

Aus der chirurgischen Klinik der Charite, Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

HABILITATIONSSCHRIFT

Die Bedeutung der toxischen Sauerstoffradikale beim Ischämie/Reperfusionsschaden nach Lebertransplantation in der Ratte - protektive Therapie durch adenoviralen Gentransfer von Superoxiddismutase

Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Chirurgie

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Dr.med.

Thorsten Lehmann

aus Weingarten/Württemberg

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen und Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. P. Galle, Mainz

2. Prof. Dr. W.-O. Bechstein, Frankfurt/M.

Eingereicht beim Fakultätsrat am: 23. Februar 2004

Abstract

Einleitung: Der Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R) ist die wesentliche Ursache des frühen Transplantatversagens nach Lebertransplantation (LTx). Fettlebern sind dabei besonders betroffen. Freie Sauerstoffradikale spielen bei der Pathogenese eine zentrale Rolle. Die Morphologie der so versagenden Transplantatleber ist charakterisiert durch Entzündung, Nekrose und Apoptose. Endogene Radikalfänger wie die Superoxiddismutase (SOD), nicht aber exogen zugeführte, bauen freie Radikale ab. Das Ziel der vorgelegten Studien war es, im Modell der LTx von gesunden und verfetteten Lebern in der Ratte mittels adenoviralem Gentransfer von SOD den I/R zu vermindern, die Überlebensrate zu erhöhen und zugrunde liegende Mechanismen aufzuzeigen. *Methoden:* Bei Experimenten mit verfetteten Lebern wurde eine ausgeprägte Steatose der Spenderlebern durch Füttern einer Ethanol- und fettreichen Diät (Lieber-DiCarli) erzeugt. Explantierte Lebern wurden für 24 h konserviert und orthotop transplantiert. Einigen Spendern wurde 72 h vor Organentnahme Cu/Zn-SOD enthaltendes Adenovirus (Ad.SOD1) i.v. appliziert. Als Kontrollen dienten Fettlebern, welche mit dem Gen von β -Galaktosidase (Ad.lacZ) transfiziert wurden, oder aber gesunde Lebern. Untersuchungsparameter waren neben Transfektionsparametern die Transaminasen, histopathologische Morphologie, Überlebensraten, sowie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und deren Kinasen. Freie Radikale wurden in der Galle mittels Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie nachgewiesen. In weiteren Experimenten wurden auch die mitochondriale und die extrazelluläre Isoform hinsichtlich ihrer protektiven Wirkung untersucht. Ebenso wurde die Auswirkung der freien Radikale auf die Regeneration nach Teillebertransplantation untersucht. *Ergebnisse:* 72 h nach Injektion von Ad.lacZ exprimierten etwa 80% aller Hepatozyten die β -Galaktosidase. In der Ad.SOD1 Gruppe war die Genexpression 3-fach, die Aktivität 12-fach erhöht. Im Vergleich zu den unbehandelten oder Ad.lacZ infizierten Empfängern von Fettlebern, stiegen die Transaminasen um etwa 50% bei der Ad.SOD1 Gruppe an. Alle Empfänger von Ad-SOD1 behandelten Fettlebern überlebten, hingegen nur 10% der Ad.lacZ Gruppe. Etwa 35% der Hepatozyten von Fettlebern waren nekrotisch, jedoch nur 10% in Ad.SOD1-behandelten Fettlebern. Ad.SOD1 halbierte die Freisetzung von freien Radikalen und minimierte die Aktivierung von NF- κ B. Die Aktivität der Kinase IKK wurde nicht reduziert, der Anstieg der Aktivität von JNK jedoch komplett inhibiert. Die Freisetzung von TNF α wurde nicht beeinflusst. Als wirksamste Isoform hat sich die zytosolische erwiesen, die extrazelluläre ist nach Überexpression ohne protektive Wirkung. Die Leberregeneration läßt sich nach Transplantation durch SOD-

Überexpression massiv anregen und das Organversagen bei kritischer Leberzellmasse vermeiden. *Schlußfolgerung:* Diese Studie zeigt erstmals die Wirksamkeit einer neuen Strategie zur Organprotektion für gesunde Lebern und Fettlebern. Die Eliminierung von Sauerstoffradikalen spielt bei der Pathogenese eine Schlüsselrolle. Der adenoviraler Gentransfer von SOD stellt ein gangbares therapeutisches Verfahren für die Zukunft dar, um auch marginale, verfettete Organe vor reperfusionsbedingtem Versagen zu schützen. Dabei ist die zytosolische SOD am effektivsten. Auch bei der Teilleber-Transplantation ist diese Therapieform erfolgversprechend.

Schlagworte:

Lebertransplantation, Ischämie/Reperfusionsschaden, Gentransfer, Superoxiddismutase

Abstract

Background: Oxygen-derived free radicals play a central role in pathomechanisms of reperfusion injury after organ transplantation, and fatty livers are particularly susceptible. Endogenous radical scavenger systems such as superoxide dismutase (SOD) degrade toxic radicals; however, SOD is degraded rapidly when given exogenously. Therefore, the hypothesis that treatment of the donor liver with an adenoviral vector encoding the Cu/Zn-SOD gene (Ad.SOD1), or the Mn-SOD gene or the ec-SOD gene would lead to permanent gene expression and therefore protect the organ against injury and increase survival in a rat model of liver transplantation including fatty livers was tested. Transplantation of reduced-size livers may lead to a hypermetabolic state and increased production of oxygen radicals. Since oxygen radicals may cause liver injury and impair liver regeneration, we tested the hypothesis that overexpression of superoxide dismutase (SOD) in reduced-size livers (RSL) would accelerate regeneration and reduce injury in a rat model of transplantation of RSL.

Methods: Donors received chow diet (untreated), high-fat diet, or ethanol-containing high-fat diet. Some donors were infected with Ad-SOD1, while untreated grafts and livers infected with the indicator gene *lacZ* encoding bacterial β -galactosidase (Ad.*lacZ*) served as controls. Some livers were harvested 72 hours later, reduced to 45% of weight, and transplanted. After liver transplantation, SOD activity and protein expression in liver, survival, histopathology, release of transaminases, free radical adducts in bile and activation of NF- κ B, I κ B kinase (IKK), Jun-N-terminal kinase (JNK) and TNF α were evaluated. Moreover, in transplanted split-livers regeneration was evaluated by Brdu-staining, and measurement of cyclinD1 and p21.

Results: Approximately 80% of hepatocytes expressed β -galactosidase 72h after injection of Ad-*lacZ*. Moreover, SOD1 gene expression and activity were increased 3- and 10-fold in the Ad-SOD1 group, respectively. Following transplantation, 20-25% of rats treated with Ad.*lacZ* survived. In contrast, all SOD1-treated animals survived. Transaminases measured 8h after transplantation in Ad-SOD1 rats were only 40% of those in controls which increased 40-fold above normal values. Approximately 20% of hepatocytes in untreated and Ad.*lacZ*-infected organs were necrotic 8h after reperfusion, whereas necrosis was nearly undetectable in grafts from rats treated with Ad.SOD1. Free radical adducts were increased 2-fold in the ethanol group compared to untreated controls. Ad.SOD1 blunted this increase and reduced the activation of NF- κ B, which was similar in untreated and ethanol-treated groups. Ad.SOD1 did not affect activity of IKK, but JNK activity was blunted. Release of TNF α was not affected. In recipients of Ad.SOD1-RSL survival was dramatically increased (100% vs.

