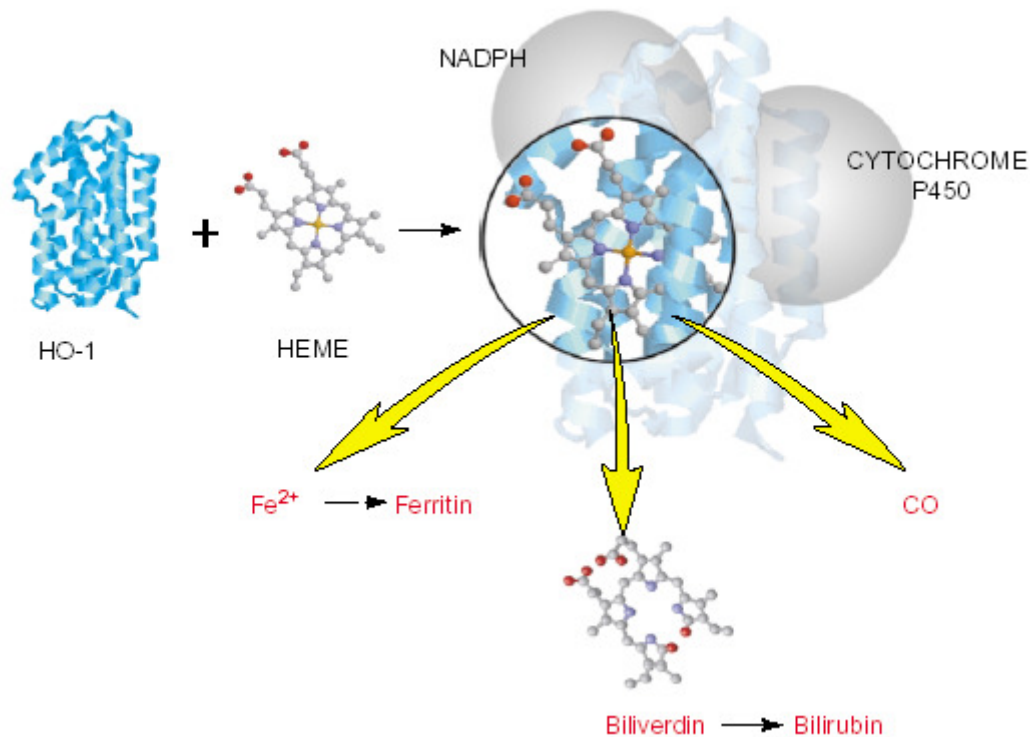


Abbildung 1.3: Abbau von Häm mittels HO-1 in Biliverdin,  $\text{Fe}^{3+}$  und CO. Biliverdin wird mittels Biliverdinreduktase (NADPH-Cytochrom P450 Reduktase) in Bilirubin umgewandelt (39).

Es wurde gezeigt, dass die Histidine an Stelle 25 und 32 die wichtigsten Aminosäuren sind, die für die enzymatische Aktivität des HO-1 Proteins verantwortlich sind (59,60). Es gibt verschiedene Formen von Stress oder Gewebeschädigung, die die Expression von HO-1 induzieren.

HO existiert bei Säugetieren in bis zu 3 Isoformen, der induzierbaren Isoform HO-1 und der konstitutiven Isoform HO-2, sowie HO-3 als ein Protein das bisher nicht näher charakterisiert worden ist (4). Beim Menschen existiert es lediglich in 2 Isoformen.

HO-1, die in der Leber in hoher Konzentration vorliegt, ist ein großes Hitzeschockprotein mit einer molaren Masse von 32 kDa. HO-1 wird in Geweben von Säugetieren durch eine große Anzahl von Stimuli hochreguliert, unter anderem durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren, wie dem TGF- $\beta$  (Transforming-growth factor), PDGF (Plated derived growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor) sowie dem SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1), NO, Peroxynitrit, Lipidperoxide, Sauerstoffmangel (Hypoxie), oxidativen Stress und Zytokinen.

HO-2 wird konstitutiv, d.h. unabhängig von inneren und äußeren Faktoren, in Gehirn, Endothel und Hoden exprimiert.

Der Abbau von Häm durch das Hämoxygenase-System ist die hauptsächliche Quelle für die Bildung von Kohlenstoffmonoxid im Körper. HO-1 und das Stoffwechselprodukt Kohlenstoffmonoxid nehmen im Körper wichtige Funktionen ein: Sie haben eine proangiogenetische, antiinflammatorische, antioxidative, antifibrotische sowie antiapoptotische Wirkung (5).

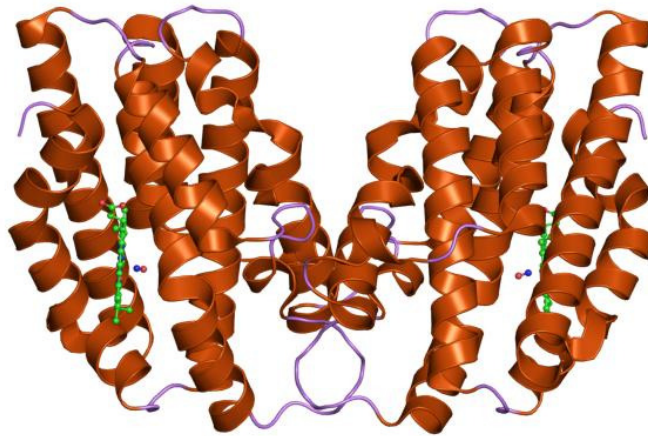


Abbildung 1.4: Graphische Darstellung des Enzyms HO-1 (URL: [http://en.wikipedia.org/wiki/Heme\\_oxygenase](http://en.wikipedia.org/wiki/Heme_oxygenase))

#### 1.4 Abstoßungsreaktion

Die Herztransplantation stellt bei Patienten mit Herzinsuffizienz Stadium III-IV, deren linksventrikuläre Pumpfunktion trotz maximaler medikamentöser Therapie unter 30% und deren Herzindex unter 2.1 l/min/m<sup>2</sup> liegt, die einzige therapeutische Option dar.



Die Überlebensrate im ersten Jahr nach orthotoper Herztransplantation liegt derzeit weltweit bei ca. 85% (1). Neben dem primären Transplantversagen stehen im ersten Jahr nach Transplantation insbesondere Abstoßungsreaktionen und Infektionen an der Spitze der Todesursachen.

Im Langzeitverlauf treten dann Nebenwirkungen der Immunsuppressiva wie Malignome und Nierenversagen als Todesursachen zunehmend in den Vordergrund. Hinzu kommt das Risiko einer progredienten Funktionseinschränkung des Transplantates, die Monate bis Jahre nach der Transplantation auftritt und schließlich zum Funktionsverlust des Transplantates führt. Dies wird üblicherweise als chronische Abstoßungsreaktion bzw. Transplantvaskulopathie bezeichnet.

#### **1.4.1 Formen der Abstoßungsreaktion**

Es sind verschiedene Formen der Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation bekannt. Man unterscheidet die hyperakute, die akute und die chronische Abstoßungsreaktion.

- Die Hyperakute Abstoßung: Bei ca. 0,3-3 % der herztransplantierten Patienten (6) kann es innerhalb von wenigen Stunden zu einem Herzpumpversagen des zuvor intakten Organs kommen, wenn präformierte Antikörper gegen Zelloberflächenmoleküle vom HLA-Typ des Spenderorgans durch zuvor schon aktivierte (sensibilisierte) B-Lymphozyten aktiv werden.
- Die akute Abstoßung: Die akute zelluläre Abstoßung tritt bevorzugt im ersten postoperativen Jahr nach Transplantation, aber auch im Langzeitverlauf auf. Sie stellt trotz der Fortschritte der Immunsuppression weiterhin eine der Haupttodesursachen im ersten Jahr nach der Transplantation dar (7). Allerdings ist auch nach Ablauf der ersten 12 Monate lebenslang mit der Möglichkeit einer Abstoßungsreaktion zu rechnen. Zu den Risikofaktoren gehören HLA-Mismatch, weibliches Geschlecht des Empfängers, jüngeres Alter, alle Blutgruppen außer 0, weibliche und junge Spenderherzen, Panel-reaktive-AK-Titer > 10 %, positives spenderspezifisches Crossmatch, CMV-

Infektion und OKT3-AK-Sensibilisierung (7). Die Antikörpervermittelte akute Abstoßung wird seltener diagnostiziert.

- Die chronische Abstoßung: Als chronische Transplantatabstoßung bzw. chronische Transplantatdysfunktion wird eine graduelle, langsam fortschreitende Einschränkung der Transplantatfunktion über Monate und Jahre hinweg beschrieben.

Morphologisch lassen sich klare Unterscheidungskriterien für die akute und chronische Transplantatabstoßung definieren: Während ausgeprägte zelluläre Infiltrate sowie ödematöse und nekrotische Veränderungen als morphologisches Korrelat akuter Abstoßungsreaktionen charakterisiert werden können, lassen sich die morphologischen Merkmale der chronischen Transplantatabstoßung eher als proliferative Veränderungen beschreiben. Eine persistierende, zunächst gering ausgeprägte zelluläre Infiltration, verbunden mit einer Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und der Bildung chemotaktischer Faktoren, führen zu einer zunehmenden zellulären Infiltration. Die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren verstärkt die Endothel- und Fibroblastenaktivierung, die schließlich zu den organspezifischen Veränderungen führen (8,9,10,11).

Die chronische Abstoßungsreaktion des Herzens äußert sich in einer Transplantvaskulopathie (TVP). Diese beträgt in den ersten postoperativen Jahren ca. 10% pro Jahr (12). Die Prävalenz liegt 5 Jahre nach Transplantation zwischen 32 % und 42 % (13). Die TVP stellt einen wichtigen Risikofaktor für das Langzeitüberleben dar und ist nicht selten die Ursache für eine Retransplantation. Klinisch verhält sich die TVP lange Zeit unauffällig, daher stellt ihre Erfassung im klinischen Alltag immer noch eine Herausforderung dar. Aufgrund des geringen Prozentsatzes (10 % - 30 %) an reinnervierten Herztransplantatierten tritt nur selten eine Angina pectoris auf. Normalerweise äußert sich die TVP deshalb in Form einer Herzinsuffizienz mit restriktivem Füllungsmuster oder als plötzlicher Herztod (14).

### 1.4.2 Pathogenese der Transplantvaskulopathie

Die TVP ist eine bleibende, lebensbedrohliche Komplikation nach der Herztransplantation (15) und manifestiert sich als ungewöhnlich aggressive Form einer koronaren Gefäßerkrankung des Spenderorgans. Sie unterscheidet sich sehr deutlich von der traditionellen Arteriosklerose (Abbildung 1.5, Tabelle 1).

Bei der TVP handelt es sich um eine diffuse Beeinträchtigung der Koronararterien (15). Der Prozess beginnt zumeist an den kleinen distalen Gefäßen und verursacht kleine Infarkte, beeinträchtigt jedoch letztlich die gesamten intramyokardialen und epikardialen Gefäße des Herzens (14,16). Die Lamina elastica interna bleibt in der Regel intakt. Im Gegensatz zur klassischen Arteriosklerose findet man bei einer TVP nur selten Kalziumablagerungen in den Gefäßen (17). Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Arteriosklerose im Gegensatz zur TVP durch fokale Läsionen charakterisiert ist (18).

Zusammenfassender histologischer Vergleich zwischen TVP und Koronarsklerose bei KHK (Tab. 1) (17,22,23).

<b>Histologie</b>	<b>TVP</b>	<b>KHK</b>
Lokalisation im Gefäßbaum	diffus,distal	fokal,proximal
Intimaprolifiration	konzentrisch	meist exzentrisch
Kalzifizierungen	kaum/relativ spät	häufig/früh
Elastica interna	intakt	defekt
Kollateralkreisläufe	kaum	häufig
Zellreichtum	hoch	weniger
Lipidanreicherungen	arm	reich
Inflammation	häufig	selten

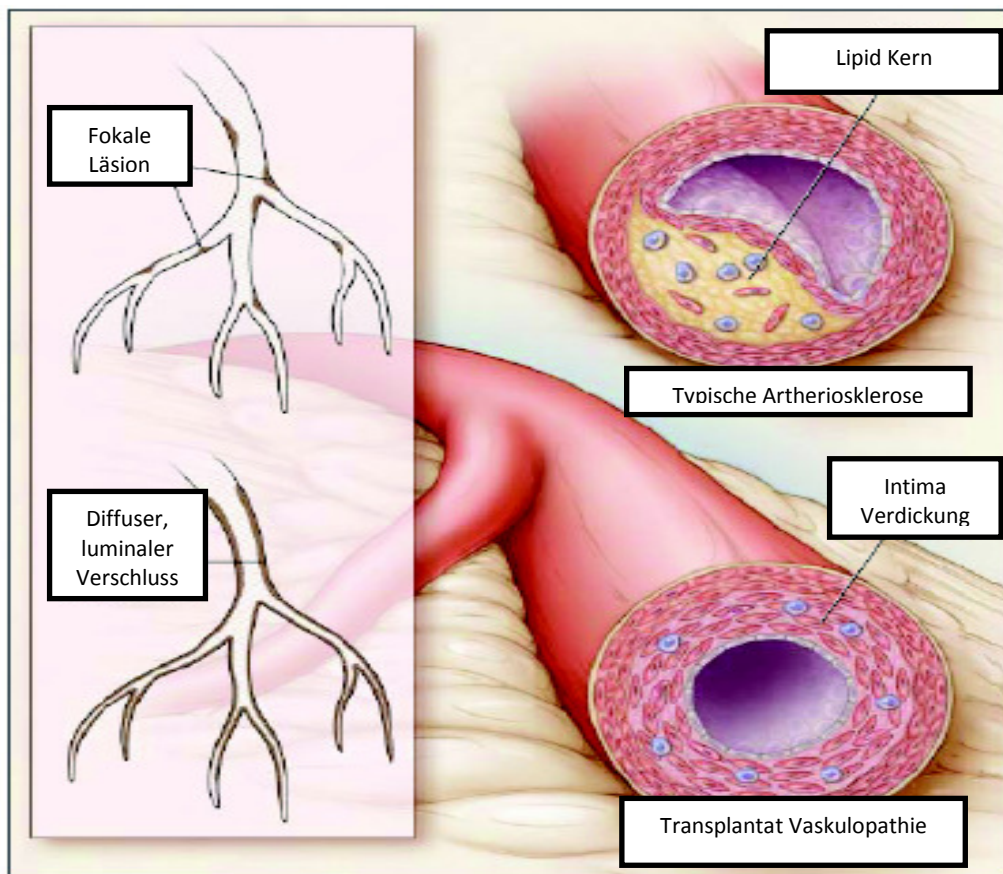


Abbildung 1.5: Transplantvaskulopathie im Vergleich zur typischen Atherosklerose (15).

Die TVP ist initial Folge einer konzentrischen Hyperplasie der Gefäßintima und Prolifiration von vaskulären glatten Muskelzellen. Diese wird durch Schädigungen am Endothelgewebe initiiert. Eine entscheidende Rolle spielen hierbei endotheliale Antigene, wobei sowohl HLA-Antigene der Klasse I, als auch der Klasse II auf den Endothelzellen exprimiert werden und somit Ziel von zellulären und humorale Immunreaktionen sein können. Dies führt dann zu entzündlichen Prozessen sowie zur Proliferation von Myoblasten und zu fibrotischen Veränderungen (24). Durch konstriktives Remodelling kommt es zu einer weiteren Einengung der Gefäße.

Es wurde gezeigt, dass herztransplantierte Patienten mit schwerer Verdickung der Gefäßintima 10-mal anfälliger für Herzerkrankungen sind, als Herztransplantierte ohne Verdickung der Gefäßintima (19,14).

Bei der Entstehung der TVP ist zwischen immunologischen und nicht immunologischen Faktoren zu unterscheiden (19). Zu den immunologischen Faktoren zählt ein HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger.

Dies führt vermutlich zu T-Zell vermittelten Reaktionen sowohl gegen HLA als auch gegen weitere Antigene der Gefäßendothelzellen des Spenderorgans.

Ein komplettes Mismatch des HLA-DR-Locus scheint hierbei von größerer Bedeutung zu sein, als ein Mismatch anderer HLA-Loci. Im Rahmen von immunologischen Faktoren ist ebenfalls eine Unterbrechung des kardialen lymphatischen Systems von Bedeutung. Dies trägt vermutlich zu einer verminderten Clearance von Immunzellen bei, die das Spenderorgan infiltrieren. In der Folge kann es sowohl zu einer endothelialen Dysfunktion, als auch zu strukturellen Veränderungen des Endothels kommen.

