

Maximilian Franz

Dr. med

## **Neue Ansätze zur Therapie der Transplantatvaskulopathie an transplantierten murinen Aorten**

Fach: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. Klaus Kallenbach

Bei der terminalen Herzinsuffizienz ist die Herztransplantation die einzige kurative Therapieoption. Die Transplantatvaskulopathie ist eine der Haupttodesursachen nach Herztransplantationen. Bisher existiert keine kausale Therapie der Transplantatvaskulopathie.

Die Transplantatvaskulopathie zeichnet sich durch die Ausbildung einer Neointima aus. Glatte Muskelzellen aus der Media proliferieren und migrieren in die Intima. Dadurch entsteht eine Intimahyperplasie, die zur Gefäßstenosierung führt. Auch die Infiltration von Makrophagen trägt zur Ausbildung der Transplantatvaskulopathie bei. Der für die Zellmigration notwendige Umbau der extrazellulären Matrix wird durch Matrix-Metalloproteinasen, u.a. MMP-2, MMP-9 und MMP-12 bewerkstelligt. Im Laufe der Pathogenese der TVP wird das transplantierte Gefäß fibrotisch verändert. AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Synthese von Proteinen, die in der Pathogenese der Transplantatvaskulopathie involviert sind, initiiert. Bei dem Protein TIMP-1 handelt es sich um ein Protein dessen Funktion die Hemmung der Expression und Aktivität der MMPs ist.

In dieser Arbeit werden drei neue Ansätze zur Therapie der Transplantatvaskulopathie getestet: AP-1 hp dODN, AAV.AP-1 hp dODN und AAV.TIMP-1. AP-1 hp dODNs binden AP-1 und verhindern dessen Transkriptionsaktivität. Die Transduktion von AP-1 hp dODNs durch AAVs führt zu einer konstitutiven Expression. AAV.TIMP-1 exprimiert TIMP-1 konstitutiv, wodurch MMPs inhibiert und die Intimahyperplasie reduziert werden soll.

Für die Evaluation der Therapieeffekte wurden allogene murine Aorten heterotop transplantiert. Für die morphologische Analyse der Transplantate wurde nach HE-Färbungen die Intima-to-Media Ratio berechnet. Die Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-12 sowie des Makrophagenmarkers F4/80, des Markers für glatte Muskelzellen  $\alpha$ -SMA und des Markers für Fibrose CTGF ließ sich durch Immunfluoreszenzfärbungen analysieren. Die Migration glatter Muskelzellen bei der Ausbildung der TVP wurde anhand der  $\alpha$ -SMA-positiven Fläche in der Neointima und Media in Relation zur Gesamtfläche der Neointima bzw. Media erörtert. Der prozentuale Anteil wurde in beiden Flächen berechnet. Daraus ließ sich ein aussagekräftiger Quotient bilden. Die Aktivität der Gelatinasen, MMP-2 und MMP-9, wurde durch *in situ* Zymographie erörtert.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass nach Behandlung von allogenen murinen Aortentransplantaten mit AP-1 hp dODNs die I/M-Ratio, die Migration von glatten Muskelzellen sowie die Infiltration von Makrophagen reduziert sind. Die Infiltration von Makrophagen in der Neointima korreliert mit der I/M-Ratio. Diese Korrelation existiert allerdings nur in der AP-1 hp dODN-Gruppe, nicht aber in der Kontrollgruppe. Kein Effekt war bei der Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-12 sowie bei der Aktivität von MMP-2 und MMP-9 nach der Applikation von AP-1 hp dODN zu sehen. Der Fibrosemarker CTGF konnte durch AP-1 hp dODNs nicht reduziert werden. AAV.AP-1 hp dODN reduzieren die

I/M-Ratio ebenfalls signifikant. Die Expression von MMP-2 sowie die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 ließ sich durch die AAV.AP-1 hp dODN nicht verringern. Die Anzahl von MMP-9 positiven Zellverbänden in der Adventitia sowie die Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Neointima ließ sich reduzieren. AAV.TIMP-1 können die Transplantatvaskulopathie in allogenen murinen Aorten ebenfalls signifikant reduzieren. Die Ergebnisse der TIMP-1 Immunfluoreszenz-Färbungen beweisen zudem die erfolgreiche Transduktion von vaskulären Zellen durch die AAVs. Die vorliegende Arbeit bietet drei neue Ansätze für die Therapie der Transplantatvaskulopathie an. Die Applikation der AP-1 hp dODNs, AAV.AP-1 hp dODN oder AAV.TIMP-1 kann bereits nach der Organentnahme und vor der Transplantation in einem *ex vivo* Perfusionssystem stattfinden. Großtiermodelle und letztlich klinische Studien könnten zeigen, inwieweit sich diese Ansätze für eine Applikation am Menschen bewähren.