20% in Ad.lacZ-RSL), and peak levels of AST/ALT and bilirubin levels were reduced by 75% and 87.5%, respectively ($p < 0,001$). In histological sections, hepatocyte necrosis decreased from 24% after Ad.lacZ-treatment to 6% after Ad.SOD1-treatment ($p < 0,001$). Regeneration was also accelerated after Ad.SOD1-treatment as demonstrated by an increase of BrdU-stained cells 24 hours after reperfusion and increased liver weight after 1 week. *Conclusions:* This study provides clear evidence for the first time that gene therapy with Ad.SOD1 increases survival and decreases hepatic injury after liver transplantation and protects marginal livers from failure after transplantation and may be related to lowered NF- κ B and JNK activity due to reduced oxygen radical production. Genetic modification of the liver represents a future approach to protect organs against injury where oxygen derived free radicals are involved. Moreover, overexpression of SOD1 in RSL prevents primary non-function of reduced-size liver grafts and accelerates liver regeneration.

Keywords:

liver transplantation, ischemia/reperfusion injury, genetransfer, superoxide dismutase

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	9
1.1 Die klinische Lebertransplantation – aktueller Stand	9
1.2 Die Pathophysiologie des Ischämie/Reperfusionsschadens nach Organischämie ...	12
1.3 Aktuelle Therapieansätze zur Vermeidung des I/R-Schadens:	18
1.4 Fragestellung	29
2 Materialien und Methoden	32
2.1 Adenovirale Vektoren	32
2.2 Tiere und Tierhaltung.....	33
2.3 Die Technik der orthotopen Lebertransplantation in der Ratte.....	35
2.4 Das Überleben - Definition	38
2.5 Lebergewicht bei Regenerationsversuchen.....	38
2.6 Bestimmung der Aktivität von β -Galaktosidase und Superoxiddismutase.....	39
2.7 Western Blot von Superoxiddismutase	40
2.8 Immunopräzipitation bzw Western Blot Analyse von p21 & CyclinD1	40
2.9 Histologische Untersuchungen.....	41
2.10 Klinische Chemie	44
2.11 Electrophoretic Mobility Shift Assay für NF- κ B.....	44
2.12 Kinase Assays	45
2.13 Ribonuklease Protection Assay für TNF α	47
2.14 Reverse Transkriptions-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)	47
2.15 Identifikation und Quantifizierung der freien Radikale mittels Elektronenresonanzspektroskopie.....	48
2.16 Statistik.....	50
3 Ergebnisse	51

3.1	Vorarbeiten zur Bestätigung des Konzeptes des adenoviralen Gentransfers und der Dosisfindung beim Spender	51
3.2	Bestätigung des Konzeptes bei der Lebertransplantation in der Ratte.....	55
3.3	Mechanismen der protektiven Wirkung der SOD-Überexpression – Erweiterung des Spenderpools?	65
3.4	Welche der drei verschiedenen Isoformen der Superoxiddismutase ist am effektivsten in der Protektion des Ischämie/Reperfusionsschadens?.....	79
3.5	Welchen Einfluß haben die Sauerstoffradikale auf das Schadensausmaß und das Regenerationsverhalten einer transplantierten Teilleber – protektive Therapie durch Ad.SOD1 ?	95
4	Diskussion.....	109
4.1	Leberdysfunktion und Ischämie/Reperfusionsschaden.....	109
4.2	Adenovirale Gene werden erfolgreich in die Leber importiert.....	111
4.3	Die Verwendung der zytosolischen Isoform der SOD.....	112
4.4	Der protektive Effekt von SOD auf Leberschädigung und Überleben nach LTx..	113
4.5	Das Problem der marginalen, verfetteten Lebern als Spenderorgane	114
4.6	Die Rolle der Sauerstoffradikale und der Einfluß auf Transkriptionsfaktoren	115
4.7	Das protektive Potential der drei SOD-Isoformen	118
4.8	TNF α Aktivität.....	121
4.9	Protektion von Split-Lebern durch Gentransfer von SOD.....	121
4.10	Klinische Relevanz der dargestellten Versuche.....	127
5	Literaturverzeichnis.....	129
	Abkürzungsverzeichnis	152
	Danksagung.....	153
	Eidesstattliche Versicherung.....	156

1 Einleitung

1.1 Die klinische Lebertransplantation – aktueller Stand

Die orthotope Lebertransplantation (LTx) ist mittlerweile ein etabliertes Therapieverfahren zur Behandlung von im Endstadium befindlichen oder weit fortgeschrittenen, irreversiblen Lebererkrankungen [1]. Bei den zugrunde liegenden Erkrankungen handelt es sich im Einzelnen um fortgeschrittene Leberzirrhosen bei Virushepatitiden, nutritiv-toxisch induzierter (Alkohol-induzierte) Leberzirrhose, primär biliärer Zirrhose, wie auch sekundär sklerosierender Cholangitis, Budd-Chiari-Syndrom, sowie bei primären Lebertumoren in frühem Stadium [1, 2]. Weiterhin kommen als Indikation das akute Leberversagen (Toxine, Medikamente oder viral bedingt) und angeborene Stoffwechsel- (z.B. M. Wilson) und Lebererkrankungen (z.B. Zystenleber) bzw. Agenesie von Gallengängen teilweise insbesondere im kindlichen Alter in Betracht.

Die aktuellen Ergebnisse der Lebertransplantation sind angesichts der Schwere des Ausgangszustandes hervorragend: Die 1-Jahresüberlebensrate liegt bei deutlich über 80%, die 5-Jahresüberlebensrate beträgt über 70%, wobei die Ausgangssituation ein wesentliches Kriterium hierfür darstellt. Die aktuellen Daten aus der Chirurgischen Klinik des Virchow-Klinikums Berlin zeigen noch höhere Überlebensraten auf (siehe Grafik auf der nächsten Seite) und unterstreichen diese äußerst erfolgreiche Therapie der Leberzirrhose bzw. der oben angegebenen Erkrankungen [3, 4, 5, 6].

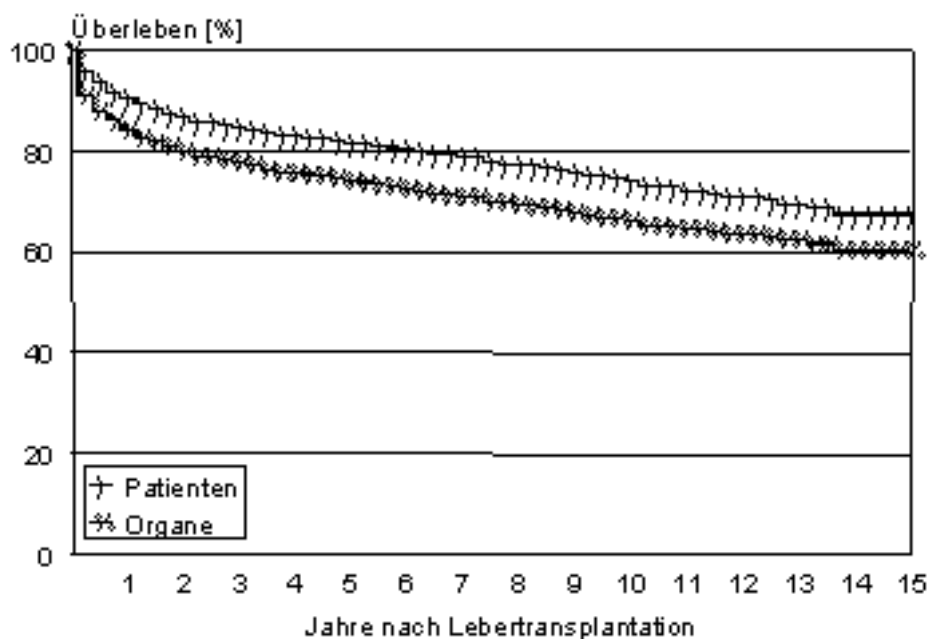


Abb. 1: Die Überlebensdaten für alle Empfänger und Organe aller durchgeführten Lebertransplantationen der Chirurgischen Klinik der Charité Campus Virchow Klinikum 1/1989 – 12/2003.