Als weiterer Risikofaktor gelten akute Abstoßungsreaktionen. Diese stimulieren die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen/Zytokinen, die selbst wiederum an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Darüber hinaus scheinen die Ischämiezeit des Spenderorgans, sowie Verletzungen der Gefäße während der Reperfusion eine Rolle im komplexen Geschehen der Pathogenese der TVP zu spielen. Lange Ischämiezeiten führen zu vermehrtem Zelltod, wodurch Antigenmaterial freigesetzt wird, das beim Spender eine immunologische Antwort provoziert (20). Soleimani und Mitarbeiter kommen in einem Review über die Rolle von Alloantikörpern bei der Pathogenese der TVP zu dem Schluss, dass die Anwesenheit von Antiendothel- und Anti-HLA-Antikörpern bei Herztransplantierten unzweifelhaft mit der Entwicklung einer TVP korreliert. Es sei jedoch unklar, ob diese Antikörper eine pathophysiologische Rolle spielen oder ob sie eher ein Epiphenomenon darstellen, das aus der Schädigung der Endothelzellen resultiert, ähnlich dem gelegentlichen Auftreten von Autoantikörpern nach einem Myokardinfarkt. Die Autoren führen jedoch ebenfalls aus, dass Alloantikörper wahrscheinlich notwendig sind für die Muskelzellproliferation und für die Kollagenablagerungen, die man bei einer voll ausgeprägter TVP findet.

Zu den nicht immunologischen Faktoren zählen eine Reihe von Einflüssen, die auch das Risiko einer klassischen Arteriosklerose erhöhen. Insbesondere Hyperlipidämie und Insulinresistenz sind wichtige Risikofaktoren für das Auftreten einer TVP innerhalb eines Zeitraums von 5 Jahren (21).

Sowohl erhöhte LDL-Cholesterolspiegel als auch erhöhte Triglyzeridspiegel tragen hierbei zur Progression der TVP bei. Für das Auftreten einer Dyslipoproteinämie sind wesentlich auch verschiedene Immunsuppressiva verantwortlich. Prednison steigert die Produktion von Apolipoprotein-B-Cholesterol. Cyclosporin erhöht die hepatische

Lipaseaktivität und vermindert die Lipoproteinlipaseaktivität. Dies führt zu einer gestörten Clearance von Low-Density und Very Low Density Lipoproteinen. Auch ein Serumspiegel an C-reaktivem Protein >1,66 mg/dl sowie erhöhte Plasma-Homocystein-Konzentrationen (> 21.6 µmol/liter) sind mit der Entstehung und Progression einer TVP assoziiert (24).

Zusätzlich wird ein Spenderalter über 40 Jahre als Risikofaktor für eine TVP angesehen. Auch eine Infektion mit CMV trägt zur Entwicklung einer TVP bei (25). Sie erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen, was wiederum die Anlagerung von Granulozyten fördert. Ebenfalls wird das Gleichgewicht zwischen Endothelfaktoren gestört. Die Blutfluidität wird reduziert und Gerinnungsprozesse werden gefördert. Letztlich können CMV-Infektionen vermutlich sowohl die Entstehung einer TVP initiieren als auch zur Progression beitragen.

### **1.4.3 Therapie und Prävention der Transplantvaskulopathie**

Wie bereits erwähnt ist die Therapie der TVP sehr unbefriedigend. Infolge der diffusen Verdickung der distalen Gefäße ist eine Revaskularisation nicht möglich, Bypass-Operationen sind mit einem hohen perioperativen Risiko verbunden. Die einzige Therapie ist die Retransplantation. Generell sollten jedoch präventive Maßnahmen im Vordergrund stehen. Hierzu zählt eine präventive CMV-Therapie. Dabei sollten CMV-negative Empfänger, die ein Organ von einem CMV-positiven Empfänger erhalten, mindestens in den ersten 6 Monaten nach Transplantation eine entsprechende antivirale Therapie erhalten. Des Weiteren zählt zu den präventiven Maßnahmen die Gabe lipidsenkender Medikamente sowie die Optimierung der immunsuppressiven Therapie. Statine und Kalziumantagonisten eliminieren das Problem der TVP zwar nicht, haben jedoch gewisse protektive Wirkungen.

Es wurde gezeigt dass Pravastatin die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen signifikant reduziert. Auch Simvastatin reduziert innerhalb des ersten postoperativen Jahres signifikant die Einengung des Gefäßlumens sowie die TVP-Inzidenz innerhalb von 4 und von 8 Jahren (26,27). Es ist nicht klar, ob die positiven Effekte der Statine

lediglich auf ihrer cholesterolsenkenden Wirkung beruhen oder ob auch andere Effekte wie immunsuppressive und antithrombotische Wirkungen sowie Effekte auf Plaquewachstum und -rupturrisiko eine Rolle spielen (28,29). Da 97 % der Transplantierten innerhalb der ersten 7 Jahre eine Hypertonie entwickeln, müssen häufig auch Antihypertonika (z. B. Kalziumantagonisten und ACE-Hemmer) eingenommen werden. Im Vergleich zu Patienten, die keine Antihypertensiva erhalten, kann durch die Gabe dieser Medikamente eine Hyperplasie der Intima reduziert werden (30).

Weiterhin zählen zu den präventiven Maßnahmen eine Optimierung der immunsuppressiven Therapie sowie eine gute Einstellung des Blutzuckers.

## **1.5 Korrelation zwischen Abstoßungsreaktion und HO-1**

Die Ursachen für die chronische Abstoßungsreaktion sind multifaktoriell und nach wie vor nicht ganz klar. Während unstrittig ist, dass sowohl immunologische als auch nicht immunologische Faktoren bei dem Geschehen eine Rolle spielen, ist die relative Bedeutung beider Faktoren nicht vollkommen geklärt. Um das Risiko einer TVP möglichst gering zu halten, wird derzeit das Konzept der Risikofaktoren-Minimierung durchgeführt. Dies beinhaltet eine Optimierung der lipidsenkenden und der immunsuppressiven Therapie sowie eine präemptive CMV-Therapie. Des Weiteren sollte die Ischämiezeit des Spenderorgans möglichst kurz gehalten werden. Auch ein HLA-Matching, insbesondere in Bezug auf den HLA-DR Locus, erscheint sinnvoll. Zur Reduzierung der Ischämiezeit wird seit kurzem ein Perfusionssystem (Organ Care System) klinisch getestet, bei dem das Herz in schlagendem Zustand (normotherm, mit Blut perfundiert) vom Spender zum Empfänger transportiert wird. Hierdurch kann die kalte Ischämiezeit vollständig eliminiert werden. Somit werden etwaige Schäden am Spenderorgan, die durch eine lange kalte Ischämiezeit während des Transports auftreten und später das TVP-Risiko erhöhen, minimiert.

Dieses System eröffnet auch weitere Möglichkeiten im Hinblick auf eine Prävention der TVP.

Derzeit ist ein prospektives HLA Matching aufgrund des Mangels an Spenderorganen und der Notwendigkeit, die kalte Ischämiezeit möglichst gering zu halten, praktisch

nicht durchführbar. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass zukünftige Verbesserungen bei der Prävention der TVP vor allem durch Weiterentwicklung der Immunsuppression sowie durch Optimierung der Organkonservierung zu erwarten sind. In den letzten Jahren wurde die Rolle des Proteins HO-1 in Zusammenhang mit der Organtransplantation erforscht. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass HO-1 einen deutlichen positiven Effekt bei der Prävention einer TVP hat (31-33).

Das HO-1 System spielt eine wichtige zytoprotektive Rolle, die in Phasen zellulären Stresses große Bedeutung hat. Die Zytoprotektion wird am wahrscheinlichsten durch die Elimination von Häm vermittelt sowie dessen Abbauprodukte (Biliverdin, CO und freies Eisen). HO-1 ist ein allgegenwärtiges Stressprotein und wird durch verschiedene Faktoren in vielen Zellen induziert. Das HO-1 System hat vier Hauptfunktionen: Antioxidative Funktion, die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation, die Modulation des Zellzyklus sowie eine antiinflammatorische Funktion (1).

Die Antioxidative Wirkung ist auf dem Abbau von Häm, Sauerstoffverbrauch, Biliverdin und die Produktion von Ferritin durch Eisenakkumulation zurückzuführen. Die Produktion von CO, die eine vasodilatorische und thrombozytenaggregationshemmende Wirkung hat, spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation und daher der antiapoptotische Eigenschaft des Proteins.

Der Häm-Katabolismus und die HO-1-Überexpression haben einen direkten und indirekten hemmenden Effekt auf die inflammatorische Kaskade, die bei den Organempfängern über Neutrophile, Makrophagen und Lymphozyten vermittelt wird. Dies verhindert frühe Verletzungen im reperfundierten Organ und dadurch eine Abstoßungsreaktion (2).

Tierexperimentelle Versuche ergaben, dass diese antiinflammatorische Eigenschaft zytoprotektiv für das Transplantat wirkt. Es zeigte sich, dass eine Überexpression von HO-1 im Transplantationsmodell zu einer Protektion des Transplantates gegenüber Ischämie- und Reperfusionsschaden sowie akuter und chronischer Abstoßung führt.

Daher kann das HO-1 System als eine neue Perspektive für ein therapeutisches Konzept nach einer Herztransplantation dienen. Die Rolle des HO-System als neuartige Strategie, um eine antigenunabhängige Ischämie- und Reperfusionsschaden abzuschwächen, wurde in einer Reihe von Transplantationsmodellen dokumentiert.



## **2 Material und Methode**

In diesem Experiment möchten wir den Einfluss von zwei Proteinen, eGFP und HO-1, auf die Transplantvaskulopathie untersuchen. Hierbei haben wir unsere Proteine mit Hilfe kultivierter E-coli Bakterien hergestellt und gereinigt. Diese wurden zuerst unter Einsatz des Vektors pET-28b(+) mit PTD ligiert.

PTD sind kurze, aus 11 Aminosäuren aufgebaute Peptide, die unabhängig von klassischen Rezeptoren oder Endozytose frei durch Zellmembran passieren können (61). PTDs können als Träger für Makromoleküle, wie z. B. funktionelle Proteine, fungieren, um diese in die Zellen einzubringen. Die PTD-fusionierten Proteine behalten ihre biologischen Funktionen auch nach ihrer Einbringung in die Zellen.

Im Verlauf des Experiments wurden Aortentransplantate von Brown Norway (B)N Ratten unter ausreichender Anästhesie explantiert und jeweils 6 Explantate mit HTK-Lösung, 6 mit PTD-HO-1 und 6 mit PTD-eGFP intraluminal infundiert. Bis zur Transplantation erfolgte die Aufbewahrung in HTK-Lösung bei einer Temperatur von 4°C. Die explantierten Aortentransplantate wurden nachfolgend zu unterschiedlichen Zeitpunkten LEW Ratten unter ausreichender Anästhesie mittels End-zu-End-Anastomose implantiert. Nach Ablauf von acht Wochen wurden die Aortentransplantate entnommen und es wurden histologische Schnitte angefertigt und diese anschließend bewertet.

Das gewählte Verfahren der Proteintransduktion ist im Vergleich zu anderen Methoden wie der Metalloporphyrin-Induktion oder einem viralen vektorvermittelten Gentransfer in der Dosis kontrollierbarer und nebenwirkungsärmer (49,50).

## 2.1 Klonen von Proteinfragmenten

In der Untersuchung wurde ein 72-er Vorwärts-Primer verwendet, der die Oligonukleotide für ein PTD-Peptid und die Endonuklease-Stellen für *NheI* und *EcoRI* enthielt

(5'-AAGCTAGCGGCTATGCTCGCGCTGCTGCTCGCCAGGCTCGCGCTGGTGAAT TCCGCCACATGGTGAGCAAGG-3'), sowie ein 29-er Rückwärtsprimer, der die Endonuklease-Stelle für *HindIII* enthält (5'-GCAAGCTTCTTGTACAGCTCGTCCATGCC -3'). Diese beiden Primer wurden für die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten aus einem Stück DNA gewonnen, die die eGFP Gene enthielten. Die Vervielfältigung wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter optimalen Bedingungen durchgeführt.

Das PCR-Produkt wurde in einem TOPO-TA cloning-vector (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) gemäß der Herstellerangaben ligiert. Positive Plasmide wurden mittels ausreichend *NheI* and *HindIII* Endonukleasen behandelt, folgend wurden die DNA Fragmente von PTD-eGFP in ein pET-28b(+) Expressionsplasmid eingefügt (Novagen, Wisconsin, WI, USA).

Ein Vorwärtsprimer (5'-TAGAATTCATGGAGCGTCCGCAACCCGAC-3') und ein Rückwärtsprimer (5'-CGAAGCTTCATGGCATAAAGCCCTACAGC-3'), oder ein Vorwärtsprimer (5'-GCGAATTCGTACCATGTGCTTTACTTTG-3') und ein Rückwärtsprimer (5'-GCAAGCTTTTATTTTGTACACCAGACCAA-3') wurden verwendet, um DNA Fragmente von human-HO-1 zu vervielfachen. Dies wurde ebenfalls mittels PCR durchgeführt.

Das pET-28b(+)-PTD-eGFP Plasmid wurde geöffnet mittels *EcoRI* und *HindIII* und die DNA Fragmente, die pET-28b(+)PTD enthielten, wurden gereinigt mittels eines „gel purification kit“ (Qiagen, Hilden Germany).

DNA-Fragmente von human-HO-1 wurden ligiert mit pET-28b(+)-PTD, um Expressionsplasmide für PTD-OH-1 zu generieren. Die Richtigkeit dieser Plasmide wurde durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Gene Art, Regensburg, Germany).

Im Anschluss generierten wir dann schließlich die beiden Plasmide,

pET-28b(+)-PTD-eGFP und pET-28b(+)-PTD-HO-Plasmid, die wir dann anschließend noch mittels PCR vervielfältigten und im Anschluss reinigten. Die Vektoren pET-28a-c(+) ermöglichen die Expression der Zielgene unter Kontrolle des T7-Promotors.

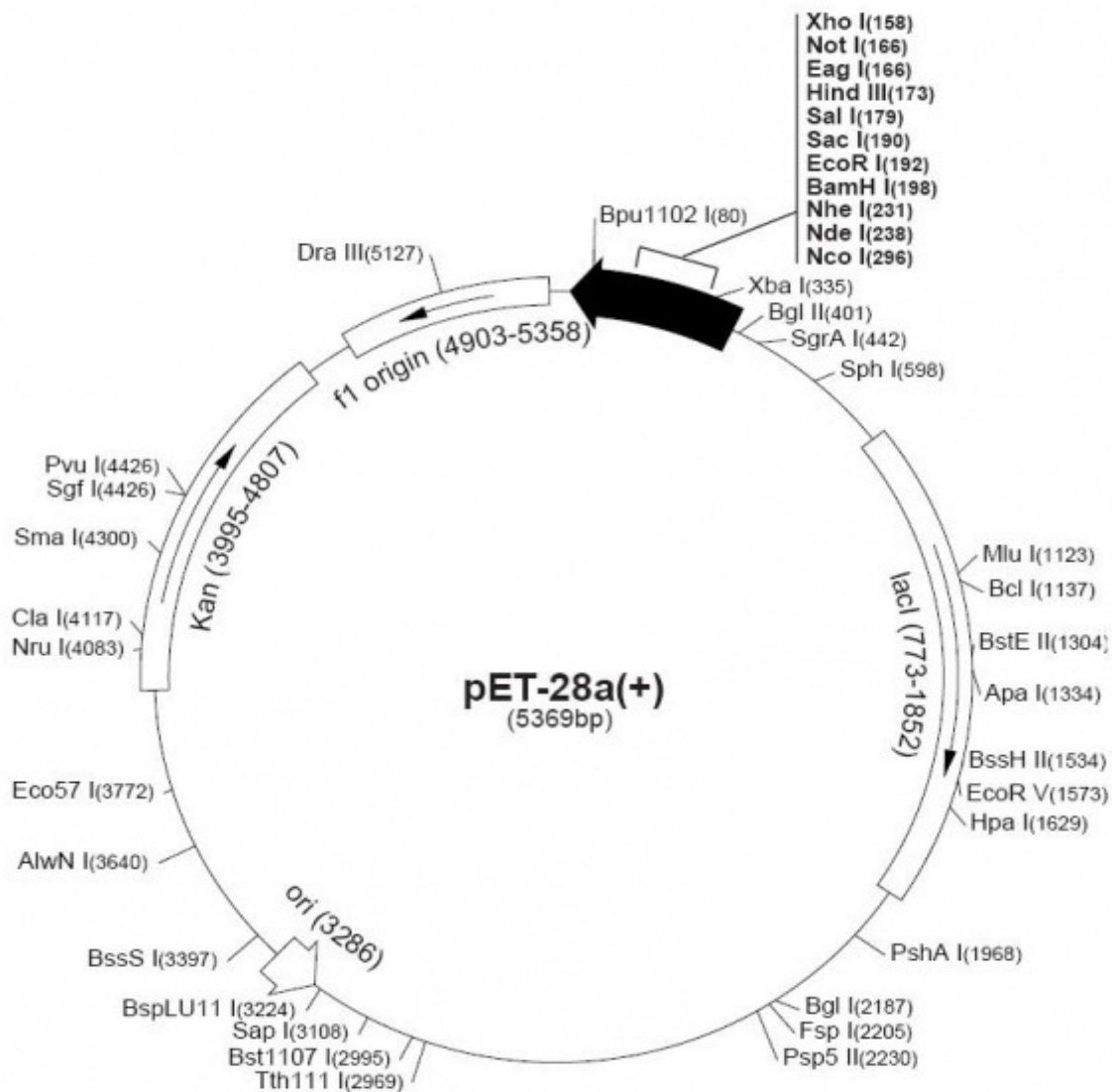


Abbildung 2.1: Aufbau des verwendeten Expressionsvektors pET-28a-c(+). Die Karten für pET-28b (+) und pET-28c (+) sind dieselben, wie die hier für pET-28a (+) dargestellte, mit folgenden Unterschieden: pET-28b (+) ist ein 5368bp Plasmid, also Subtraktion von 1bp von jedem Standort über BamHI bei 198. pET-28c (+) ist ein 5367bp Plasmid, also Subtraktion von 2bp von jedem Standort über BamHI bei 198 (77).

