



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Gentherapie in zystischen Nierenerkrankungen**

Autor: Andrea Keppler  
Institut / Klinik: Zentrum für Medizinische Forschung  
Doktorvater: Prof. Dr. N. Gretz

Eine Gentherapie mit Smad7, zur Reduktion der fortschreitenden Fibrose und Entzündung in zystischen Nierenerkrankungen, bietet möglicherweise eine vollkommen neue Behandlungsmöglichkeit für diese bislang unheilbaren Erkrankungen. Da jedoch eine erfolgreiche Reduktion der Fibrose bislang nur in Ratten mit einer Ureterligation oder 5/6 Nephrektomie gezeigt werden konnte, sollte in dieser Arbeit die Wirkung einer Gentherapie mit Smad7 in PKD/Mhm Ratten, einem etablierten Tiermodell für ADPKD, untersucht werden. Um die Progression der Krankheit, die sich über einen langen Zeitraum erstreckt, zu beeinflussen, sollte mit Hilfe von doppelsträngigen AAV Typ2 eine Integration von Smad7 ins Genom, und somit eine stabile Expression über Monate, erreicht werden. Dafür wurde das AAV-Smad7 Konstrukt erfolgreich kloniert und produziert. Die Expression und auch Funktion des viralen Smad7 konnte 48 h nach der Infektion in LLC-PK1 Zellen nachgewiesen werden. Auch *in vivo* konnte 48 h nach der Infektion der linken Niere sowohl auf Protein- als auch auf RNA-Ebene die Expression des viralen Smad7 in beiden Nieren nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Lokalisation der viralen Expression mit Hilfe der GFP Viren 48 h nach der Infektion zeigte eine relativ gleichmäßige Verteilung der Expression innerhalb der Rinde und eine etwas schwächere streifenförmige Expression im Mark der linken Niere. Die Lokalisation der Fluoreszenz in der rechten Niere gleicht der der Linken, sie war jedoch deutlich schwächer.

Nach der 3 monatigen Gentherapie mit Smad7 konnte jedoch keine Verbesserung der Fibrose, der Inflammation und auch der Nierenfunktion festgestellt werden. Ebenso konnte auch keine Veränderung in der Entwicklung der Zysten zwischen den infizierten Tieren und den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Da eine Lokalisation der Smad7 Expression 3 Monate nach der Infektion nicht möglich war, wurde Phospho-Smad2 als Marker für die Funktion von Smad7 gefärbt. Es konnte jedoch auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Tieren und den Kontrolltieren festgestellt werden. Dieser Misserfolg der Therapie lässt sich vermutlich durch die schwache Expression von Smad7 in den Nieren erklären. 3 Monate nach der Infektion konnten nur noch maximal die 1,9 fache Expression im Vergleich zur endogenen Smad7 Expression in Kontrolltieren nachgewiesen werden. Diese schwache Expression könnte entweder durch die ineffiziente Integrationsfrequenz der AAV in der Niere der Tiere oder durch eine Integration des Smad7 Gens in transkriptionell inaktive Genorte erklärt werden. Das Absinken der Smad7 Expression auf dieses niedrige Niveau ist somit möglicherweise schon kurz nach der Infektion eingetreten.

Um die Veränderung der Nierenfunktion durch die Gentherapie mit Smad7 untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit zusätzlich 3 verschiedene Messmethoden für Plasmakreatinin in Mäusen und Ratten verglichen: die colorimetrische Messung nach Jaffé, eine enzymatische Messung sowie eine HPLC Messung. Wie bereits erwartet konnte für beide Spezies eine Überbewertung des Plasmakreatinins mit der colorimetrischen Methode festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich zwischen der enzymatischen Messung und der HPLC Messung eine gute Übereinstimmung über den gesamten Datenbereich. Da die enzymatische Messung aufgrund der fehlenden Probenvorbereitung wesentlich schneller und einfacher durchzuführen ist, stellt sie für Routinescreenings eine gute Alternative zu der HPLC Messung dar. Zusätzlich wurde der Effekt von steigenden Mengen an Hämoglobin auf die colorimetrische und enzymatische Messungen untersucht. Dabei konnte für beide Methoden speziesspezifische Interferenzen bei einer zunehmenden Hämolyse festgestellt werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass eine besondere Sorgfalt bei der Blutentnahme unverzichtbar ist, besonders da die Erythrozyten von Mäusen und Ratten sehr viel sensitiver für eine Hämolyse sind als menschliche Erythrozyten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Gentherapie mit AAV in der Niere nicht die ausreichende Expression des Transgens über den gewünschten Zeitraum erzielt werden konnte, die vermutlich für eine positive Beeinflussung der Progression der Krankheit notwendig gewesen wäre. An der antifibrotischen Wirkung von Smad7 bestehen keine Zweifel, doch solange eine erfolgreiche Expression in der Niere nur über einen sehr kurzen Zeitraum erzielt werden kann, ist eine Gentherapie mit Smad7 für zystische Nierenerkrankungen nicht geeignet.

Zusätzlich konnte durch den Vergleich der unterschiedlichen Kreatinin Messungen gezeigt werden, dass die enzymatische Methode präzise Messergebnisse liefert und somit aufgrund ihrer einfachen Handhabung im Labor im Gegensatz zur HPLC Messung die Methode der Wahl darstellt.