Diese Überlebensraten waren nicht von Anfang an so hervorragend. Die erste klinische Lebertransplantation wurde am 1. März 1963 in Denver, CO, USA, von Thomas E. Starzl durchgeführt. Innerhalb der ersten Phase der klinischen Entwicklung der Transplantationsmedizin von etwa 15 Jahren betrug die 1-Jahres-Überlebenszeit nur 30% [7]. In den folgenden 15 Jahren konnte jedoch die Überlebensrate dramatisch gesteigert werden, was auf verschiedenen Säulen begründet ist: Zum einen ist die Entwicklung von neuen immunsuppressiven Substanzen zu nennen, insbesondere stellt die klinische Anwendung von Cyclosporin A und Tacrolimus einen Meilenstein in der Transplantationsmedizin dar. Zum anderen wurden optimierte Substanzen zur Organkonservierung entwickelt [8, 9] und das perioperative Management wurde optimiert [10]. Prinzipiell kann die Lebertransplantation heute als ein standardisiertes Routineverfahren gelten, welches schwerstkranken Patienten eine sehr hohe Chance zu einem Weiterleben mit hoher Lebensqualität bietet. Eine sinnvolle Alternative zu diesem Eingriff existiert derzeit nicht.

Trotz aller Erfolge in der Transplantationsmedizin in den vergangenen 40 Jahren bestehen weiterhin Schwierigkeiten, welche Morbidität bzw. Mortalität für die Empfänger bedeuten können:

Die aktuelle Situation der klinischen Lebertransplantation weltweit wird von dem Dauerproblem des Organmangels [11] geprägt. Patienten versterben auf der Warteliste bevor ein geeignetes Spenderorgan zur Verfügung steht [12]. Dies hat dazu geführt, dass auch marginale („schlechte“) Organe transplantiert werden müssen, welche sich in erster Linie durch Verfettung oder auch Zirrhose auszeichnen, die wiederum überwiegend durch chronischen Alkoholkonsum hervorgerufen wird [13]. Diese verfetteten Spenderlebern stellen eine der Hauptursachen für das frühe Transplantatversagen dar [14, 15] etwa ein Drittel der möglichen Spenderorgane [16, 17] sind verfettet. Etwa ein Fünftel der möglichen, angebotenen Organe werden derzeit hauptsächlich wegen Verfettung abgelehnt [18, 19].

Der Organmangel verbunden mit dem Tod auf der Warteliste erfordert neue chirurgische Konzepte: Eine neue Entwicklung der vergangenen 15 Jahre stellt die Teilung der Organe (*split liver transplantation*) dar [20, 21]. Dabei wird in aller Regel ein größerer rechter Leberlappen einem erwachsenen Empfänger und ein kleiner linker Leberlappen einem Kind implantiert. Eine weitere neue Entwicklung, quasi eine Weiterentwicklung der *split livers*, stellt die *living related donor liver transplantation* (Leberlebendspende-Lebertransplantation) dar [22, 23]. Dabei wird vor allem für die pädiatrischen, aber auch zunehmend für erwachsene Empfänger dem meist verwandten Organspender (in der Regel ist es ein Elternteil) ein Teil seiner Leber entfernt. Es handelt sich in der Regel um den linken Leberlappen bzw. Segment 2/3 bei Kindern als Empfänger und um den rechten Leberlappen bei erwachsenen Empfängern [24, 25]. Diese Technik hat vor allem in den Ländern Verbreitung gefunden, in denen die Organentnahme bei hirntoten Spendern aus religiösen Gründen problematisch ist (z.B. Japan), sie wird aber auch in zunehmender Weise in Europa und den USA durchgeführt

[26]. Auch diese Organempfänger und auch Spender (!) unterliegen einer signifikanten Morbidität und Mortalität, da das verbleibende Lebergewicht grenzwertig klein ist und zusätzliche Störungen wie zum Beispiel Reperfusionsschäden zum Organversagen führen können [27]. Weiterhin gelten Komplikationen beim Empfänger wie insbesondere Thrombosen der arteriellen Gefäßversorgung oder aber Leckagen der Gallenganganastomosen wie auch Galleleckagen aus der Resektionsfläche der Leber als nicht selten und führen zu Morbidität oder sogar Organverlust. Gerade das Risiko für den gesunden Organspender führt in der medizinischen Öffentlichkeit und den Fachverbänden zu intensiven Diskussionen hinsichtlich der ethischen Aspekte dieses Verfahrens [26, 28, 29, 30, 31, 32].

1.2 Die Pathophysiologie des Ischämie/Reperfusionsschadens nach Organischämie

1.2.1 Faktoren des primären Organversagens:

Eine objektive und verlässliche Risikoabschätzung für ein Transplantatversagen ist derzeit nicht möglich [15, 18, 19, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39]. Die Angaben über die Häufigkeit von primären Transplantatversagen (PNF = primary nonfunction) nach LTx sind in der Literatur nicht einheitlich (2-23%), jedoch ist die Folge dessen in Form von Retransplantation oder aber Tod des Empfängers eindeutig charakterisiert [40, 41]. Dies erläutert die Notwendigkeit nicht nur besserer Evaluationsmöglichkeiten sondern insbesondere von Protektionsverfahren der Spenderorgane.

Bei dem primären Transplantatversagen nach Lebertransplantation handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem der Summation der schädigenden Einflüsse während der Spenderleberentnahme, Konservierung und Organreperfusion eine wesentliche Bedeutung zukommt. Die Ausprägung dieses Schadens ist abhängig von der kalten und warmen Ischämiezeit, der Konservierungs- und Reperfusionsart, welche hinsichtlich geeigneter

Konservierungslösungen standardisiert ist, jedoch Ausspüllösung und Reperfusionstyp eine große Variationsbreite zeigen. Es besteht eine enge Korrelation des Reperfusionsschadens zu vorbestehender Schädigung, besonders bei Verfettung des Spenderorgans [34, 42, 43]. Technische Probleme, welche zum frühen Transplantatversagen führen können, sind insbesondere Gefäßverschlüsse, wie die Thrombose der Arteria hepatica.

1.2.2 Das multifaktorielle Geschehen Ischämie/Reperfusionsschaden:

Alle zu transplantierenden Organe müssen vom Zeitpunkt der Organentnahme bis zur Implantation konserviert werden. Im Rahmen der ersten Transplantationsversuche wurden die Organe gekühlt, was in den 50er Jahren praktiziert wurde. Daran schloß sich eine lange Phase der Experimente mit Konservierungslösungen an, bis schließlich Mitte der 80er Jahre die heute weit verbreitete *University of Wisconsin* Konservierungslösung in den klinischen Alltag mit großem Erfolg eingeführt wurde [8, 9]. Nur wenige andere Lösungen haben auch Eingang in die klinische Anwendung gefunden (HTK-Bretschneider-Lösung, Eurocollins- und Celsior-Lösung) [44, 45], die UW-Lösung dominiert bei der Anwendung für die Lebertransplantation. Der weltweite Organmangel und die daraus entstandene Notwendigkeit jedes mögliche Organ auch zu implantieren führt zu dem zentralen Interesse und Forschungsschwerpunkt höchster Priorität, Strategien zur Minimierung der negativen Auswirkungen der Organischämie in klinischen und experimentellen Studien weiter zu entwickeln. Zunächst sollte man 3 verschiedene Formen der Organischämie, die kalte, die warme und die der Wiedererwärmung unterscheiden. Die kalte Ischämie entsteht bewußt im Rahmen der Organtransplantation, um die metabolischen Prozesse zu minimieren. Die warme Ischämie entsteht im Rahmen von Trauma, Schock, Leberchirurgie (Pringle Manöver) und Transplantation. Die Phase der Ischämie unter Wiedererwärmung von kalt nach warm entsteht im Rahmen der Manipulation am Organ (zum Beispiel ex situ split Leberpräparation) und in der Phase der Implantation vor Freigabe der Blutgefäße. In dieser Arbeit liegt der Focus auf den Bedingungen der