## 2.2 Rekombinante Proteinexpression und Purifikation

Für die Anzucht von E.coli im Schüttelkolben wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt. Expressionsplasmide wurden in eine „E.coli strain“ transformiert (Rosetta(DE3) pLysS (Novagen, Wisconsin, WI, USA).

Die transformierten Bakterien wurden in 20ml LB Broth 2,5 % mit 50 mcg/ml Kanamycin bei einer Temperatur von 37°C und unter 200rpm Vibration über Nacht kultiviert (Abb. 2.2).

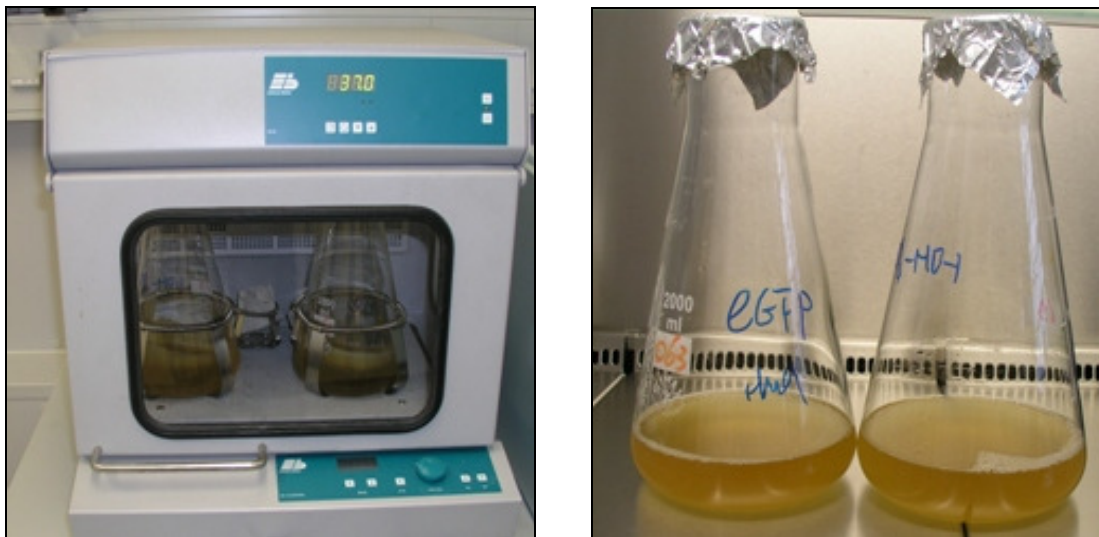


Abbildung 2.2: Vor der Induktion mit IPTG. Bakterien werden im Schüttelkolben über die Nacht kultiviert. Diese Bakterien tragen das Plasmid pET-28b(+)-PTD-HO-1 bzw. pET-28b(+)-PTD-eGFP.

Im Anschluss wurde jeweils 1ml entnommen und die Dichte bestimmt. Wenn die optische Dichte der Bakterien bei einer Wellenlänge von 590 nm einen Wert von 0,6 erreichte ( $OD_{600} = 0,6$ ), wurde den kultivierten Bakterien 0,7  $\mu\text{M}$  von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) zugefügt und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln bei 120 rpm kultiviert (18h). Dies diente der Induktion der Proteinproduktion (Abb. 2.3).

Nach Proteininduktion über Nacht wurden unsere Proben mit einer Drehgeschwindigkeit 8000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und für eine weitere Nacht bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.



Abbildung 2.3: Kultivieren über Nacht von Bakterien, die das Plasmid pET-28b(+)-PTD-HO-1 enthalten. Links nach Induktion mit IPTG (die Probe wird grün gefärbt, dies beruht auf der Produktion von Biliverdin durch die enzymatische Funktion der HO-1). Rechts ohne IPTG-Induktion (die Probe behält ihre gelbe Farbe)(51).

Der erste Schritt zur Reinigung des Zielproteins ist die Abtrennung der Zellen vom Kulturmedium durch Zentrifugation. Anschließend müssen die Zellen eröffnet werden, um das Zielprotein freizusetzen. Dies erfolgte durch die später eingesetzte Sonikation (Abb. 2.4).

Der gesamte Reinigungsprozess erfolgte bei konstant niedriger Temperatur (4°C). Ziel eines Reinigungsverfahrens ist die Anreicherung des gewünschten Proteins in möglichst hoher Reinheit und Aktivität.

Der „releasing buffer“, der zur Suspension der Bakterien-Pellets verwendet wurde, enthielt PBS mit dem pH-Wert 7,4, 20 mM Imidazol, 6 M Urea und vollständige Proteaseinhibitoren ohne EDTA (Roche, Mannheim, Germany), um die

Denaturierung unserer Proteine durch andere Enzyme zu verhindern. Lysozyme aus Hühnerei in einer Konzentration von 100 ng/ml wurden der Suspension zugefügt, um die „rebase“ rekombinanter Proteine zu erhalten.

Nach Vorbereitung der Lösung wurde die Sonikation für 5 Minuten bei 60 % Energie-Output durchgeführt (Abb. 2.4).

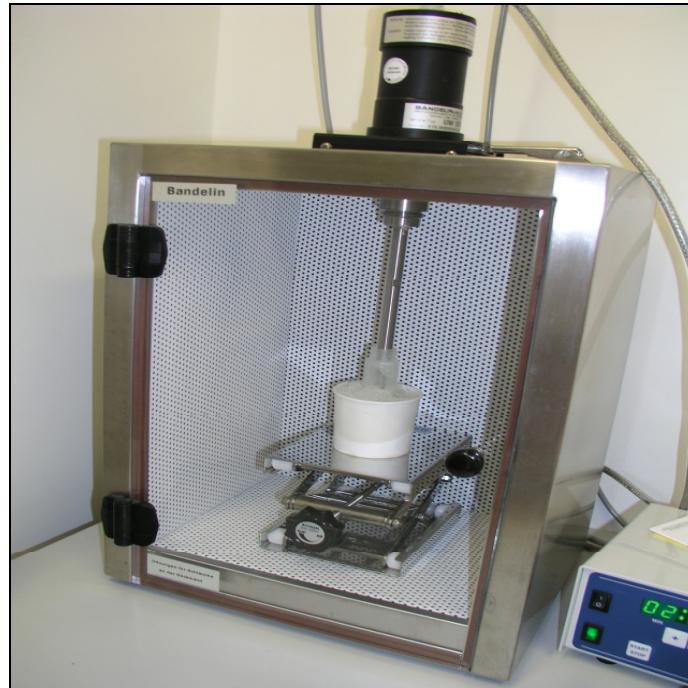


Abbildung 2.4: Sonikator an der Uniklinik Eppendorfer Hamburg während Sonikation unserer Lösung. Durch die hochfrequenten Schallwellen werden die Zellmembranen der Bakterien zerstört und die Zellinhalte werden in der Lösung freigesetzt.

Im Anschluss wurde das Produkt der bakteriellen Lyse durch Zentrifugation mit einer Geschwindigkeit von 20,000 rpm für 30 Minuten bei 4 °C geklärt. Nach Zentrifugation befand sich unser Protein in der Lösung, der Rest war nun Abfall.

Der geklärte Überstand wurde in eine 1 mL „HiTrap His column“ (Amersham, GE, Munich, Germany) mittels eines Chromatographiesystems (ÄKTExpress, Amersham, GE, Munich, Germany, Abb. 2.5) bei einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min eingebracht. Die Säule wurde mit 40 ml “releasing buffer” gewaschen und dann mit “elution buffer” mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/h eluiert. Der “elution buffer” enthielt PBS, hatte einen pH-Wert von 7,4, 500 mM Imidazol, 6 M Urea, sowie einen kompletten Proteaseinhibitor ohne EDTA.



Die ersten 2,5 mL der Lösung wurden rasch in eine vorpräparierte „PD-10 desalting column“ eingebracht und mit 3,5 mL einer „HTK solution“ (Custodiol®, Köhler Chemie, Alsbach, Germany) aufgefangen.

Alle Proteine wurden ausgewaschen, lediglich unser Protein blieb in der „HiTrap His column“ gebunden. Im Anschluss wurde unser Protein mit „elution buffer“ aus der Säule ausgespült.

Die entsalzten Proteinlösungen wurden nun in flüssigem Stickstoff mit 10 % Glycerol eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

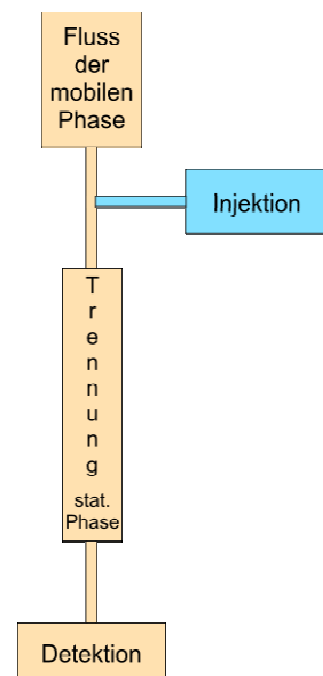


Abbildung 2.5: Chromatographie-System (ÄKTExpress, Amersham, GE, Munich, Germany) mit schematischer Darstellung der Funktion des Systems. Auftrennung eines Stoffgemisches durch unterschiedliche Verteilung seiner Einzelbestandteile. In der Chromatographie werden unterschiedliche Substanzen (= Treibgut) in der so genannten mobilen Phase (Phase, in die das Substanzgemisch am Beginn des Trennsystems eingebracht und die bewegt wird) auf einer stationären Phase (Phase, die mit den einzelnen Substanzen des Substanzgemisches Wechselwirkungen eingeht und sich nicht bewegt) befördert. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen der Probe, der stationären Phase und der mobilen Phase werden einzelne

Substanzen unterschiedlich schnell weitertransportiert und werden somit voneinander getrennt.

## 2.3 Identifikation des Proteins mittels SDS-PAGE

SDS-PAGE (**S**odium **D**odecyl**s**ulphate **P**olyacrylamid-**G**elelektrophorese) ist eine häufig verwendete Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Man versteht darunter eine analytischen Methode der Biochemie zur Trennung und Charakterisierung von Stoffgemischen (Analyse von Proteinen) nach der Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Die Proteine werden anschließend mit Coomassie Brilliant Blau nachgewiesen.

### Arbeitsschritte bei der Protein-Gelelektrophorese:

- Präparation der Proteine (Bakterien-Lysat, Zelllysate)
- Denaturierung der Proteine
- Auftrennung der Proteine im Proteingel (SDS-PAGE, Abb. 2.6, Abb. 2.7)
- Färben der Proteine, Detektion

Nach Präparation der Proteine (s. oben) wurden diese in sechs Gefäße aufgeteilt:

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 1. eGFP Zelllysate | 1. HO-1 Zell lysat |
| 2. eGFP Durchfluss | 2. HO-1 Durchfluss |
| 3. eGFP Elution    | 3. HO-1 Elution    |

Als Trennmedium (auch als Matrix bezeichnet) bei dieser Art der Elektrophorese dient ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis. Zusätzlich kommt SDS zum Einsatz. Dieses anionische Tensid überdeckt die Eigenladungen von Proteinen. Pro Gramm Protein binden ungefähr 1,4 Gramm SDS, sodass die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Die negativen Ladungen des SDS



führen zu einer gegenseitigen Abstoßung, was zusammen mit der Denaturierung durch Aufkochen zu einer Linearisierung der Proteine führt.

Dies erlaubt eine Auftrennung nach der Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, denn die längeren Proteine werden im Gel stärker zurückgehalten als kürzere Proteine.

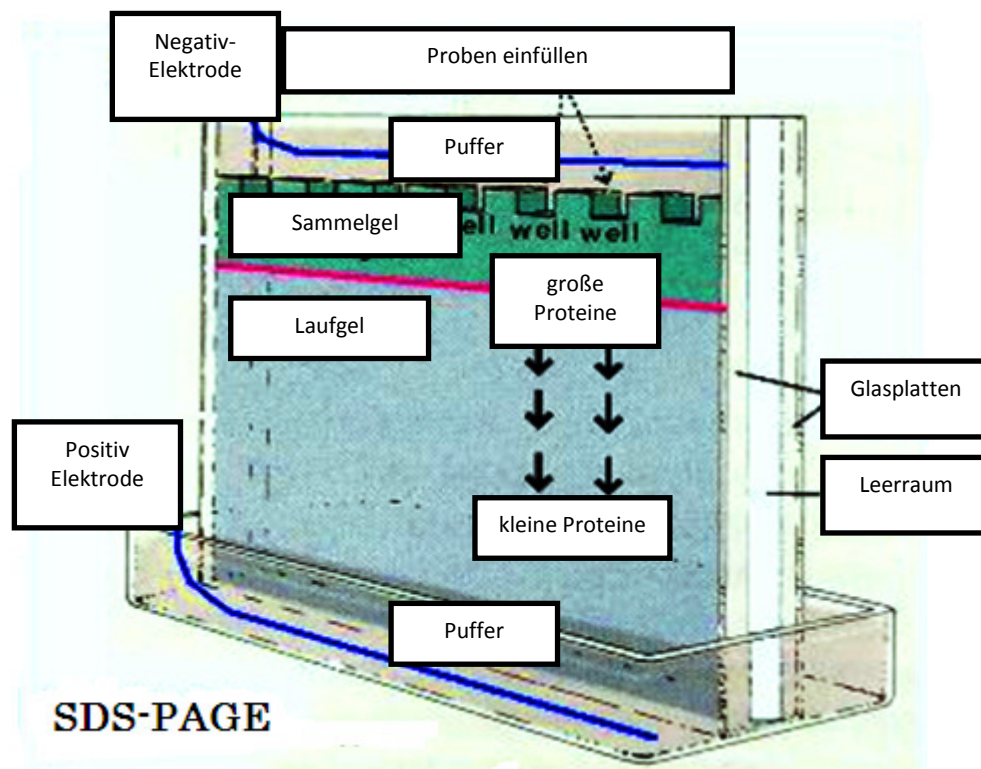


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung einer apparativen SDS-PAGE.

### Erstellung der Gele

1. Trenngel: 30% Acrylamide bis 3,1ml, 1M Tris PH 8,8 3ml, dd Wasser 1,262ml, 10% SDS 76µl, 10% APS (Ammonium persulfat) 36µl und TEMED 5µl. Diese wurden zusammen gemischt und 20 Minuten inkubiert.

2. Sammelgel: 30% Acrylamide bis 1ml, 1M Tris PH 6,8 0,63ml, dd Wasser 3,525ml, 10% SDS 50µl, 10% APS (Ammonium persulfat) 25µl und TEMED 5µl. Diese wurden zusammengemischt und 20 Minuten inkubiert.

Im Anschluss wurde der „runningbuffer“ vorbereitet: Für 1 Liter Puffer wurden Tris 3,03g, Glycin 14,4g und SDS 1g gemischt.

Die vorbereiteten Gele (Gel 2 im oberen Bereich (= Stacking Gel/Sammelgel) und Gel 1 im unteren Bereich (= Running Gel/Trenngel)) wurden für eine Nacht bei einer Temperatur von -40 °C gelagert.

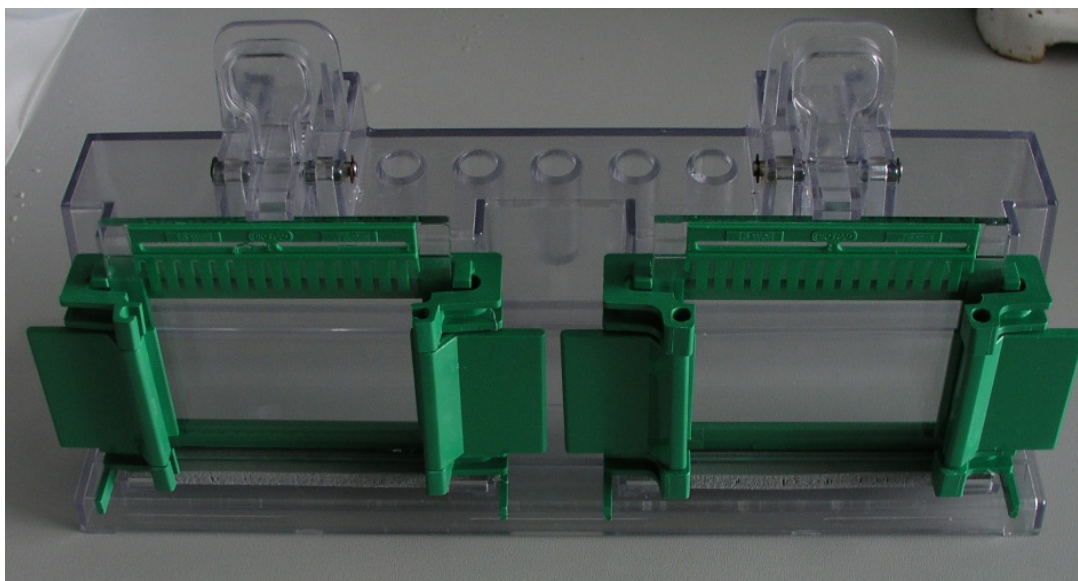


Abbildung 2.7 : Vorbereitung der SDS-PAGE im Labor an der Uniklinikum Hamburg.