Lebertransplantation und somit der kalten Ischämie und der Phase der Wiedererwärmung. Die Schädigung der Hepatozyten tritt vor allem dann auf, wenn der Blutfluß mit der Sauerstoffversorgung wieder freigegeben wird. Nach kalter und warmer Ischämie und anschließender Reperfusion der Leber werden vor allem Sinusendothelzellen (SEC) irreversibel geschädigt [46, 47]. SEC spalten sich von der Gefäßwand ab, verändern ihr Zytoplasma, das Zytoskelet, die extrazelluläre Matrix und prolabieren in das sinusoidale Lumen [46],[48]. Somit wird das Endothel in seiner Integrität zerstört mit der Folge, dass Leukozyten und Blutplättchen adhärieren können und somit zu Mikrozirkulationsstörungen führen [49, 50, 51]. Dabei korreliert die Länge der kalten Ischämie mit dem Ausmaß des Flurschadens bei den Endothelien [52]. Die Adhäsion der Blutplättchen an SEC induziert die Apoptose dieser im Rahmen der Reperfusion nach kalter Ischämie, wobei der Sauerstoffradikalformation eine wesentliche Bedeutung zukommt [53, 54].

Die Parenchymzellen der Leber hingegen erscheinen gegenüber Reperfusionsschäden weitgehend gut geschützt zu sein [48, 55, 56], sie werden vor allem erst sekundär durch Mangelversorgung und den Einfluß von Entzündungsmediatoren sowie infiltrierende Leukozyten geschädigt. Diese Aussage trifft für die kalte Ischämie zu. Eine wichtige Rolle zu Beginn der Pathomechanismen des Reperfusionsschadens kommt der Bildung von freien Sauerstoffradikalen zu [57, 58, 59, 60]. Freie Radikale sind in der Lage, mit den meisten biochemischen Komponenten der Zelle zu reagieren. Ein Hauptangriffspunkt liegt in der Reaktion mit Lipidkomponenten der Zellmembran, es kommt zu einer Schädigung mit erhöhter Permeabilität, bis hin zur Lyse der Zellen [61]. Aktivierte Kupfferzellen stellen initial nach Reperfusion eine Hauptquelle für toxische Sauerstoffradikale dar, deren Freisetzung wiederum weitere Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel TNF α und IL-1 stimuliert [62]. Bereits wenige Minuten nach Reperfusion können pathologisch erhöhte Konzentrationen an Sauerstoffradikalen im zirkulierenden Blut nachgewiesen werden. Radikale entstehen im Zytochrom-P450-Metabolismus und beim Abbau von Hypoxanthin zu

Xanthin im Purinstoffwechsel [63, 64]. Erst in einer späteren Phase, mehrere Stunden nach Reperfusion, kommt es zur Freisetzung von toxischen O₂-Radikalen aus Leukozyten. Aber auch aktivierte Endothelzellen setzen toxische Radikale frei [65]. Eine ganze Reihe von Mediatoren, wie z. B. Zytokine oder Eikosanoide, werden bei vermehrter Bildung von freien Radikalen aktiviert. Freie Radikale erhöhen den intrazellulären Ca²⁺-Spiegel und verstärken Leukozytenadhäsion nach Ischämie und Reperfusion durch die Aktivierung von Adhäsionsmolekülen. Andererseits kommt es bei Aktivierung von Mediatoren wiederum zur vermehrten Bildung von freien Radikalen, es handelt sich um einen Circulus vitiosus. Die Entstehung von freien Radikalen beim Reperfusionsschaden wurde bisher mittels Xanthin- und Hypoxanthin-Akkumulation [66] sowie durch Elektronenspinresonanz-spektroskopische Untersuchungen von Ausspüllösungen vor Reperfusion der Organe oder durch Untersuchung von reperfundierten Blutproben nachgewiesen [57, 67, 68, 69].

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Bildungsrate freier Radikale in der Leber und der Ischämiezeit, sowie der Reperfusionsart. Außerdem bestehen Korrelationen zwischen der Bildung freier Radikale und 1.) dem Schädigungsgrad nicht parenchymatöser Zellen, vorwiegend Sinusendothelzellen und 2.) den Veränderungen der Mikrozirkulation, 3.) der primären Galleproduktion und 4.) der Häufigkeit primären Transplantatversagens [70, 71, 72, 73].

Insgesamt wird die Radikalbildung als essentielles Schlüsselereignis für den Reperfusionsschaden angesehen. Auf Grund der bestehenden Erkenntnisse über die pathophysiologischen Abläufe bei Organreperfusion nach einer Ischämie ist es naheliegend, dass ein Organ-protektiver Effekt sowohl durch Reduktion der freien Radikalbildung, als auch durch Einsatz von Radikalfängern aufgezeigt werden konnte [74, 75]. Bei der Lebertransplantation kann der Reperfusionsschaden durch Ausspülen des Transplantates vor Reperfusion mit einer protektiven Lösung (zum Beispiel Carolina Rinse), welche auch

Radikalfänger enthält, signifikant vermindert werden [76, 77]. Auch in einer klinischen Studie wurde ein Vorteil durch den Einsatz dieser Spüllösung gesehen [78]. Diese Erkenntnisse unterstützen die zentrale Bedeutung freier Sauerstoffradikale für den Reperfusionsschaden.

1.2.3 Leukozyten-Endothelinteraktion – Mikrozirkulationsstörungen:

Direkt nach Reperfusion kommt es zur Akkumulation von Leukozyten und Thrombozyten in den Lebergefäßen [79], zu einer vermehrten Leukozyten-Endothel Interaktion in postsinusoidalen Venolen vermittelt durch eine Kaskade diverser Adhäsionsmoleküle, zu einer verstärkten intravasalen Koagulation [72] und zu einer Störung der Mikrozirkulation in den Lebersinusoiden auf Grund verschiedener mechanischer Ursachen, die zu einem Verschluß einzelner Sinusoide oder sogar ganzer Azini, sowie Akkumulation von Leukozyten führen [80, 81]. Zu diesen mechanischen Ursachen zählen neben der intravasalen Koagulation vor allem das Anschwellen bzw. Ödem der Endothelien sowie der Kupfferzellen. Auch aktivierte Myozyten sollen zur mechanischen Komponente der Mikrozirkulationsstörungen beitragen. Die Akkumulation von Leukozyten in Sinusoiden der Leber ist aber nicht auf eine Leukozyten-Endothelinteraktion zurückzuführen, da das essentielle Adhäsionsprotein P-Selektin nicht vom Sinusendothel exprimiert wird und somit eine Adhäsion von Leukozyten an das Endothel hier im Gegensatz zu Venolen nicht stattfinden kann [82, 83]. Als initialer Stimulus für diese pathophysiologischen Vorgänge werden Entzündungsmediatoren angesehen, wobei auch hier den toxischen Sauerstoffradikalen eine entscheidende Bedeutung zugemessen wird [84, 85]. Die beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge der mikrozirkulatorischen Störungen wurden bei verfetteten Organen in deutlich ausgeprägterer Weise aufgezeigt [86].