Im weiteren wurde SDS bei der Probenvorbereitung im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben und die Probe anschließend auf 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufzubrechen. Am Ende dieser Präparation wiesen die mit SDS beladenen Proteine eine ellipsoide Form auf.

Zur Auftrennung wurden die denaturierten Proteine aus den Proben auf ein Gel aus Polyacrylamid geladen, das in geeignete Elektrolyten eingelegt ist. Danach wurde eine elektrische Spannung angelegt, die eine Migration der negativ geladenen Proben durch das Gel bewirkte.

Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer durch das Gel wandern. Am Ende des Vorganges sind alle Proteine nach Größe sortiert und können durch weitere Verfahren (Färbungen, wie z. B. die Coomassiefärbung oder die Silberfärbung, immunologische Nachweise, wie z. B. beim Western Blot) sichtbar gemacht werden. Hier wurde die Coomassiefärbung verwendet (Abb. 2.8). Zusätzlich zu den Proben wird meistens ein Größenmarker auf das Gel geladen. Dieser besteht aus Proteinen von bekannter Größe und ermöglicht dadurch die Abschätzung der Größe der Proteine in den eigentlichen Proben.

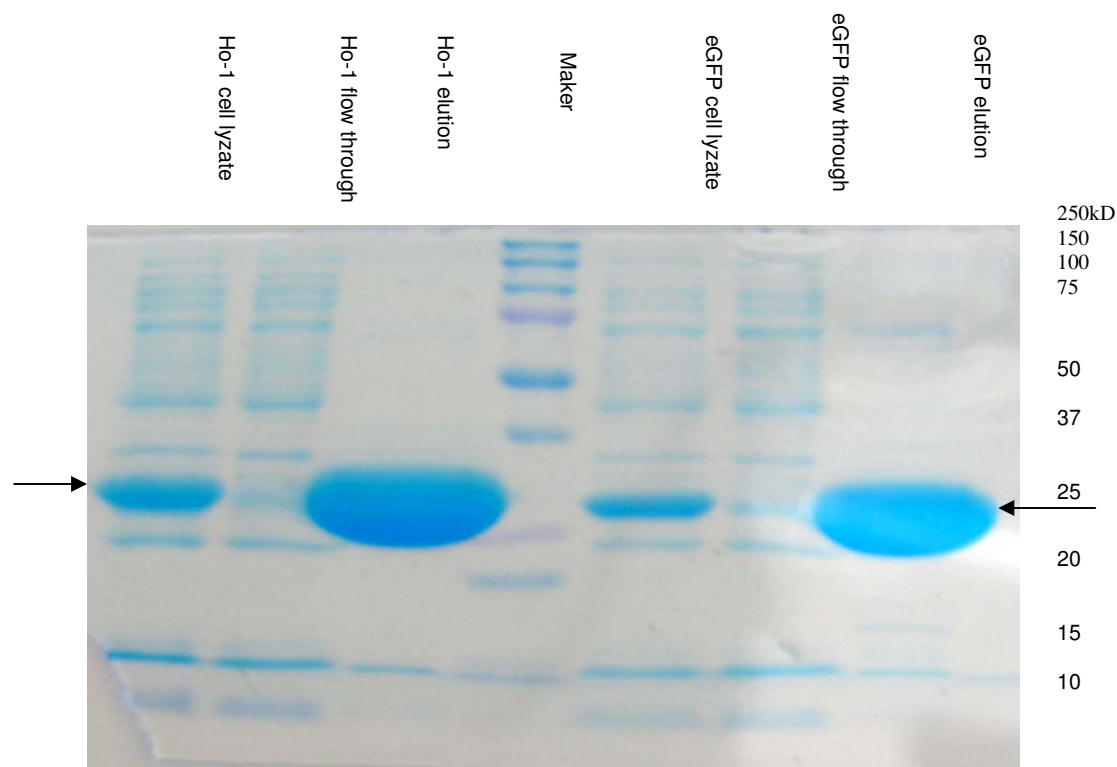


Abbildung 2.8: Trennung und Charakterisierung unserer Proteine nach Coomassie-Färbung.

## **2.4 Prozess der Transplantation**

### **Tiere**

Für den Versuch wurden entweder männliche Brown Norway (BN, RT1<sup>n</sup>) oder männliche LEW (RT1<sup>l</sup>) Ratten mit einem Gewicht von 250 - 300 g verwandt (Charles River Labs (Münster, Deutschland)). Die Durchführung aller Experimente erfolgte, nach den Richtlinien des Instituts, im Tierstall des Univesitätsklinikums Regensburg unter strikter Beachtung des Tierschutzgesetzes.

### **Modell der allogenen Aortentransplantation**

Das Gewicht der BN- und LEW-Ratten zum Operationszeitpunkt betrug 200-250 g. Für syngene Transplantate wurden LEW Ratten als Empfänger verwendet. Die Anästhesie der Ratten erfolgte mittels intraperitonealer Injektion einer Lösung, die Ketamin (100 mg/kg; Bayer, Leverkusen, Germany) und Xylazine (10 mg/kg; Bayer, Leverkusen, Germany) enthielt.

Nach adäquater, sorgfältiger Anästhesie wurde Heparin-Natrium Lösung (200U/kg; Nordisk Pharma, Mainz, Germany) via Vena dorsalis penis zur Heparinisierung des Tieres injiziert.

Bei den Spendertieren erfolgte eine mediane Laparotomie in Rückenlage. Die Aorta abdominalis wurde präpariert und in situ mittels eiskalter HTK-Lösung (Custodiol®, Köhler Chemie, Alsbach, Germany) perfundiert. Im Anschluss erfolgte die Entnahme. In die Aortentransplantate wurde dann das jeweilige zuvor hergestellte PTD-fusionierte Protein bzw. bei der Kontrollgruppe die HTK-Lösung mit 200 µg intraluminal infundiert. Die so präparierten Aortenexplantate wurden in einer HTK-Lösung (300µl) bei einer Temperatur von 4 °C bis zum jeweiligen Transplantationszeitpunkt konserviert.

Bei den Empfängerratten erfolgte, ebenfalls nach adäquater Anästhesie eine mediane Laparotomie. Die Implantation der präparierten Aortenexplantate erfolgte mittels Interposition durch eine End-zu-End-Anastomosierung in die Bauchaorta der Empfängertiere.

## 2.5 Protokolle des Experiments

### Die Versuchsgruppen wurden wie folgt unterteilt

- **Ohne Behandlung (HKT):** 6 transplantierte LEW Ratten ohne Proteinbehandlung (nur mit HKT-Lösung).
- **PTD-eGFP:** 6 LEW Ratten als Empfänger wurden mit dem Kontrollprotein behandelt.
- **PTD-HO-1:** 6 LEW Ratten als Empfänger wurden mit dem Untersuchungsprotein behandelt.

### Histologische Analyse und Immunhistochemie

Die Transplantate wurden nach Ablauf von 8 Wochen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, in OTC-Lösung eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Gewebe wurden mit einem Kryostatmikrotom (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) in Scheiben vom 5 µm geschnitten. Zur immunhistochemischen Färbung wurden CD45 (OX-1, leukocyte; BD pharmingen, Heidelberg, Germany), CD4 und IL17 verwendet. Diese monoklonalen Antikörper wurden verwendet, um die Transduktion von PTD-fusioniertem Proteinen und die Phänotypen der Immunzellen, die die Transplantate infiltrieren, darzustellen.

Die Immunhistologie stellt eine wesentliche Ergänzungsmethode für die Diagnostik dar. Mit ihr lassen sich gezielt bestimmte Proteine durch Antikörper in Zellen darstellen.

- **Interleukin-17 (IL-17)** ist ein pro-inflammatorisches Signalzytokin, das mit Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wird. IL-17 wird hauptsächlich durch kürzlich entdeckte CD4+ Effektor-T-Helfer-Zellen produziert. IL-17 wirkt auf einer breiten Palette von Zelltypen, die die Expression von Zytokinen induzieren, z. B. Chemokine und Metalloproteinasen. IL-17 ist auch ein wichtiges Zytokin für die Rekrutierung,

Aktivierung und Migration von Neutrophilen. Darüber hinaus sind Th17-Zellen potente Induktoren von Entzündungsreaktionen im Gewebe und spielen bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle.

- **CD4** (cluster of differentiation 4) ist ein Glykoprotein, das an der Oberfläche von Zellen des Immunsystems (T-Zell-Untergruppen, Monocyten und Makrophagen) vorkommt. Tests, die die Anzahl von Zellen bestimmen, die dieses Molekül tragen, geben einen Einblick in den Zustand des Immunsystems. CD4 binden an MHC-II.
- **CD45** ist ein membranständiges Protein, dessen intrazellulärer Abschnitt eine Tyrosin-Phosphatase-Aktivität aufweist. Es wird angenommen, dass CD45 als Oberflächenrezeptor wirkt. Für die immunhistologische Differenzialdiagnostik fungiert es als Pan-Leukozytenmarker. Auf menschlichen Leukozyten kommt das CD45-Antigen in fünf verschiedenen Isoformen vor. Diese haben ein Molekulargewicht von 180 bis 220 kD. Verschiedene Antikörper erkennen unterschiedliche Isoformen, in der Diagnostik wird deshalb ein Gemisch aus zwei monoklonalen Antikörpern (Clon 2B11 und PD7/26) als Pan-Leukozytenmarker verwendet. Mit dem Pan-Leukozytenmarker werden lymphoide Zellen membranständig markiert. CD45-Isoformen spielen eine entscheidende Rolle bei der komplexen Signaltransduktion an dem T- und B-Zell-Antigenrezeptor. Dieser hier verwendete Antikörper ist spezifisch für das Maus-CD45 und ist geeignet für immunhistochemische Färbung. Makrophagen und Histiozyten zeigen ein variables Reaktionsmuster. Neutrophile Granulozyten werden in der Regel nicht markiert, ebenso sind Plasmazellen negativ für CD45.

### **Mikroskopie und Evaluation der intimal Prolifiration**

Die Bilder wurden mit einer hochauflösenden Kamera (Spot 2000) digitalisiert unter software control (Metamorph, Universal Imaging Corporation, West Chester, New York, USA) mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz DM RBE) unter Verwendung

geeigneter Filter. Belichtung und Bildverarbeitung waren während allen Sitzungen standardisiert.

In der Mikroskopie wurde die Dicke der Intima ausgemessen. Alle Messungen wurden im Doppelblindversuch durchgeführt.

Alle Daten von den Experimenten wurden mittels univariater ANOVA sowie Bonferroni's multiple Comparisons analysiert.  $P < 0,05$  wird statistisch als signifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse

Die transplantierte Aorta wurde nach Ablauf von zwei Monaten den LEW-Ratten (Tab. 3.1) unter einer adäquaten Anästhesie wieder explantiert. Das Gewebe wurde mittels Kryostamikrotomt (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) in Scheiben von 5 µm geschnitten. Im Anschluss erfolgten zur Darstellung der Proteine immunhistochemische Verfahren, eine H&E- und Elastinfärbung, sowie eine Fluoreszenzmikroskopie.

Tab. 3.1 Gruppenunterteilung der transplantierten LEW-Ratten.

Gruppe	Therapie	n	überleben bis zur Explantation
1	HTK Lösung	6	6/6 (100%)
2	PTD-eGFP	6	6/6 (100%)
3	PTD-HO-1	6	6/6 (100%)

#### 3.1 Überblick eines Aortenquerschnitts der nicht transplantierten Ratten

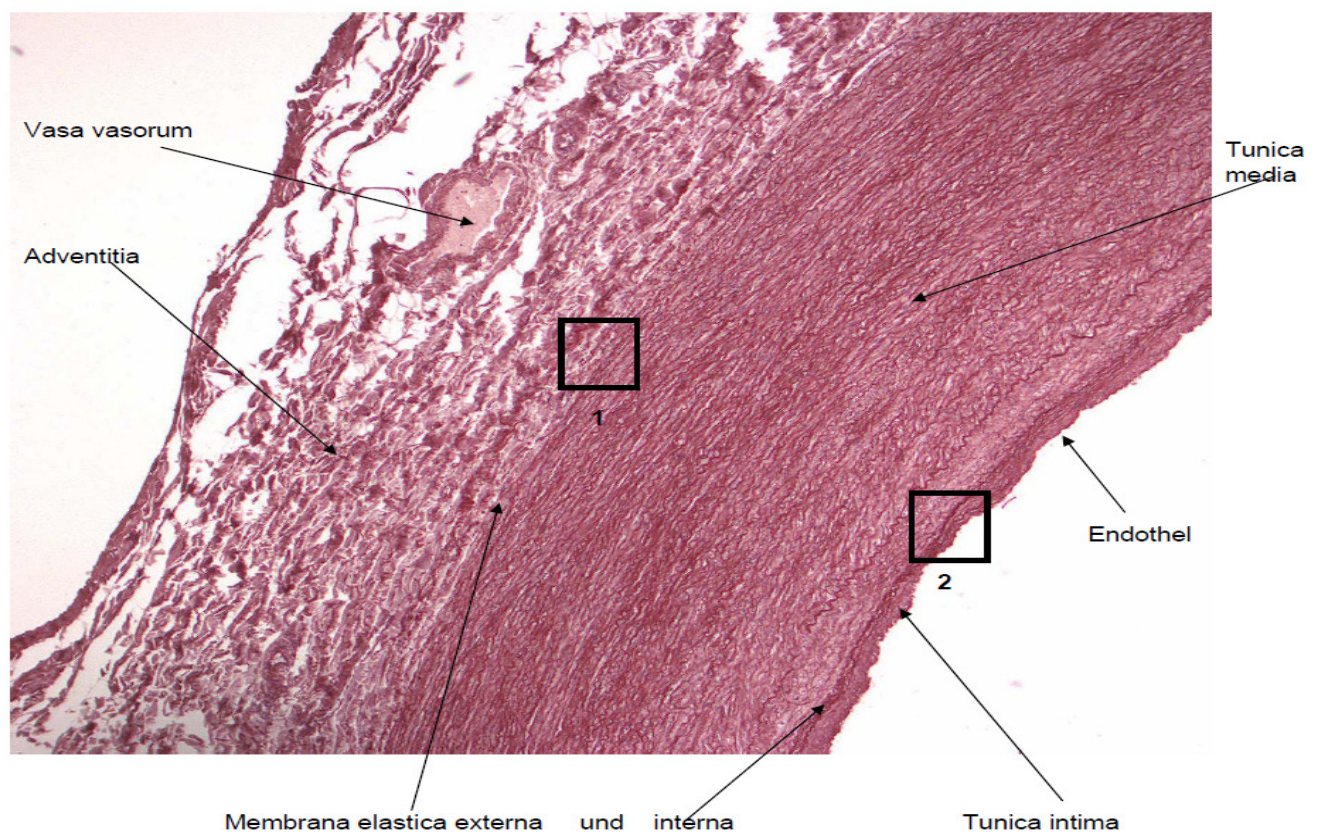
Die elastischen Arterien, dazu gehört die Aorta, sind üblicherweise aus drei Schichten aufgebaut (Tab. 3.2): Intima, Tunica media und Tunica adventitia (Abb. 3.1, Abb. 3.2). Die Intima besteht aus einer Schicht von Endothelzellen, die das Lumen des Gefäßes begrenzen, sowie einer subendothelialen Schicht, die zumeist aus lockerem Bindegewebe besteht.

Die innere elastische Lamina bildet die Begrenzung zwischen der Tunica intima und der Tunica media. Die Tunica media ist hauptsächlich aus glatten Muskelzellen zusammengesetzt. Die externe elastische Lamina bildet die Begrenzung zwischen der Tunica media und der Tunica adventitia. Die Tunica adventitia wird hauptsächlich aus lockerem Bindegewebe, aus Fibroblasten und dazugehörigen Kollagenfasern zusammengesetzt.



Tabelle 3.2 Die histologischen Schichten einer elastischen Arterie (Aorta)

<b>Tunica intima</b>	<b>Tunica media</b>	<b>Tunica adventitia</b>
1. Endothelzellen-Schicht	1. Glatte Muskelzellen, Kollagenfasern, und Grundsubstanz	1. Meistens kollagenen Fasern
2. subendotheliale Schicht	2. Elastin in Form von gefenstert elastischen Lamellen (elastischen Arterien)	2. Elastische Fasern (nicht Lamellen)
3. Interne elastische Membran	3. Externe elastische Membran	3. Fibroblasten und Makrophagen
		4. Vasa vasorum



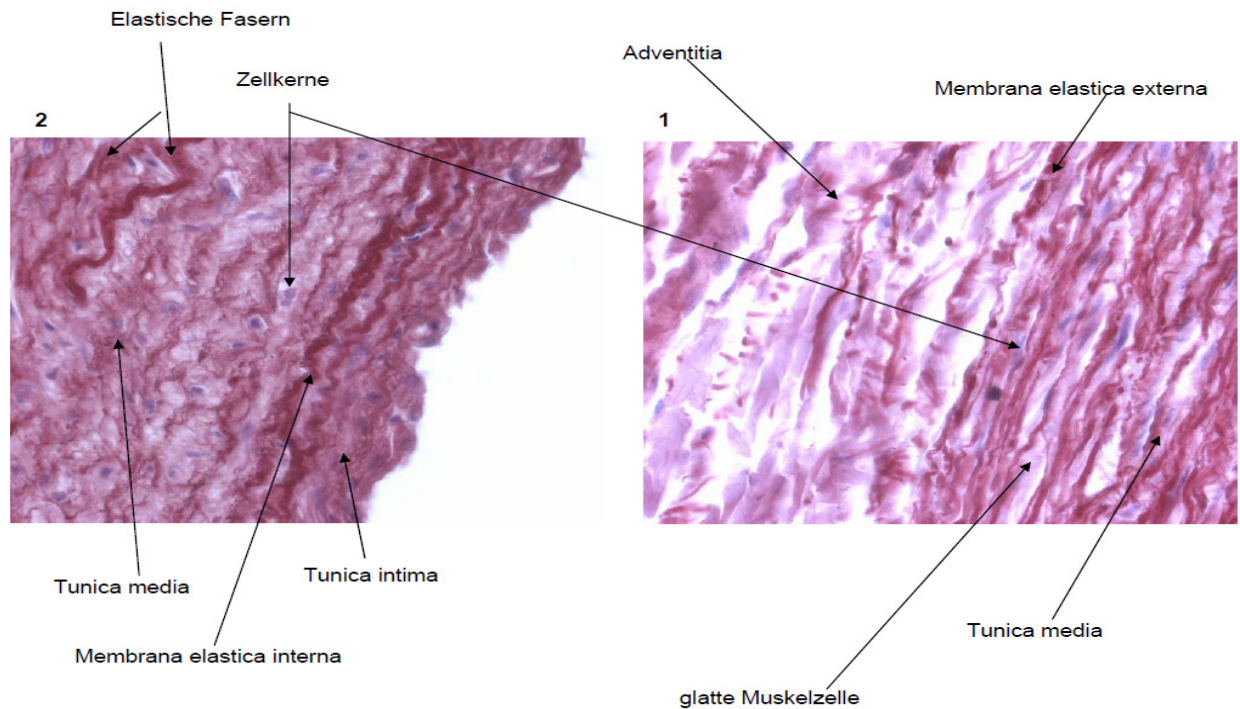


Abbildung 3.1 : Querschnitt durch die Aorta mit Beschriftung der wichtigsten Strukturen nach Elastica-Färbung.

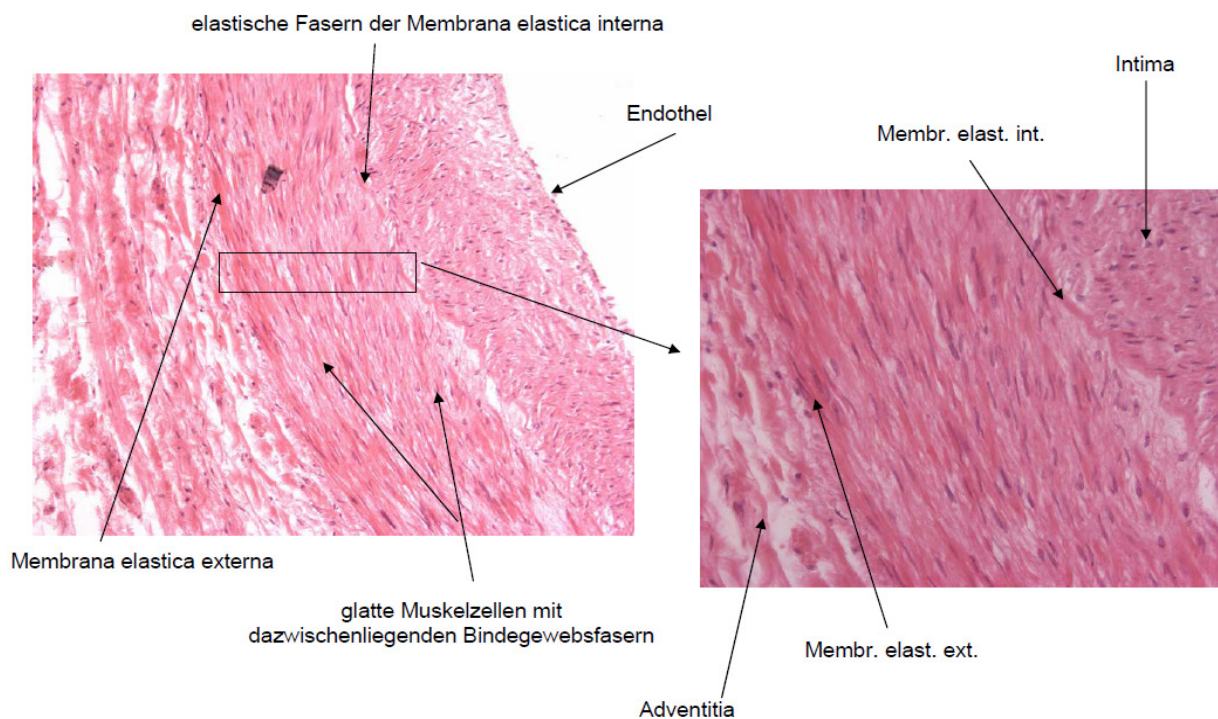


Abbildung 3.2: Histologisch-Normaler Querschnitt durch die Aorta mit Beschriftung der wichtigsten Strukturen nach H&E-Färbung.



### 3.2 Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung und Lokalisierung von eGFP bei unterschiedlicher Konzentration bzw. zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Das „enhanced“ grün fluoreszierende Protein (eGFP, enhanced green fluorescent protein, Abb.3.3) ist ein erstmals 1961 von Osamu Shimomura (34,35) beschriebenes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Seine große Bedeutung in der Biologie, insbesondere der Zellbiologie, liegt in der Möglichkeit, GFP mit beliebigen anderen Proteinen genspezifisch zu fusionieren, wie auch im Rahmen unseres Experimentes geschehen. Durch die starke Fluoreszenz des eGFP kann so die räumliche und zeitliche Verteilung des anderen Proteins in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen direkt beobachtet werden (75).

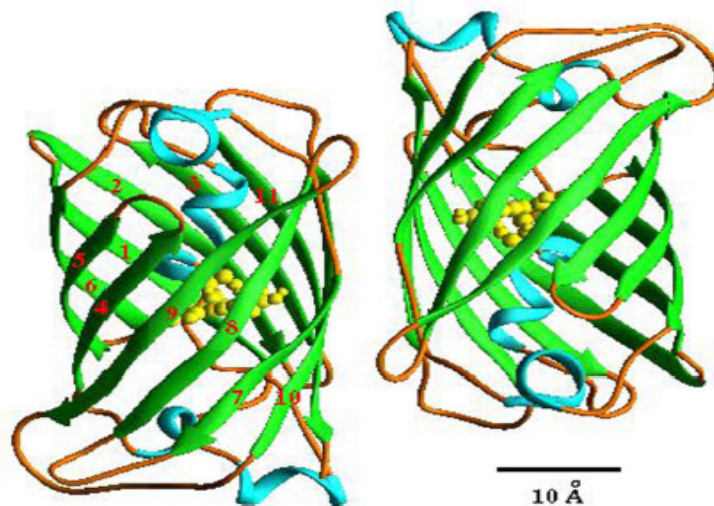


Abbildung 3.3: Struktur von GFP aus *Aequorea victoria*. GFP besitzt eine einzigartige Struktur, die auch als b-can Struktur bezeichnet wird. Die grünen Pfeile symbolisieren sog. b-Faltblätter. Beim GFP sind 11 b-Faltblätter so angeordnet, so dass sie einen Zylinder bilden. Im inneren des Zylinders befindet sich eine  $\alpha$ -Helix (blau) die den Chromophor (gelb) im Zentrum des Zylinders hält. Der Zylinder ist oben und unten durch weitere Strukturelemente geschlossen. Diese kompakte Struktur ist sehr stabil und so gut geschlossen, dass keine kleinen Moleküle ins Innere eindringen können. Dies ist essentiell für die Fluoreszenz des Chromophors (75).

In unserem Versuch haben wir das Protein mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz DM RBE) unter Verwendung eines adäquaten Filters dargestellt (Abb. 3.4 und Abb. 3.5). In diesem Teil des Versuches möchten wir zeigen dass sich unser mit eGFP markiertes Protein durch Bindung an PTD in der Tunica intima anreichert.

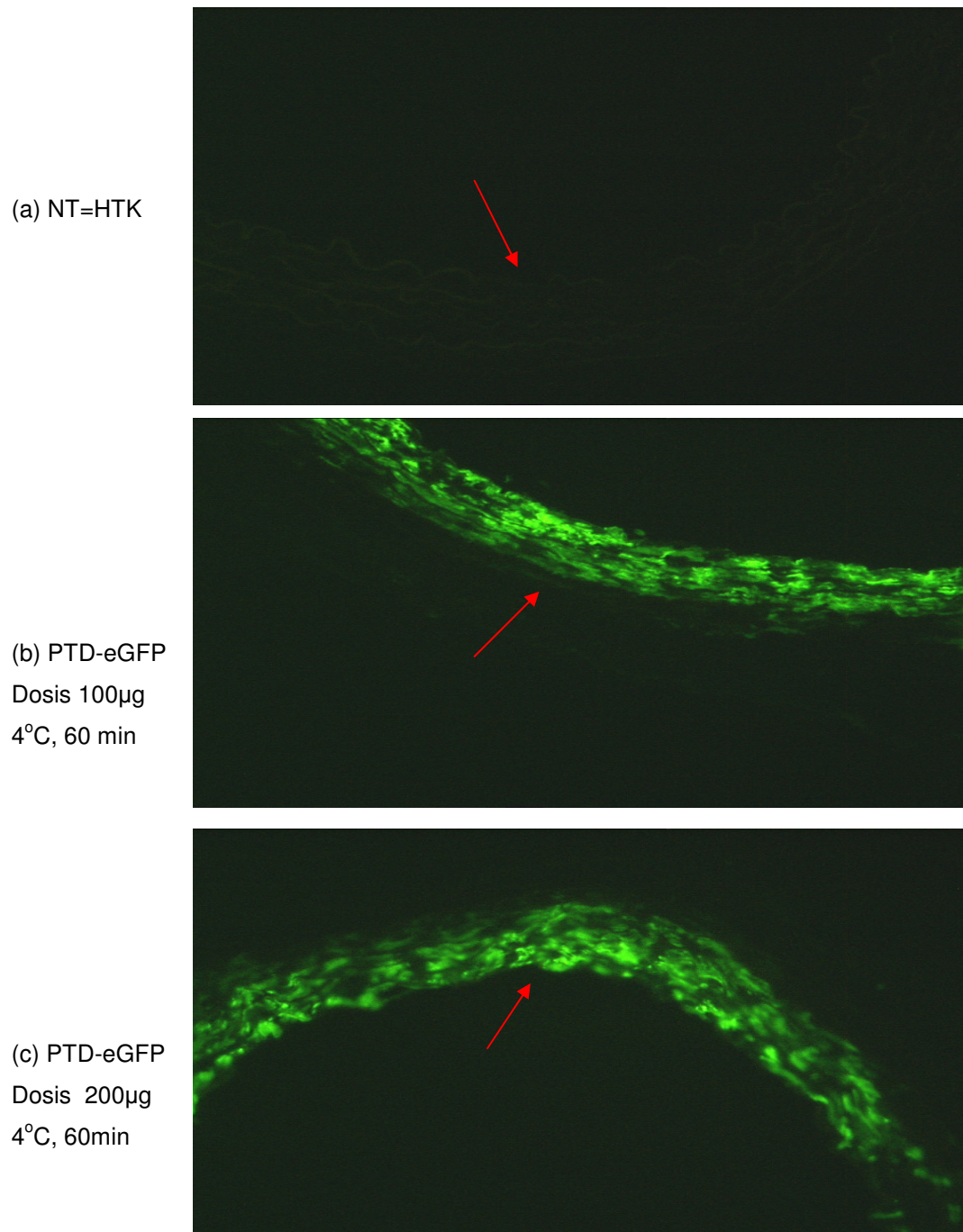


Abbildung 3.4: Dargestellt ist ein Querschnitt durch die Aorta vor und nach Transduktion von PTD-eGFP. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eGFP-exprimierender Zellen 60min nach Transduktion bei unterschiedlicher Dosierung.



(b) niedrige Dosis 100µg bei einer Temperatur von 4°C und (c) doppelte Dosis. Hier zeigt sich die Lokalisation des Proteins in der Tunica Intima (*siehe Pfeil*) der *transplantierten Aorta*. Die Fluoreszenzstärke des Proteins nach 60min ist dosisabhängig. Je höher die Dosis ist, desto stärker die Fluoreszenzkraft. Beim Bild (a) ist keine Fluoreszenz zu sehen, da keine Behandlung mit PTD-eGFP. Hier wurde die entnommene Aorta vor der Transplantation lediglich mit HTK- Lösung transfundiert.

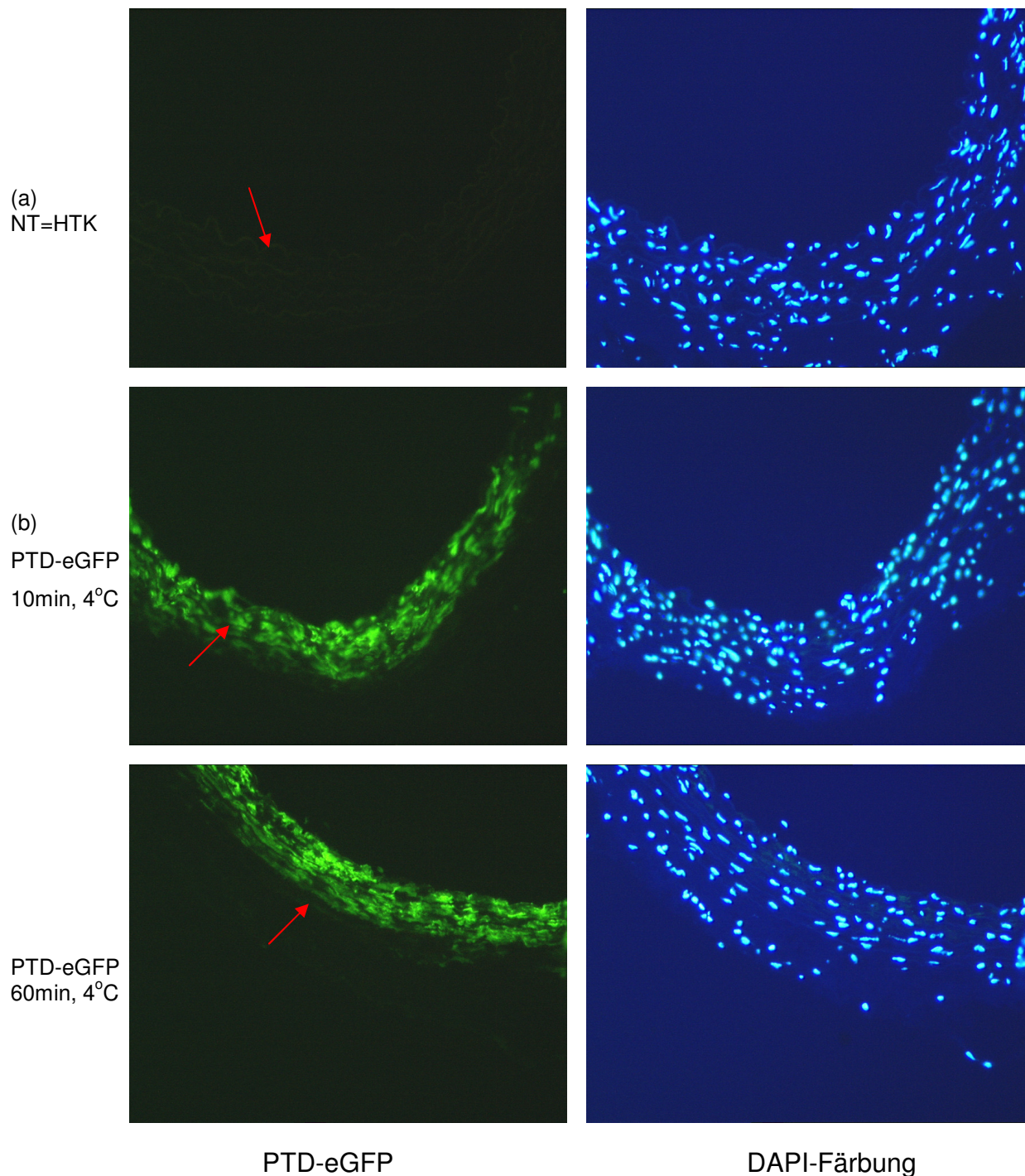


Abbildung 3.5: Querschnitt durch die Aorta nach Transduktion von PTD-eGFP (b,c). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen PTD-eGFP exprimierender Zellen unterschiedlicher Zeiten von der Transduktion bei gleicher Dosierung. (b) nach 10min. und (c) nach 60min. Es zeigt sich die Lokalisation des Proteins in der Tunica Intima (Siehe Pfeil) der transplantierten Aorta. Die Fluoreszenzstärke des Proteins ist zeitabhängig. Je später, desto schwächer die Fluoreszenzstärke. Dies zeigt sich auch bei der DAPI-Färbung. Bei der DAPI-Färbung werden nur die Kerne blau gefärbt. Beim Bild (a) mit HTK-Lösung zeigt sich keine Fluoreszenz, jedoch werden die Zellkerne mit DAPI blau gefärbt.