1.2.4 Die Auswirkung der Leberverfettung auf das potentielle Spenderorgan:

Je nach dem Grad der Leberzellverfettung des Spenderorgans kommt es vermehrt zum Auftreten von PNF [87]. Das Ausmaß der Leberzellverfettung bei Spenderorganen zur

Lebertransplantation wird uneinheitlich gewertet und es besteht bis heute keine Einigkeit darüber, bis zu welchem Grad der Verfettung und unter welchen Bedingungen eine Spenderleber für eine erfolgreiche Transplantation verwendet werden kann [87]. Das Ausmaß, aber auch die Art der Verfettung, klein- oder großtropfig, das Vorliegen von hydropischer Zelldegeneration und zentrilobulären Nekrosen wirken sich unterschiedlich auf die Widerstandsfähigkeit gegenüber hypoxischer Schädigung aus.

Alkohol geschädigte Lebern zeigen nicht nur metabolische Veränderungen, sondern auch Störungen der Mikrozirkulation, welche mit Hypoxie einhergehen kann [88]. Durch chronischen Alkoholkonsum kommt es zu einer veränderten bakteriellen Darmkolonisation und einer erhöhten Permeabilität der Darmwand, welche zu einer chronischen Endotoxinämie führt [89]. Dies wiederum stellt eine weitere Ursache für die Leberschädigung dar, da durch Endotoxin aktivierte Kupfferzellen mit einer vermehrten Zytokinfreisetzung, wie auch O₂-Radikalbildung reagieren [90]. Somit zeigen sich bei Alkoholkonsum ischämietypische pathologische Veränderungen der Leber, welche bei diesem Organ bereits vor einer Ischämie chronisch eingetreten sind [91, 92]. Jedoch trifft der Umkehrschluß nicht zu, dass vermehrter Alkoholkonsum zu einer gesteigerten Ischämietoleranz bei diesen Organen führen würde, diese Folgerung ist leider falsch.

In Spenderlebern mit höhergradiger Verfettung wurde bei der experimentellen Lebertransplantation eine vermehrte Bildung von freien Radikalen, vermehrte Zellschäden, Veränderungen der Mikrozirkulation und verminderte Galleproduktion gegenüber normalen Spenderorganen als Ausdruck signifikant höherer Anfälligkeit gegenüber Ischämie- und Reperfusionsschäden beobachtet [93]. Ebenfalls signifikant erhöht sind die Leukozytenadhäsion und der Phagozytoseindex als Ausdruck eines aktivierten Immunsystems [78]. Gering bis mäßig ausgeprägte Zellverfettung in Spenderorganen scheint dagegen keinen signifikanten Einfluß auf das Überleben nach Lebertransplantation zu haben [94]. Es konnte

auch nachgewiesen werden, dass mit zunehmender Ischämiedauer in Fettlebern nicht nur SEC, sondern in weit ausgeprägterem Maße die Hepatozyten direkt geschädigt werden [95].

1.3 Aktuelle Therapieansätze zur Vermeidung des I/R-Schadens:

Es wurden in den vergangenen Jahrzehnten viele Strategien zur Vermeidung des Reperfusionsschadens propagiert, welche im Folgenden dargestellt werden. Zuvor werden diese therapeutischen Möglichkeiten in 3 Gruppen unterschieden: 1. chirurgische Maßnahmen, 2. pharmakologische Substanzen, und 3. gentechnologische Therapieverfahren. Diese Therapieansätze werden im Folgenden angesprochen:

1.3.1 Chirurgische Maßnahmen:

Hierzu zählt in erster Linie das sogenannte *Preconditioning*, die Präkonditionierung der Leber. Dabei unterscheidet man zwischen der ischämischen Präkonditionierung und dem intermittierenden Abklemmen der Leber [96]. Die ischämische Präkonditionierung besteht aus einer kurzen Phase der warmen Ischämie gefolgt von einer Phase der Reperfusion vor Beginn der eigentlichen Ischämie-Phase [97]. Im klinischen Einsatz versteht man darunter eine komplette vaskuläre Okklusion der Leber zum Beispiel mittels Gummizügel um das hepatoduodenale Band mit einer Dauer von ca. 10-15 min und einer Reperfusionssphase von ca. 15 min [98]. Der zugrunde liegende Mechanismus der Protektion wird folgendermaßen erklärt: Die „Abwehrkräfte“ der Zellen des Organes werden durch einen harmlosen Reiz getriggert und aktiviert, Abwehrmechanismen gegen die identische oder ähnliche Art von Schädigungsmechanismus zu etablieren bzw. zu stimulieren [99]. Trotz vieler experimenteller und erster klinischen Studien bleibt der Mechanismus auf der zellulären Ebene zu großen Teilen unbekannt. Verschiedene Mediatoren wurden gefunden, welche eine entscheidende Rolle bei dieser Therapieform spielen könnten. Dazu zählen das Adenosin [97, 100], Stickstoffmonoxid [97], oxidativer Stress, die sogenannten Heat Shock Proteine (HSP),

darunter insbesondere HSP 72 und Heme Oxygenase I (HSP 32) [101], sowie TNF- α [97, 102]. TNF- α initiiert die Apoptose in Hepatozyten und Sinusendothelzellen [103]. Verschiedene proapoptotische Proteine werden während der Reperfusionphase aktiviert, welche schließlich zum Zelltod führen. Neben der Apoptose, dem programmierten Zelltod, führt die postischämische Nekrose zum massenhaften Zelltod. Die Grenze zwischen Nekrose und Apoptose erscheint nicht eindeutig zu sein [104, 105]. Durch die Präkonditionierung wird die Apoptose in weit geringerem Maße angeregt. Die Morphologie des Parenchyms bleibt in einer Studie intakt und die Lebertransaminasen im Serum steigen nach langer Ischämie bei Weitem nicht so hoch an wie in der Kontrollgruppe. Von Peralta wurde in einem Model der warmen hepatischen Ischämie die Aktivierung der NO-Synthase durch Adenosin als wichtiger Mechanismus der Präkonditionierung beschrieben [97, 100]. NO kann die Apoptose durch direkte Blockade von Caspasen vermindern. Ein weiterer Ansatz der ischämischen Präkonditionierung mag darin bestehen, dass durch die kurzzeitige Ischämie ein geringer oxidativer Stress entsteht, welcher mit zelleigenen Möglichkeiten überlebt werden kann [54]. Dadurch werden diese natürlichen, zelleigenen Abwehrmechanismen hochreguliert und können nun so effektiv dem eigentlichen ischämischen, eventuell lethalen Geschehen begegnen. Zu diesen hochregulierten Protektionsmechanismen auf zellulärer Ebene gehören Protein Kinase C, AMP-aktivierte Protein Kinase, p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase, IK Kinase und die Aktivierungsmöglichkeit von Transkriptionsfaktor I [104, 106]. Alle diese Faktoren führen zu einer Zytoprotektion basierend auf der Hemmung des Zelltodes, Aktivierung von antioxidativen Mechanismen und dem Eintritt in den Zellzyklus [107].

Extrakorporale Perfusionssysteme, welche die Durchblutung der explantierten Leber unter physiologischen Konditionen ex vivo sicherstellen, können die Integrität und Funktion der Leber schützen und somit den Ischämie/Reperfusionsschaden weitgehend verhindern [108]. Die Organe können somit bis zu 72 Stunden transplantabel gehalten werden [109]. Aus

Gründen der Praktikabilität und Logistik haben diese Maschinen jedoch keinen Eingang in den transplantationschirurgischen Alltag gefunden.