### 3.3 Histologischer Querschnitt durch die Aorta mit H&E und Elastinfärbung vor und nach Behandlung

Zur Untersuchung der abstoßungsbedingten morphologischen Organschäden wurden nach Paraffineinbettung der Aorta Serienschnitte angefertigt und diese anschließend mit H&E und Elastin gefärbt (Abb. 3.6 und Abb.3.7).

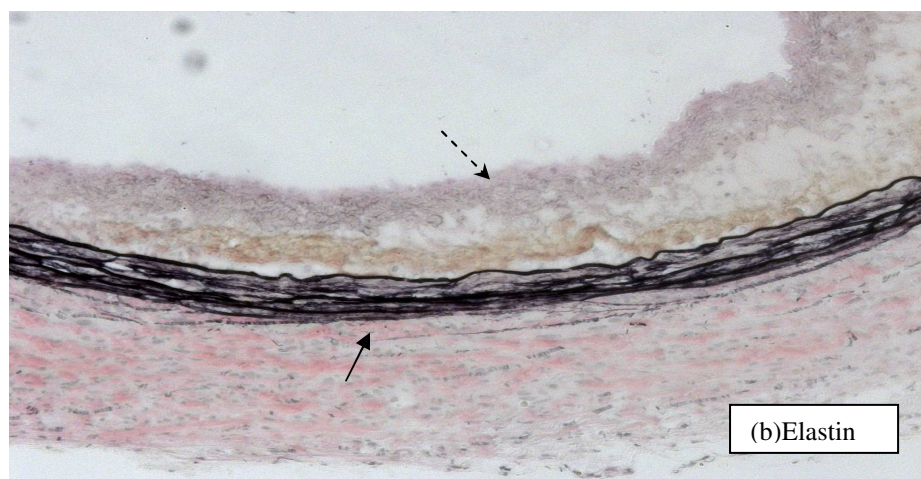
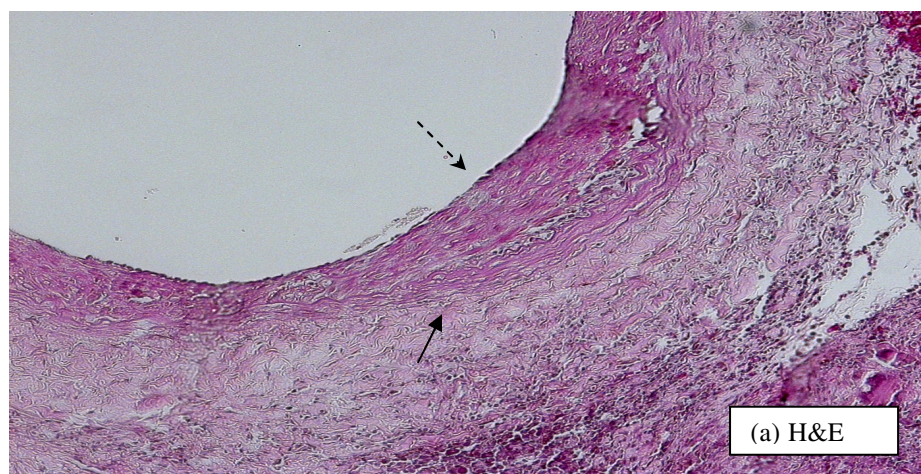
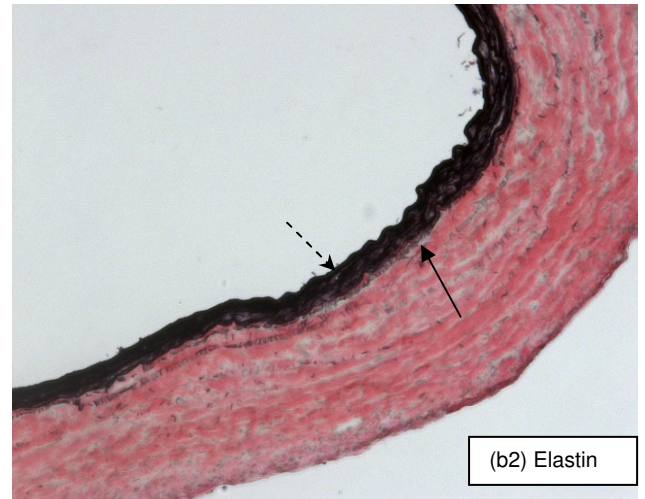
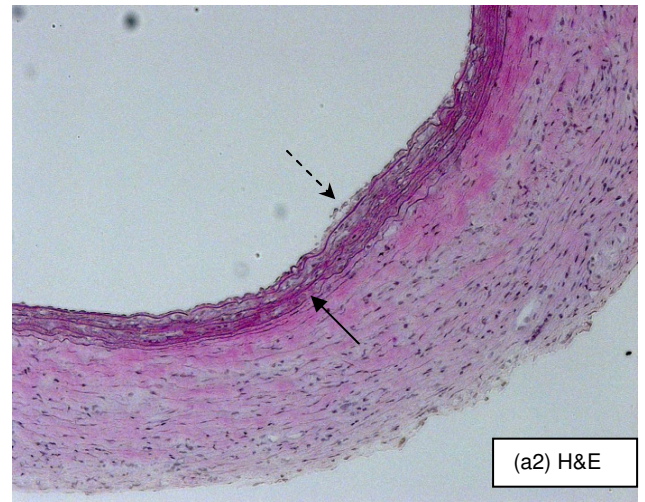
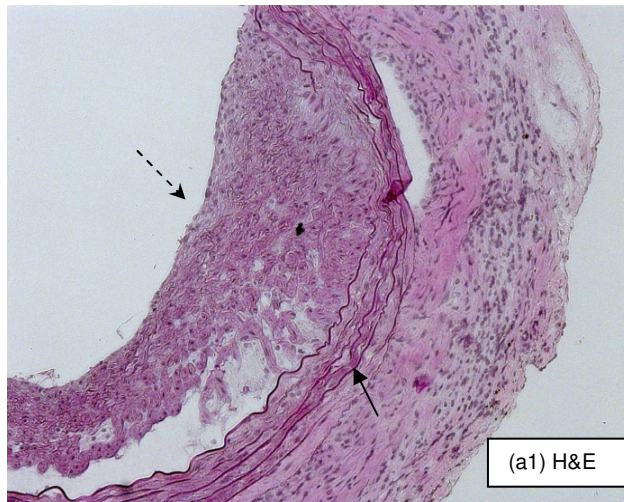




Abbildung 3.6: Querschnitt durch die Aorta (10xVergrößerung) ohne Behandlung (NT=HTK-Lösung) mit zwei verschiedenen Färbungen. (a) Färbung mit H&E, die innere Elastinschicht wird rosa gefärbt (siehe Pfeil). Oberhalb dieser Schicht ist die dunkel-rosa Endothelschicht. (b) Färbung mit Elastin, die innere Elastinschicht wird schwarz gefärbt (siehe Pfeil). Oberhalb dieser Schicht ist die Endothelschicht (gestrichelter Pfeil).



PTD-eGFP

PTD-HO-1

Abbildung 3.7: Histomorphologischer Querschnitt durch die Aorta (10-fache Vergrößerung) nach Transduktion mit PTD-eGFP und PTD-HO-1 mit zwei verschiedenen Färbungen. In den Abbildungen ist die innere wellenförmige Elastinschicht gut dargestellt (Pfeil). Oberhalb dieser ist die Endothelschicht



(gestrichelter Pfeil). Die Endothelschicht ist deutlich dicker nach Transduktion mit PTD-eGFP(a1, b1) als mit PTD-HO-1(a2, b2).

### 3.4 Histologischer Querschnitt durch die Aorta mit und ohne Behandlung mittels immunhistologischer Färbung

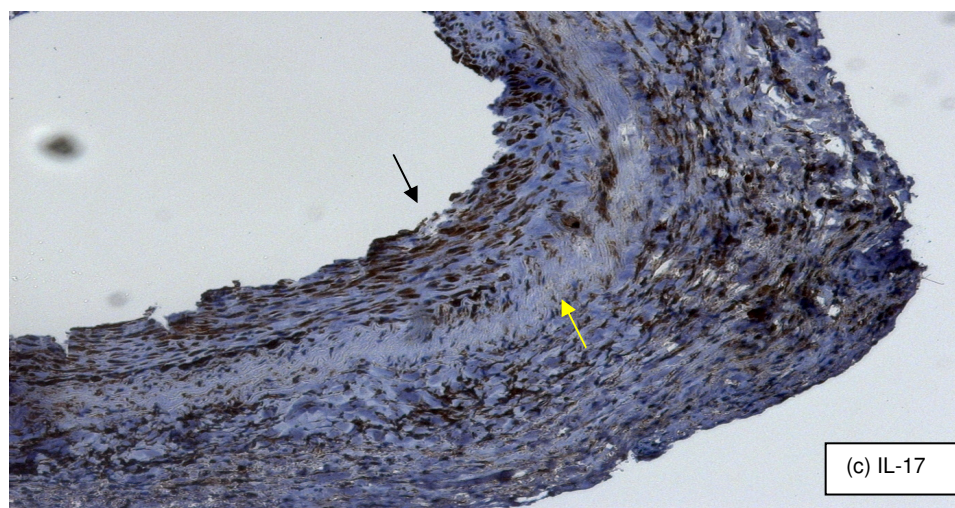
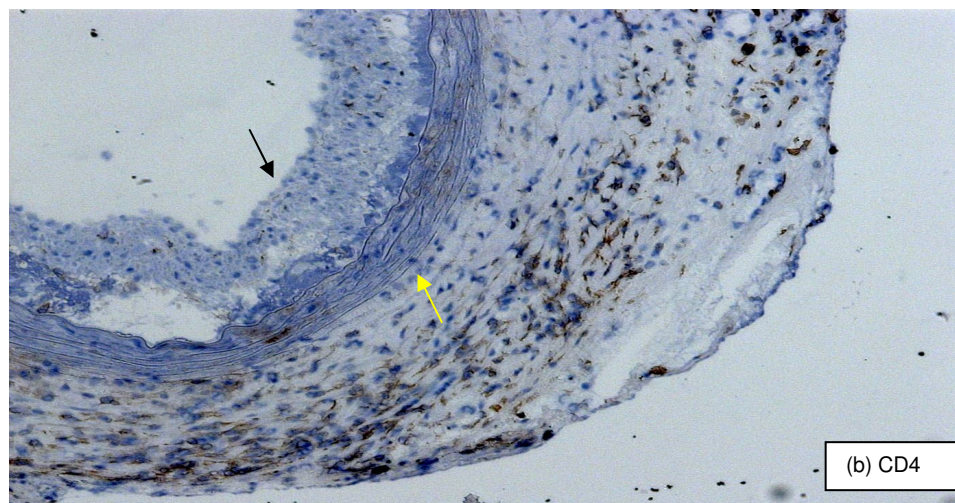
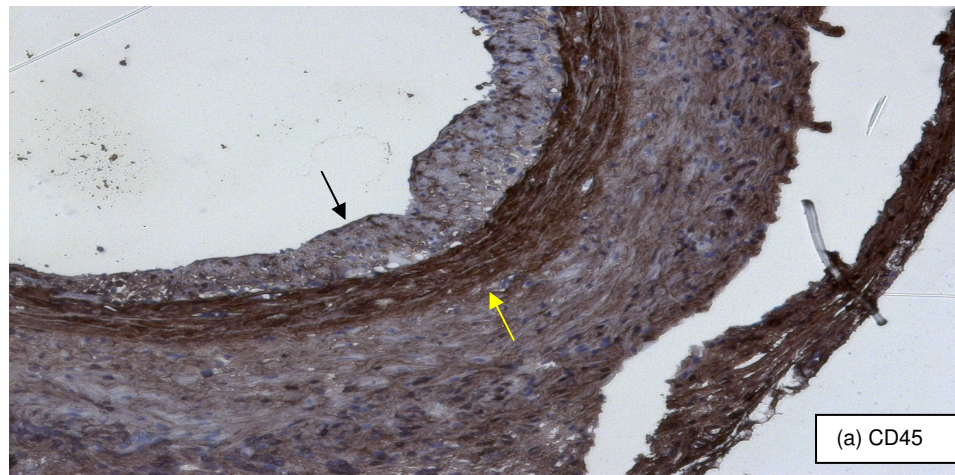
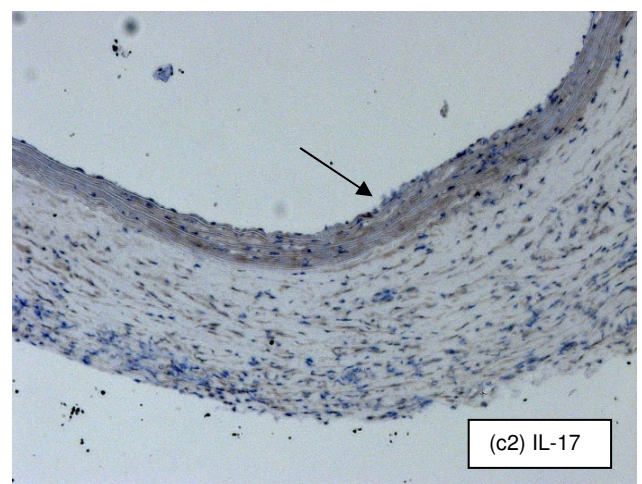
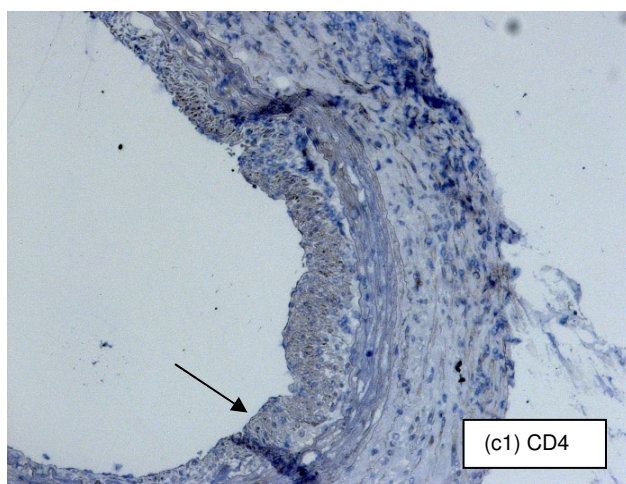
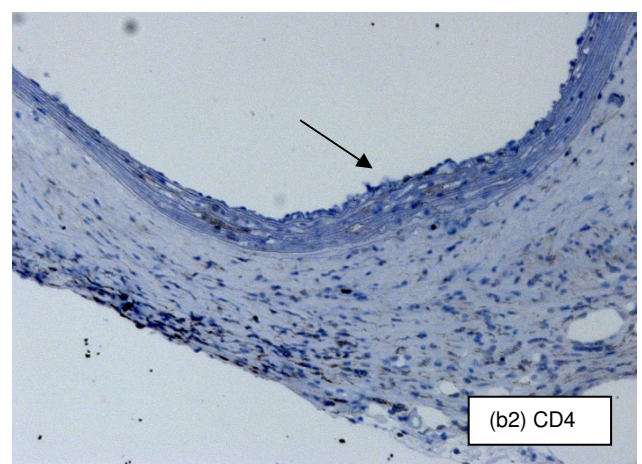
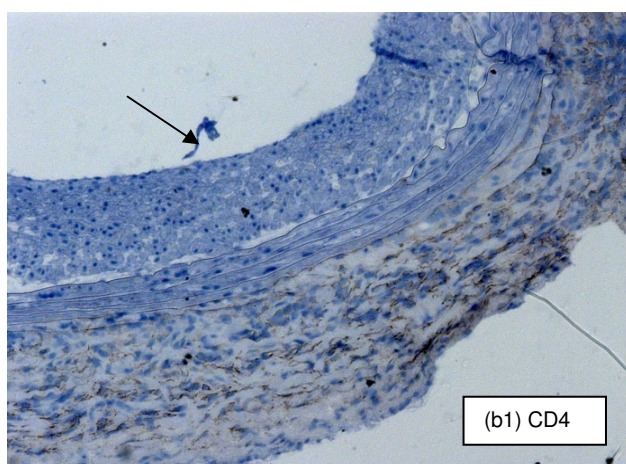
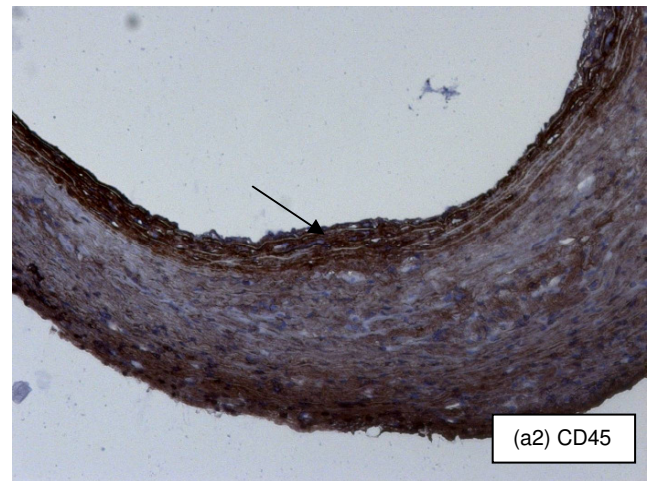
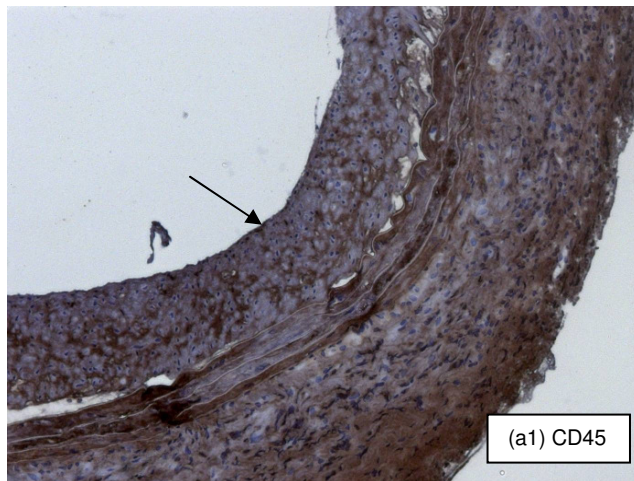




Abbildung 3.8: Querschnitt durch die Aorta (10-fache Vergrößerung) ohne Behandlung (NT=HTK) nach CD45,CD4 und IL17 Färbung. Die Endothelschicht (Pfeil) ist verdickt nach Perfusion mit HTK-Lösung. Die innere Elastinschicht ist mit gelbem Pfeil markiert.



PTD-eGFP

PTD-HO-1



Abbildung 3.9: Querschnitt durch die Aorta (10xVergrößerung) nach Behandlung mit PTD-eGFP und PTD-HO-1 nach immunohistochemischer Färbung mit CD45, CD4 und IL-17. (a1-c1) nach Transduktion mit PTD-eGFP, (a2-c2) nach Transduktion mit PTD-HO-1 . Die Intima (Pfeil) bei (a1-c1) ist circa 3mal so dick wie bei (a2-c3). Zusätzlich zeigt sich eine deutlich geringere Leukozyteinfiltration (a2, CD45 positive) mit wenigen T-Lymphozyten (b2, CD4 Positive) und TH17 (c2, IL-17 Positive). Die HO-1 Expression unterdrückt die inflammatorische, immunologische Reaktion an den Transplantaten.

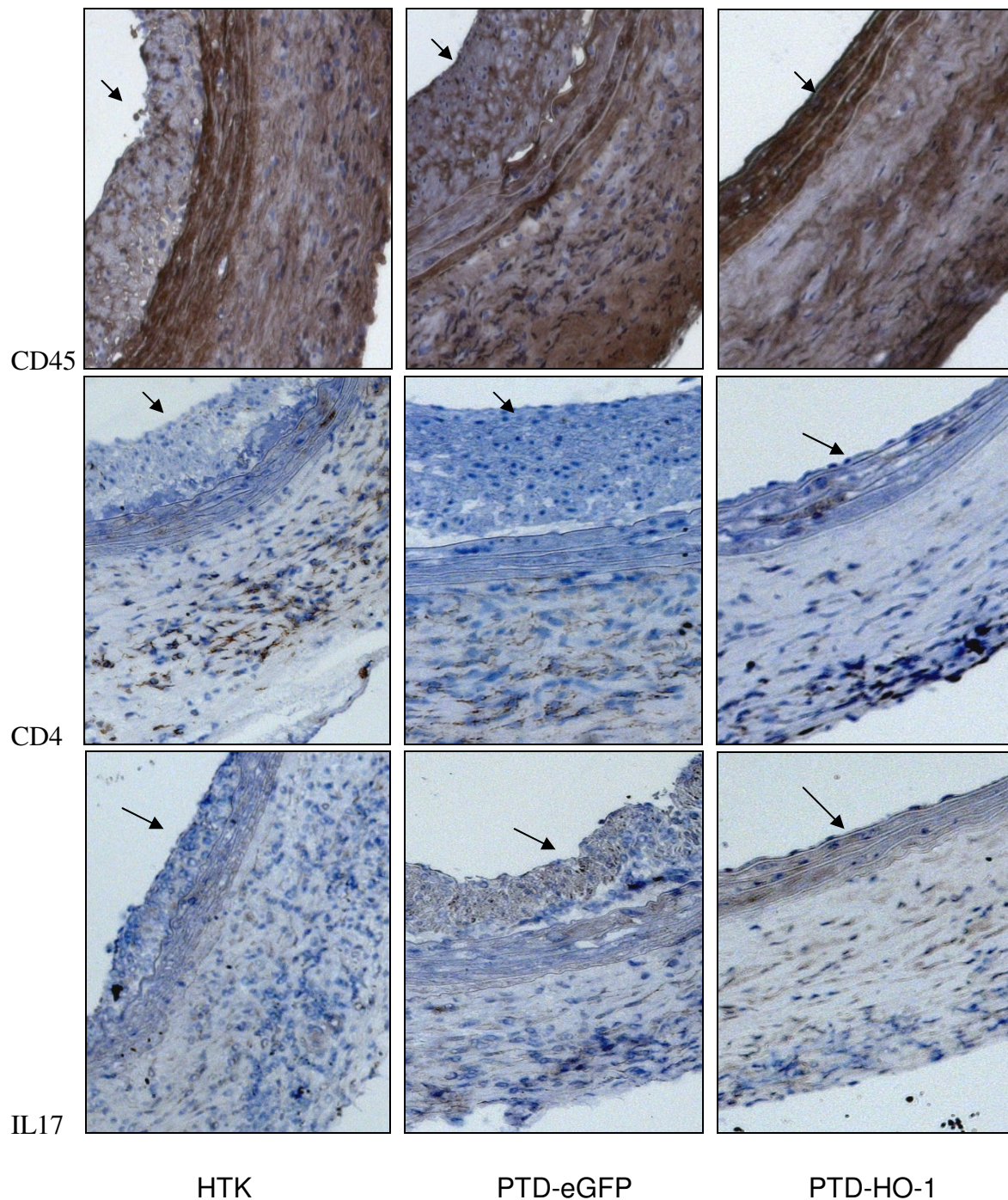


Abbildung 3.10: Zusammenfassung der Abb. 3.8 und 3.9 mit 20-facher Vergrößerung. Die Dicke der Intima nach Transduktion mit PTD-HO-1 ist signifikant dünner als nach der Transduktion mit PTD-eGFP bzw. ohne Transduktion (mit HTK-Lösung). Leukozyteninfiltration (CD45 positive zellen) T-Lymphozyten (CD4 Positive Zellen) und TH17 (IL-17 Positive Zellen).

### 3.5 Dicke der Intima mit bzw. ohne Behandlung

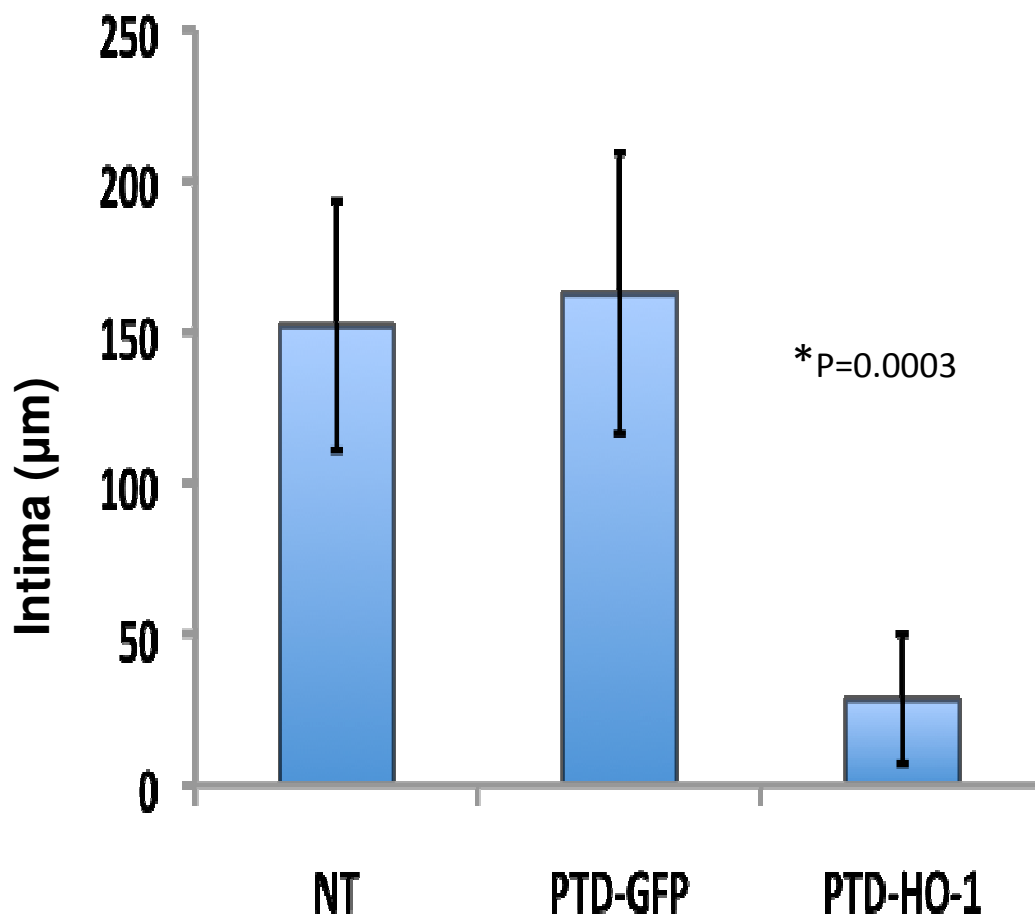


Abbildung 3.11: Dicke der Intima ohne Behandlung (NT=HTK) und mit Behandlung mit PTD-eGFP und PTD-HO-1. Die Intima nach der Behandlung mit HO-1 ist signifikant dünner als mit der Behandlung mit eGFP.

## 4 Diskussion

Nach einer Herztransplantation tritt bei 30-50 % der Patienten in den ersten Jahren nach Transplantation eine Transplantatvaskulopathie auf. Folge dieser chronischen Abstoßung ist eine diffuse Stenosierung und generelle Arteriosklerose zunächst der distalen und dann der proximalen Koronargefäße.

Die kardiale TVP ist eine lebensbedrohliche Komplikation nach Herztransplantation und stellt heute die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität dieser Patienten dar (36). Bei Vorliegen einer TVP mit Intimaverdickung ist das Risiko für eine kardiale Komplikation dabei zehnfach erhöht (37, 38). Durch progrediente Intimaproliferation der Gefäßwände nach Intimaverletzung, infolge von Ischämie-/Reperfusionsschaden, gefolgt von Intimahyperplasie und Proliferation von vaskulärer glatter Muskulatur, resultiert eine Organminderdurchblutung mit konsekutivem Transplantatversagen.

Ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen der Transplantvaskulopathie ist daher entscheidend zur Entwicklung wirksamer Therapiestrategien. Sie kann sowohl durch immunologische (mittels T- oder B-Zellen gegen Spenderantigene durch den Histokompatibilitätskomplex) als auch nicht immunologische Faktoren wie Alter, Ischämie-Reperfusionsschaden, virale Infektion, Immunsuppression und Faktoren des metabolischen Syndroms (Hypertonie, Hyperlipidämie und Insulinresistenz) verursacht werden, wobei die wesentliche Bedeutung bei der Entstehung der TVP immunologischen Ursachen zukommt.

Das Verhindern einer CMV-Infektion, das Einsetzen von Mycophenolatemofetil (41) und Proliferations-Signalinhibitoren (PSI) wie Everolimus (42) haben auch einen gewissen positiven protektiven Effekt im Hinblick auf Intimaproliferation bzw. TVP.

Trotz veränderter Immunsuppressiva und flankierender Therapie mit Lipidsenkern, ACE-Hemmern und Calcium-Kanalblockern hat sich bisher keine zufriedenstellende Reduktion der TVP gezeigt (40). Eine interventionelle oder chirurgische Therapie ist wegen der diffusen obliterativen Stenosen der proximalen und distalen Koronararterien als Therapie dabei oft nicht sinnvoll. Somit bleibt als einzige Option bei Patienten mit schwerer TVP die Re-Transplantation.

Unser untersuchtes Enzym HO-1 baut Hämoglobin zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid ab. HO-1 zeigt außerdem proangionetische, antiinflammatorische (52), antioxidative (53,54) und antiapoptische (55,56) Wirkung. Diese Wirkungen manifestieren sich in Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und anderen Zelltypen (67,71-73).

In verschiedenen Transplantationsmodellen haben zahlreiche Studien gezeigt, dass die Induktion einer HO-1-Überexpression in Transplantaten vor einer Ischämie und einem Reperfusionsschaden schützen kann (43-48). Diese Schäden führen zur Intimaverletzung und die daraufhin resultierende Immunreaktion zu einer TVP.

Induzierte Expression von HO-1 führt zu Antigen- und somit T-Zell vermitteltem Zelltod. Da T-Zellen als Teil der antikörpervermittelten Immunreaktionen überschießende Angriffe auf intakte Körperzellen verhindern, könnte durch Induktion mittels HO-1 T-Zell-Toleranz erreicht werden. Willis und Mitarbeiter haben in einem Tiermodell der Inflammation gezeigt, dass durch Induktion von HO-1 eine inflammatorische Reaktion supprimiert wird, während eine Hemmung der HO-1-Expression eine Inflammation verstärkt (62).

Ma und Mitarbeiter haben im Rattenmodell gezeigt, dass das transduzierte HO-1 Protein durch seine enzymatische Aktivität einen positiven, protektiven Effekt hinsichtlich endothelialer Aktivierung und anschließender Infiltration von Immunzellen gezeigt hat (51). In einem Mäusemodell der chronischen Abstoßung (TVP) haben Hancock und Mitarbeiter gezeigt, dass die Überexpression von HO-1 signifikant die Intimaverletzung reduziert (63). Der protektive Effekt von HO-1 kann über mehrere Wege vermittelt werden: Abbau von Häm, Hemmung des Komplementsystems durch Biliverdin, Radikalfänger durch die Bilirubineigenschaft, vasoregulatorische, antiinflammatorische, antiapoptische und antiproliferative Eigenschaften durch Kohlenmonoxid (64-69). Otterbein und Mitarbeiter haben in einem Rattenmodell gezeigt, dass Kohlenmonoxid die proliferative Reaktion der glatten Muskelzellen, die für die Neointimaproliferation beitragen, unterdrückt. Dies ist auf ein inflammatorisches Geschehen zurückzuführen (74).

Ziel unseres Experimentes war es zu zeigen, dass die Intimaprolifiration und die daraus resultierende Transplantvaskulopathie nach einer Transduktion von PTD-HO-1 im Vergleich mit der Kontrollgruppe (HTK Lösung bzw. PTD-GFP) stark reduziert werden kann.

Um diesen Effekt von HO-1 auf die Intima zu überprüfen, wurde deshalb in unserem Experiment eine Methode zum Membrantransfer mittels rekombinanter HO-1 (PTD-HO-1) entwickelt, die potenziell klinisch anwendbar und durch ihre einfache Anwendbarkeit praktikabel ist. PTD durchdrang dabei die Zellmembran problemlos, wie wir bei nur zehnminütiger Einwirkung auf eine Aortenwand gezeigt haben. Dabei wurde das Molekül PTD-GFP mikroskopisch vor allem in der Intima nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass die transduzierte HO-1 bei einer Gabe von 200µg PTD-HO-1 signifikant die endotheliale Aktivierung und anschließende Infiltration von Neutrophilen, Leukozyten und Lymphozyten reduzierte. Dies lässt sich gut mit den Ergebnissen aus früheren Untersuchungen vereinbaren, die eine antiinflammatorische Wirkung von HO-1 gezeigt haben (52, 62).

Es gibt zahlreiche Vorteile für das in dieser Studie angewandte Verfahren der Proteintransduktion, durch dessen Hilfe funktionelle Proteine in das Transplant eingeführt wurden.

Einer dieser Vorteile besteht in dem geringen Zeitaufwand dieser welche diese Proteintransduktion. Wie wir hier gezeigt haben, war PTD-eGFP bereits 10 Minuten nach Verabreichung in den Aortentransplantaten nachweisbar. Zudem ist bei dieser Methode keine Vorkonditionierung des Spenders erforderlich. Dies ist für den klinischen Einsatz von großer Bedeutung, da die Methode dadurch leichter realisierbar ist.

Zum anderen hat man mit dieser Methode eine gute Kontrolle über die Menge des Proteins, welche man in die Transplantate einführt. Die Transduktion von PTD-fusioniertem Protein ist dosisabhängig. Das Niveau der intrazellulär aktiven Proteine kann durch Proteintransduktion wesentlich leichter als durch chemische Induktion oder Gentransfer gesteuert werden.