Die hypertherme Präkonditionierung stellt eine weitere experimentelle Form der Organvorbereitung zur Ischämie und nachfolgenden Reperfusion dar [110]. Die Hyperthermie führt zur Induktion der intrazellulären Streßproteine (vor allem HSP 70) [111]. Die Hochregulation dieses Proteins in Verbindung mit Heme Oxygenase 1 führt zur gesteigerten Resistenz der Leber und anderer Organe gegenüber der Ischämie [112]. Auch diese Technik hat mangels Praktikabilität bisher keinen Eingang in den klinischen Alltag gefunden.

1.3.2 Pharmakologische Strategien

Eine große Anzahl an verschiedenen Substanzen wurde hinsichtlich der Möglichkeiten zur Verhinderung des Reperfusionsschadens untersucht. Dabei ist es das Ziel, entweder die schädigenden Reaktionen in der Zelle zu unterbrechen, oder aber eine pharmakologisch induzierte Präkonditionierung hervorzurufen. Die Substanzen lassen sich grob in mehrere Gruppen einteilen, welche nun im Detail aufgeführt werden.

Antioxidantien: Wie bereits oben erläutert stellt die Kupfferzelle initial nach Aktivierung durch Ischämie und Reperfusion die Hauptquelle für die Produktion und Freisetzung von toxischen Sauerstoffradikalen dar [58, 59, 113]. Radikale werden außerdem in Makrophagen, Leukozyten und in Hepatozyten selbst gebildet [114]. Weiterhin werden Radikale intrazellulär im Zytosol und in den Mitochondrien gebildet [115]. Hierzu zählen auch die hochtoxischen Hydroxyl-Radikale, welche insbesondere die DNA-Struktur in Mitochondrien angreifen, verändern und zerstören [116]. Weiterhin zerstören Radikale die Zellmembranen durch Lipidperoxidation [117]. In der Leber sind toxische Radikale wesentlich an der Apoptose von Hepatozyten und Endothelzellen beteiligt [118]. Der oxidative Stress führt zur Steigerung der mitochondrialen Membranpermeabilität, ein initialer und entscheidender Schritt beim programmierten Zelltod [119]. Weiterhin aktivieren niedrigen Dosen von

Sauerstoffradikalen die Caspasen, hohe Konzentrationen jedoch hemmen sie [120]. Somit kann erklärt werden, warum Radikale im Überangebot die Apoptose hemmen, die Nekrose somit jedoch verstärken. Basierend auf diesen erläuterten Mechanismen erscheint es sinnvoll zu sein, eine antioxidative Therapie mittels antioxidativen Substanzen durchzuführen.

Hierzu kann man nun zwischen Therapieansätzen unterscheiden, welche akut das intrazelluläre oder interzelluläre Angebot an antioxidativen Substanzen erhöhen, bzw. solchen Strategien, welche die natürlichen Abbaumechanismen von Radikalen in der Zelle stimulieren. Bei den extern zugeführten Substanzen handelt es sich in der Regel um Sauerstoffradikalfänger, welche quasi als eine medikamentöse Therapie gelten. Radikalfangende Medikamente werden für viele Erkrankungen eingesetzt, sodass etablierte Medikamente auch im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens untersucht wurden. Diese Substanzen wurden in verschiedenen Experimenten vor Spender-Organentnahme oder aber vor oder während Reperfusion im Empfänger appliziert, um einem vermehrten Anfall von Radikalen begegnen zu können. Beispielfhaft werden bisher durchgeführte medikamentöse Therapieansätze aufgelistet: Acetylcystein, Adenosin, Albumin, Corticosteroide, Cyclosporin, Diclophenac, Ebselen (Selen-haltige Substanzen), FK506, γ -Glutamylcystein-Ethyl-Ester, Glycin, Grün-Tee-Extrakt, Melatonin, PGI₂, Superoxiddismutase, Catalase, Trimetazidin und viele andere Substanzen. Keine dieser Substanzen hat einen definitiven Eingang in den klinischen Alltag weltweit gefunden. Die Substanzen wurden alle in verschiedenen Tiermodellen in unterschiedlichen Versuchsdesigns untersucht und konnten jeweils unter eindeutig definierten, standardisierten Versuchsbedingungen protektive Eigenschaften aufweisen. In der humanen Situation scheint dies jedoch nicht möglich zu sein. Keine der o.g. Substanzen konnte bis zum heutigen Stand nach Organtransplantation eine definitiv nachweisbare Verminderung des Reperfusionsschadens und damit verbundene verbesserte Organfunktion erzielen. Jedoch ist diese Aussage einzuschränken, da es eine Ausspüllösung der Leber gibt, genannt "Carolina

Rinse Solution", mit welcher das Organ vor Reperfusion gespült wird, welche auch unter klinischen Bedingungen eine Verbesserung der Organfunktion aufzeigen konnte [71, 77, 121, 122, 123, 124]. Trotz eindeutig positiver klinischer Studien hat diese Lösung keine weite Verbreitung und obligatorische Anwendung gefunden [124].

Auch Pentoxifyllin ist ein Medikament, welches experimentell gute Ergebnisse zur Vermeidung des Reperfusionsschadens aufzeigen konnte. Dabei handelt es sich um eine Methylxanthin-Verbindung, welche zu den Standardmedikamenten in der Therapie peripherer vaskulärer Erkrankungen gehört. Pentoxifyllin führt zu einer reduzierten Synthese von TNF α und Sekretion in verschiedenen Organen [125]. In der Leber wird vor allem die Kupfferzell-Aktivierung reduziert, was im Endeffekt zu einem verminderten Reperfusionsschaden nach Lebertransplantation in der Ratte führt [126, 127]. Zudem führt Pentoxifyllin zu einer verbesserten Mikrozirkulation, Effekte welche den klinischen Einsatz in der Angiologie rechtfertigen [128]. Jedoch konnte auch bei diesem Präparat bisher kein positives Ergebnis in der Anwendung in der humanen Situation nach Organtransplantation erhalten werden.

Auch Prostaglandine konnten im Tierversuch einen positiven Effekt auf die Verminderung des Ischämie/Reperfusionsschadens aufzeigen, indem sie die Mikrozirkulation verbessern und außerdem zytoprotektiv wirken [41, 126, 129]. Systemische Nebenwirkungen verhindern jedoch die therapeutische Gabe nach Organtransplantation im Menschen [130].

1.3.3 Gentechnologische Therapieverfahren:

Alle bisher angeführten Therapieansätze hatten nicht zu dem definitiven, überragenden Erfolg geführt, welcher einen alltäglichen Einsatz in der klinischen Lebertransplantation rechtfertigen würde. Wie oben bereits ausgeführt ist es eindeutig nachgewiesen, dass die Bildung von toxischen Sauerstoffradikalen im Zentrum des pathophysiologischen Geschehens des Ischämie/Reperfusionsschadens steht. Wie oben angeführt, konnten peripher wirksame