Des Weiteren ist die Transduktion von gereinigten Proteinen eine sichere und nebenwirkungsarme Vorgehensweise, verglichen mit anderen Methoden, wie z. B. der Metalloporphyrin-Induktion (49) oder einem über einen viralen Vektor vermittelten Gentransfer (50).

## **5 Zusammenfassung und Konsequenzen aus der Studie**

Die Transplantvaskulopathie (TVP) ist eine heutzutage noch unvermeidbare Komplikation nach Herztransplantation und beeinflusst signifikant die Funktion des Organs.

Zahlreiche Studien zeigten, dass die Induktion von HO-1 Protein vor einem Ischämie-/Reperfusionsschaden schützen kann. Diese Schäden führen zu einer Intimaverletzung und einer daraufhin bedingten inflammatorischen Reaktion durch Immunzelleninfiltration. Diese immunologische Reaktion spielt die wesentliche Rolle bei der Entstehung der Intimahypertrophie, die bei der TVP typisch ist.

In dieser experimentellen Arbeit stellten wir ein Transduktionsprotein her, um zu prüfen, ob die Induktion dieses Proteins die Intimahypertrophie verhindern bzw. reduzieren kann. Hierzu erzeugten wir ein rekombinantes Hämoxxygenase-1 (HO-1)-Protein, das eine modifizierte Proteintransduktionsdomäne (PTD) enthielt. Vor der erfolgten Aortentransplantation haben wir diese mit PTD-HO-1 und PTD-eGFP und HTK-Lösung infundiert. Hierbei zeigte sich, dass eine signifikant geringere Intimahypertrophie bei den PTD-HO-1-transduzierten Aortentransplantaten nachzuweisen war im Vergleich zu der Kontrollgruppe (PTD-eGFP transduzierten Aortentransplantate und HTK-Lösung). Dies ist mit signifikant weniger endothelialer Zellaktivierung, sowie deutlich geringerer Leukozyten- und Lymphozyteninfiltration in der Intima assoziiert. Diese neuen Erkenntnisse könnten eine neue Strategie bei der Therapie der TVP darstellen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW (2002): Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation*. Oct 15;74(7):905-12.
2. Katori M, Anselmo DM, Busuttil RW et al. (2002): A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cytoprotection with heme oxygenase system. *Transpl Immunol*. May;9(2-4):227-33.
3. ISHLT (2001): The registry of the international society for heart and lung transplantation: eighteenth annual report 18.
4. McCoubrey WK, Huang TJ, Maines MD: Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 247:725-732.
5. Dulak J et al. (2008): „Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis“. *Circulation* Jan 15;117(2): S. 231-41.
6. Rose ML, Yacoub MH (1993): Immunology of heart and Lung transplantation. Edward Arnold, London.
7. Hunt SA (1993): 24 he Bthesda conference: cardiac transplantation. *JACC* 22(1):1-64.
8. Tilney NL, Whitley WD, Diamond JR et al. (1991): Chronic rejection-an undefined conundrum. *Transplantation* 52, S389, 0041-1337.
9. Hayry P, Mennander A, Yilmaz S, et al (1992): Towards understanding the pathophysiology of chronic rejection. *Clin.Investig.* 70, S780, 0941-0198.
10. Paul LC, Fellstrom B (1992): Chronic vascular rejection of the heart and the kidney- have rational treatment options emerged *Transplantation* 53, S1169, 0041-1337.



- 11.** Tullius SG, Tilney NL (1995): Both alloantigen-dependent and –independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 59, S313, 0041-1337.
- 12.** Uretsky BF, Murali S, Reddy PS et al. (1987): Development of coronary artery disease in cardiac transplant patients receiving immunosuppressive therapy with cyclosporine and prednisone. *Circulation* 76: 827-34.
- 13.** Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR et al. (1998): Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. *Cardiac Transplant Research Database. J Heart Lung Transplant* 17: 744-53.
- 14.** Hosenpud JD, Shipley GD, Wagner CR (1992): Cardiac allograft vasculopathy: current concepts, recent developments, and future directions. *J Heart Lung Transplant* 11: 9-23.
- 15.** Avery RK (2003): Cardiac-allograft vasculopathy. *N Engl J Med* 349: 829-30.
- 16.** Ventura HO, Mehra MR, Smart FW et al. (1995): Cardiac allograft vasculopathy: current concepts. *Am Heart J* 129: 791-9.
- 17.** Billingham ME (1987): Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplant Proc* 19: 19-25.
- 18.** Billingham ME (1992): Histopathology of graft coronary disease. *J Heart Lung Transplant* 11: S38- S44.
- 19.** Mehra MR, Ventura HO, Stapleton DD et al. (1995): Presence of severe intimal thickening by intravascular ultrasonography predicts cardiac events in cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 14: 632-9.

- 20.** Soleimani B, Lechler RI, Hornick PI et al. (2006): Role of alloantibodies in the pathogenesis of graft arteriosclerosis in cardiac transplantation. *Am J Transplant* 6:1781-5.
- 21.** Costanzo MR, Naftel DC, Pritzker MR et al. (1998): Heart transplant coronary artery disease detected by coronary angiography: a multiinstitutional study of preoperative donor and recipient risk factors. Cardiac Transplant Research Database. *J Heart Lung Transplant* 17: 744-53.
- 22.** Aranda JM, Jr., Hill J (2000): Cardiac transplant vasculopathy. *Chest* 118:1792-800.
- 23.** Erdmann E.(2000): Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hongkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio: Springer-Verlag.
- 24.** A. Olariu, G. Tenderich, A. Zittermann et al.(2008): De-novo Koronarsklerose bei Herztransplantierten. *Transplantationsmedizin* 20. Jahrg., S. 31.
- 25.** Petrakopoulou P, Kubrich M, Pehlivanli S et al. (2004): Cytomegalovirus infection in heart transplant recipients is associated with impaired endothelial function. *Circulation* 110: II207-II212.
- 26.** Wenke K, Meiser B, Thiery J et al. (2003): Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation* 107: 93-7.
- 27.** Wenke K, Meiser B, Thiery J et al. (1997): Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: a four-year randomized trial. *Circulation* 96: 1398-402.
- 28.** Kwak B, Mulhaupt F, Myit S, Mach F (2000): Statins as a newly recognized type of immunomodulator. *Nat Med* 6:1399-402.
- 29.** Akhlaghi F, Ashley J, Keogh A, Brown K (1999): Cyclosporine plasma unbound fraction in heart and lung transplantation recipients. *Ther Drug Monit* 21: 8-16.

- 30.** Mehra MR, Ventura HO, Smart FW et al. (1995): An intravascular ultrasound study of the influence of angiotensin-converting enzyme inhibitors and calcium entry blockers on the development of cardiac allograft vasculopathy. *Am J Cardiol* 75: 853-4.
- 31.** Zhen-Wei X, Jian-Le S, Qi Q et al. (2007): Heme oxygenase-1 improves the survival of discordant cardiac xenograft through its anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Pediatr Transplantation* 11: 850–859.
- 32.** Ma J, Lau CK, Obed A et al. (2009): A cell penetrating heme oxygenase protein protects heart graft against ischemia/reperfusion injury. *Gene Ther.* 2009 Mar;16(3):320-8.
- 33.** Tsuchihashi S, Fondevila C, Kupiec-Weglinski JW (2004): Oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Ann Transplant.* 9(1):84-7.
- 34.** Osamu Shimomura (2005): The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy.* Band 217 S. 1-15.
- 35.** Osamu Shimomura, F. H. Johnson und Y. Saiga (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. In: *Journal of Cellular and Comparative Physiology.* Band 59 S. 223-239.
- 36.** Mehra MR, Ventura HO, Stapleton DD, et al. (1995): Presence of severe intimal thickening by intravascular ultrasonography predicts cardiac events in cardiac allograft vasculopathy. *J Heart Lung Transplant* 14:632.
- 37.** Frigerio M, Carascia A, Roubina E, et al.(2006): Cardiac allograft vasculopathy: differences in de novo and maintenance heart transplant recipients. *Transplantation* 82:S5.

- 38.** Kobashigawa JA (2003): First-year intravascular ultrasound results as a surrogate marker for outcomes after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 22:711.
- 39.** Leo E, Otterbein, Miguel P, Soares, Kenichiro Yamashita et al. (2003): Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *TRENDS in Immunology* Vol.24 No.8: 449-455.
- 40.** Segovia J, Gomez-Bueno M, Alonso-Pullpon L (2006): Treatment of allograft vasculopathy in heart transplantation. *Expert Opin Pharmacother* 7:2369.
- 41.** Kaczmarek I, Ertl B, Schmauss D, et al. (2006): Preventing cardiac allograft vasculopathy: long-term beneficial effects of mycophenolate mofetil. *J Heart Lung transplant* 25:550.
- 42.** Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al (2003): Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac transplant recipients. *N Engl J Med* 349:847.
- 43.** Katori M, Buelow R, Ke B et al. (2003): Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation* 73: 287–292.
- 44.** Amersi F, Buelow R, Kato H et al. (1999): Upregulation of HO-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 104: 1631–1639.
- 45.** Yet SF, Tian R, Layne MD et al. (2001): Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res* 89:168–173.
- 46.** Blydt-Hansen TD, Katori M, Lassman C et al. (2003): Gene transfer-induced local heme oxygenase-1 overexpression protects rat kidney transplants from ischemia/reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 14: 745–754.

- 47.** Pachori AS, Melo LG, Hart ML et al. (2004): Hypoxia-regulated therapeutic gene as a preemptive treatment strategy against ischemia/reperfusion tissue injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 12282–12287.
- 48.** Martins PN, Pratschke J et al. (2002): Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplantation* 74: 591–598.
- 49.** Vreman HJ, Cipkala DA, Stevenson DK (1996): Characterization of porphyrin heme oxygenase inhibitors. *Can J physiol pharmacol* 74: 278–285.
- 50.** Cavazzana-Calvo M, Thrasher A, Mavilio F (2004): The future of gene therapy. *Nature* 427: 779–781.
- 51.** J Ma, CK Lau, A Obed et al. (2009): A cell penetrating heme oxygenase protein protects heart graft against ischemia/reperfusion injury. *Gene Therapy* 16, 320-328.
- 52.** Otterbein LE, Bach FH, Alam J et al. (2000): Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6:422–428.
- 53.** Yachie A, Niida Y, Wada T et al. (1999): Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* 103:129–135.
- 54.** Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C et al. (1994): Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2607–2610.
- 55.** Soares MP, Lin Y, Anrather J et al. (1998): Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med* 4: 1073–1077.

- 56.** Tsui TY, Siu YT, Schlitt HJ et al. (2005): Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide stimulates adenosine triphosphate generation in human hepatocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 336:898–902.
- 57.** DeBruyne LA, Magee JC, Buelow R et al. (2000): Gene transfer of immunomodulatory peptides correlates with heme oxygenase-1 induction and enhanced allograft survival. *Transplantation* 69: 120–128.
- 58.** Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M (2005): "Heme oxygenase and heme degradation". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (1): 558–67.
- 59.** Sun J, Loehr TM, Wilks A et al. (1994): Identification of histidine 25 as the heme ligand in human liver heme oxygenase. *Biochemistry* 33: 13734–13740.
- 60.** Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Sun J et al. (1996): Heme oxygenase (HO-1): His-132 stabilizes a distal water ligand and assists catalysis. *Biochemistry* 35: 930–936.
- 61.** Ford KG, Souberbielle BE, Darling D et al. (2001): Proteintransduction: an alternative to genetic intervention *Gene Therapy* 8: 1–4.
- 62.** Willis D, Moore AR, Frederick R et al. (1996): Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med* 2:87.
- 63.** Hancock WW, Buelow R, Sayegh MH et al. (1998): Antibody induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med* 4:1392.
- 64.** Brass CA, Immenschuh S, Song D-X et al. (1998): Hemopexin decreases spontaneous chemiluminescence of cold preserved liver after reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 248:574.

- 65.** Morita T, Kourembanas S (1995): Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest* 96:2676.
- 66.** Sammut I, Foresti R, Clark J et al. (1998): Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of heme oxygenase-1. *Br J Pharmacol* 125:1437.
- 67.** Brouard S, Otterbein LE, Anrath J et al. (2000): Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* 192:1015-1026
- 68.** Otterbein L, Bach F, Alam J et al. (2000): Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6:422.
- 69.** Lee T, Chau L (2002): Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med* 8:240.
- 70.** Reichart B (1987): Herz- und Herz-Lungentransplantation. Verlag R.S. Schulz.
- 71.** Lee, P.J. et al. (1996): Overexpression of heme oxygenase-1 in human pulmonary epithelial cells results in cell growth arrest and increased resistance to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93,10393–10398.
- 72.** Peyton, K.J. et al. (2002): Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide is an autocrine inhibitor of vascular smooth muscle cell growth. *Blood* 99, 4443–4448.
- 73.** Tobiasch, E. et al. (2001): Heme oxygenase-1 protects pancreatic beta cells from apoptosis caused by various stimuli. *J. Invest. Med.* 49, 566–571.
- 74.** Otterbein, L.E. et al. (2003): Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat. Med.* 9, 183–190.

- 75.** Chalfie, M.; Kain, S. (Hrsg.) (1998): Green Fluorescent Protein: Properties, Applications and Protocols, Wiley-Liss, Inc.
- 76.** Cooper DK. Christian Barnard and his contributions to heart transplantation (2001). J Heart Lung Transplant 20(6):599-610.
- 77.** Novagen. pET-28a-c(+) Vectors. Catalog p. TB074 12/98.
- 78.** Strüber M, Meyer AL, Malehsa D et al. (2009): Situation der Herztransplantation und Weiterentwicklung von Kunstherzen. Dtsch Arztebl Int 106 (28-29) : 471-7.



## 7 Danksagungen

Allen Personen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, möchte ich hiermit meinen herzlichsten Dank aussprechen. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Tung Yu Tsui für seine stets großzügige Unterstützung meiner wissenschaftlichen Tätigkeiten, für zahlreiche Anregungen, für die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen, für die Themenstellung und für die Betreuung dieser Dissertation.

Herrn PD Dr. med. Daniele Camboni bin ich zu großem Dank verpflichtet. Während meiner wissenschaftlichen Tätigkeit war er mir stets ein inspirierender, kooperativer und freundschaftlicher Ansprechpartner.

Herrn Prof. Dr. med. Christof Schmid und Prof. Dr. med. Michael Hilker danke für ihre vielen Ratschläge und ihre Unterstützung.

Höchster Dank gebührt weiterhin PD Dr. med. Stefan Hirt für ihre stetige Erreichbarkeit bei den kleinen und großen Problemen eines Doktoranden und ihre immer überaus hilfreichen Ratschläge.

Ebenso geht mein großer Dank an zahlreiche Kollegen, insbesondere Dr. med. Bernhard Flörchinger, die meinen Weg unterstützend begleiteten.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und meiner Frau, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## 8 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Abu Wasel  
Vorname: Abed El Fatah  
Anschrift: Landshuterstrasse 69a  
93053 Regensburg  
Deutschland  
Telefonnummer: 0160 6921101  
E-Mail: Abuwasel80@yahoo.de  
Familienstand: Verheiratet  
Staatsangehörigkeit: Israelisch  
Geburtsdatum: 08.05.1980  
Geburtsort: Baqa El Garbiya (Israel)

### Schulbildung:

09/1986 - 07/1992 Grundschule in Ara (Israel)  
09/1992 - 07/1995 Mittelschule in Arara (Israel)  
09/1995 - 07/1998 Gymnasium in Arara (Israel)  
09/1998 Abitur

### Studium:

02/2000 - 09/2000 Besuch eines Deutschkurses an Euro-Schulen in Würzburg(Deutschland).  
09/2000 DSH-Prüfung an der Universität Regensburg  
10/2000 - 03/2007 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg(Deutschland).

### Praktika und Berufstätigkeit :

09/2001 - 11/2003 Krankenpfleger am Uniklinikum Regensburg .  
09/2002 - 09/2003 Assistent am Pathologischen Institut  
(Abteilung Zellkultur) des Uniklinikums Regensburg.  
04/2005 - 07/2005 Assistent in der Neuroanatomie an der Universität Regensburg.

**Berufsausbildung**

10/2000	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Regensburg
03/2003	Erstes Staatsexamen
02/2006 - 01/2007	Praktisches Jahr
05/2007	Zweites Staatsexamen
Seit 08/2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt am Uniklinikum Regensburg, Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
04/2012	Erlangen der Approbation als Arzt

**Sonstige Kenntnisse und Fähigkeiten:**

EDV:	Alle Programme des Office-Pakets, Internet	
Sprachkenntnisse:	Arabisch(Muttersprache)	fließend in Wort und Schrift
	Hebräisch	fließend in Wort und Schrift
	Deutsch	fließend in Wort und Schrift
	Englisch	fließend in Wort und Schrift
	Spanisch	Grundkenntnisse
Private Interessen:	Wassersportarten und Marathon	

**Mitgliedschaften:**

Seit 2011:	Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie
------------	---

**Regensburg, März 2013**

**Abed Abu Wasel**

## 9 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der jeweiligen Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich für das Verfassen dieser Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsdiensten in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der hier vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, März 2013

---

Abed Abu Wasel