Medikamente, welche überwiegend als Radikalfänger fungieren sollten, nicht als überzeugend therapeutisch wirksam identifiziert werden. Folglich erscheint es erfolgversprechend zu sein, diejenigen Proteine zu applizieren, welche im physiologischen Bereich die Sauerstoffradikale abbauen. Hierzu wurden bereits in den vergangenen 12 Jahren erste Versuche durchgeführt, welche zumindest partiell positive Ergebnisse für den Einsatz von Superoxiddismutase in experimentellen Modellen zeigten [131, 132, 133, 134, 135]. Dabei handelt es sich um Modelle der warmen und kalten Ischämie von Leber, Niere und Herz im Transplantationsmodell. Eine erste Pilotstudie in der klinischen Nierentransplantation ergab hingegen kein positives Ergebnis [136]. Bereits um 1990 wurden von W. Land und Mitarbeiter erste klinische Studien durchgeführt, welche einen protektiven Effekt hinsichtlich des postoperativen Organversagens und der Rejektion durch Gabe von rekombinanter, humaner Superoxiddismutase nach Nierentransplantation vermuten ließen [137]. Jedoch konnten diese teils ansatzweise positiven Ergebnisse nicht dazu beitragen, dass sich die Substanz im klinischen Einsatz außerhalb von Studien durchsetzen konnte. Die intravenöse Gabe von Proteinen, welche dazu auch noch körperfremd waren, wurde hinsichtlich der Effizienz sehr kritisch beurteilt. Als wesentliche Kritikpunkte sind anzumerken, dass 1.) extern in den Blutstrom zugeführte Proteine innerhalb von Minuten durch Proteasen abgebaut werden. 2.) Die antioxidativen Enzyme, hier die Superoxiddismutase, befinden sich im extrazellulären Milieu. Somit kann die extern zugeführte SOD (wie auch andere Radikalfänger) nicht den intrazellulären Raum erreichen. Folglich können die extern zugeführten Proteasen nicht am Hauptort des pathophysiologischen Geschehens angreifen bzw. hier die toxischen Radikale neutralisieren.

Es existieren in der Leber drei verschiedene Isoformen der Superoxiddismutase, welche den jeweiligen Zellkompartimenten zugeordnet werden. Es gibt die extrazelluläre Isoform (Ec-SOD), welche in Kupfferzellen gebildet wird, die mitochondriale Isoform (Mn-SOD), welche in Mitochondrien der Hepatozyten gebildet wird und schließlich die zytosolische Isoform

(Cu/Zn-SOD), welche im Zytosol der Hepatozyten gebildet wird. Das abgebildete Schema verdeutlicht die Lokalisation der verschiedenen Isoformen.

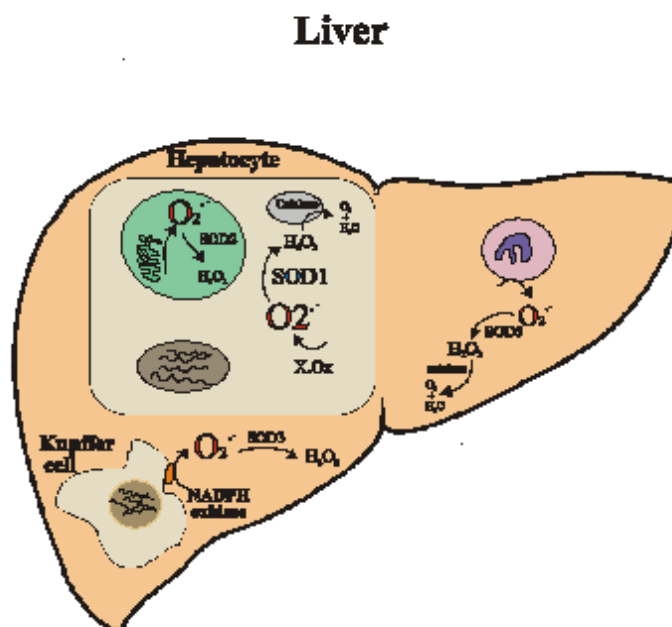


Abb. 2: Lokalisation der verschiedenen Superoxiddismutase-Isoformen

Wie oben bereits angeführt, werden die toxischen Radikale überwiegend in Kupferzellen und somit extrazellulär der Hepatozyten, im Zytosol der Hepatozyten sowie in Leukozyten gebildet. Direkt nach der Reperfusion nach Lebertransplantation sind Hepatozyten und Kupferzellen verantwortlich für den Großteil der Radikalproduktion. Leukozyten treten erst Stunden später in das pathophysiologische Geschehen ein [114, 138]. Dies bedeutet, dass die Radikale dieser Ursprungsstätten direkt vor Ort abgebaut werden sollten. Radikale im Blutstrom, also generiert von Kupferzellen, werden teilweise von Enzymen dieser Kaskade abgebaut, sie verharren nicht in der Leber und können somit im gesamten Körper detoxifiziert werden [139]. Intrazellulär gebildete Radikale hingegen sind überwiegend an das intrazelluläre Milieu gebunden. Andererseits erscheint es auch nur schwer oder gar nicht möglich zu sein, externe Proteine wie die Superoxiddismutase oder die Catalase in die Zelle über einen Transporter aufzunehmen [139, 140]. Weiterhin spricht gegen den Einsatz von

körperfremden, extern zugeführten Proteinen die Tatsache, dass diese im Blutstrom innerhalb weniger Minuten durch Proteasen abgebaut werden, wie es oben bereits erwähnt wurde [139]. Folglich müsste ein extern zugeführtes Protein wie die Superoxiddismutase in den beschriebenen Versuchen von W. Land kontinuierlich intravenös zugeführt werden. Solch ein Verfahren führt zwangsläufig zu immunologischen Reaktionen. Somit ergeben sich mehrere gewichtige Argumente, welche eine externe Gabe von Radikal-abbauenden Proteinen als wenig sinnvoll erscheinen lassen. Der wichtigste Argument ist es, dass extern applizierte Proteine nicht das intrazelluläre Milieu und damit nicht den entscheidenden Ort der Radikalbildung in Verbindung mit der toxischen Wirkung erreichen können. Veränderungen der Oberflächenstruktur von extrazellulärer SOD konnten nur geringe Erfolge erbringen [141]. Daraus lässt eine wesentlich Bedingung für eine zukünftige Technik folgern, sie sollte die Zielproteine nach intrazellulär transportieren, oder aber die intrazellulären Mechanismen zur Produktion der zelleigenen Detoxifizierungsmechanismen maximal anregen. Um diese Forderungen erfüllen zu können, bedarf es einem Eingriff in die genetischen Information, welche die Proteingenerierung bzw. die Proteinaktivierung steuert. Für diese Aufgabe steht die neue Technik des Gentransfers mittels viraler Vektoren zur Verfügung. Diese wird nun kurz dargestellt:

Verfahren für den Gentransfer

Die Gentherapie als ein modernes therapeutisches Verfahren wurde vor etwas mehr als 12 Jahren eingeführt. Die Gentherapie wird durch den Einsatz des Nukleinsäuretransfers, entweder RNA oder DNA, definiert, um eine Erkrankung zu behandeln oder einer Erkrankung vorzubeugen. Bei der Gentherapie handelt es sich um den Transfer von Nukleinsäure mittels eines Vektors im engeren Sinne, oder aber durch Antisense spezifisch für ein Onkogen, oder aber auch die intradermale Immunisierung mit DNA, welche das Hepatitis S Antigen exprimiert. Bezogen auf Gentherapie mittels Vektoren wurden erste klinische Erfolge mit der auf einem Retrovirus basierenden Therapie von Kleinkindern erzielt,

welche an einer X-Chromosom-bedingten schweren Immundefizienz (SCID-X1) litten, wobei eine langfristige Heilung erreicht werden konnte [142]. Jedoch kam es auch zu schwerwiegenden Zwischenfällen, wie die Entwicklung einer Leukämie bei einem dieser Patienten [142, 143, 144] und dem Tod eines jungen Patienten nach Applikation eines adenoviralen Konstruktes zur Heilung einer Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz [145]. Virale Vektoren dienen nicht nur zur Wiederherstellung eines Gendefektes, sie können auch in der Tumorthherapie eingesetzt werden [146, 147, 148, 149, 150]. Hierbei ist es das Ziel, die transfizierte Zelle zu zerstören, die Immunantwort zu stimulieren und nach Möglichkeit ein Virus zu benutzen, welches sich im Tumor ausbreiten kann und sich dort repliziert [151]. Die dramatischen Mißerfolge führten zur strengeren Kontrolle und Durchführung von klinischen Versuchen und zur Entwicklung weiterer Vektoren, welche eine geringere pathogene Wirkung als Ziel haben sollen [152].

Im Mittelpunkt des Konzeptes der Gentherapie steht das Ziel, exogene Nukleinsäure in Zellen verschiedener Gewebe zu transportieren. Die effiziente Aufnahme und persistierende Expression von reiner DNA gelingt nur in wenigen Geweben in seltenen Fällen. Virale und nicht-virale Vektoren konnten als Transporter der DNA entwickelt werden. Nicht-virale Transporter wie Liposomen sind zwar nicht pathogen, sind aber auch deutlich weniger effektiv in der Zielsetzung des Nukleinsäuretransfers in den Zellkern des jeweiligen Gewebes [149, 153]. Hingegen sind verschiedene Viren als Transporter effektiv, jedoch sind auch diese noch nicht ausgereift [153]. Man kann 4 wesentliche Problemfelder nennen, welche die schwierige Entwicklung von viralen Vektoren beschreiben:

- Ineffektiver Gentransfer: Viele virale Vektoren zeigen eine ausgezeichnete Gentransfer-Effizienz in Zelllinien, also *ex vivo* Bedingungen, *in vivo* ist möglicherweise jedoch die Potenz des Gentransfers sehr gering, dies ist abhängig vom Vektorsystem und der Anwendung.

- Zielgerichtete Expression: Die zielgerichtete Expression des jeweiligen Produktes ist extrem wichtig, um zum Beispiel toxische Produkte nicht in gesundem Gewebe zu exprimieren.
- Dauer der Expression: Die Etablierung eines stabilen Genproduktes ist von großer Bedeutung für die Gentherapie zum Beispiel bei der Behandlung von genetischen Defekten oder Mangelerscheinungen. Wiederholte Applikation von einem Virus könnte zu immunologischen Reaktionen führen [154].
- Sicherheit: Die Sicherheit für den Empfänger des Vektors ist von größter Bedeutung, geringste Raten von Replikation und Zytotoxizität und Immunogenität sind die entscheidenden Parameter und das Ziel der Entwicklung von Vektoren.

Insgesamt wurden in den vergangenen Jahren große Fortschritte hinsichtlich aller Aspekte der Entwicklung von Vektoren zum Gentransfer und der Zielsetzung der Genexpression erreicht. Mittlerweile kann man sagen, dass es für jeden Anwendungsbereich, bzw. jeden Anforderungskatalog ein weitgehend geeignetes Vektorsystem gibt. Jedes Vektorsystem hat seine Stärken und Schwächen, welche weitere Entwicklungsschritte bis hin zum Einsatz als allgemein einsetzbares Vektorsystem notwendig machen. Als wesentliche Vektorsysteme zum aktuellen Zeitpunkt sind die adeno-assoziierten Viren, die Adenoviren, Alphaviren, Lentiviren und Retroviren zu nennen [155]. Im Folgenden wird die Gruppe der Adenoviren mit ihren wichtigsten Charakteristika kurz beschrieben. Für diese Arbeit wurde ein adenoviraler Vektor verwendet.

Die Adenoviren sind in der Gentransfer-Forschung außerordentlich populär, da man von ihnen Basis-Vorräte mit hohem Virustiter herstellen kann und sie eine heterologe Genexpression auf hohem Niveau bieten können [154]. Adenoviren infizieren hocheffizient auch sich nicht-teilende Zellen [156]. Die erste Generation von Adenoviren zeigte eine hohe Rate an toxischen Nebenwirkungen und immunologischen Reaktionen, die folgenden Generationen zeigten diese negativen Merkmale jedoch kaum noch auf [157, 158]. Mittlerweile werden Adenoviren in verschiedenen klinischen Studien u.a. zur Tumorthherapie

von Kolon-, Prostata-, Mamma- und Gliakarzinomen und Behandlung der zystischen Fibrose eingesetzt [146, 148, 149, 150, 159, 160, 161].

Unter klinischen Bedingungen ist die Effektivität der adenoviralen Gentransfers eingeschränkt, da die meisten Menschen im Laufe ihres Lebens Antikörper gegen Adenoviren gebildet haben. Die immunologische Antwort des Empfängers führt außerdem zum Verlust der therapeutische Genexpression wenige Wochen nach Infektion [154, 162]. Diese Problematik läßt sich überwinden, indem man zum Beispiel die Außenfläche der viralen Konstrukte mit einem Copolymer überzieht und somit die antigenen Strukturen versteckt [163]. Zusätzlich kann man in die Oberflächenstruktur noch endotheliale Wachstumsfaktoren integrieren, sodass die gezielte Aufnahme in die interessierenden Zellen noch schneller erfolgt. Mit dieser Oberflächenbehandlung ist auch eine wiederholte Anwendung möglich. In anderen Ansätzen wurden verschiedene Sequenzen der viralen Gene entfernt, um die Antigenizität zu vermindern [158]. Außerdem kann man die Oberfläche auch hinsichtlich der Rezeptoren verändern, sodass eine leichtere Zelladhäsion ermöglicht wird. Schließlich kann man auch sogenannte zellspezifische Promotoren in die genetische Substanz der Viren einbauen, sodass die Genexpression in der Zielzelle stimuliert wird [164]. Zusammenfassend kann man feststellen, dass Adenoviren geradezu ideal sind, wenn eine relativ kurzzeitige, einmalige Expression eines bestimmten Genes auf höchstem Niveau in einem bestimmten Gewebe erreicht werden soll. Für die wiederholte Infektion erscheinen sie auf Grund der immunologischen Antwort zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sinnvoll zu sein [156]. Diese Ausführungen führen auf das zentrale Element zur Klärung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit hin. Das Ziel ist es, durch die einmalige Gabe eines Vektors die Expression eines Radikal-fangenden Enzymes weit über-physiologisch hochzuregulieren, sodass möglichst viele toxische Sauerstoffradikale detoxifiziert werden können, bevor sie pathogen wirken können. Hierzu bietet sich der adenovirale Gentransfer geradezu an, denn es handelt sich um eine einmalige Gabe, bei der es das Ziel ist, von dem gewünschten Produkt

eine maximale Expression von maximal vielen Zellen im Zielorgan, also höchste Effektivität zu erreichen. Weiterhin haben sich adenovirale Vektoren in ersten Tierversuchen als komplett unproblematisch erwiesen. Diese Vektoren zeigen im Tierversuch ihre außerordentlich positiven Eigenschaften wie hohe Transfektionsraten und stabile Genprodukte bei relativ geringen Nebenwirkungen [153, 156, 158]. Diese Nebenwirkungen sind dosisabhängig und lassen sich somit steuern [156].

1.4 Fragestellung

Wie oben angeführt sind toxische Sauerstoffradikale ein entscheidendes Agens in der Pathogenese des Ischämie-/Reperfusionsschadens. Wesentliche Bestrebungen, diesen Schaden mit dem Ziel der verbesserten Organfunktion nach Lebertransplantation zu minimieren, zielen auf die Reduktion der freien Radikale intra- und extrazellulär. Es ist zwar gelungen, extrazelluläre Radikale durch extern applizierte Therapeutika abzubauen, das intrazelluläre Überangebot von Radikalen konnte bisher jedoch nicht therapiert werden. Der Gentransfer stellt erstmals eine Technik dar, mit der man Radikale abbauende Enzyme intrazellulär permanent hochregulieren kann. Der adenovirale Gentransfer in die Leber in vivo ist effizient möglich und führt zu einer hohen Expressionsrate [165]. Erste Versuche mit adenoviralem Gentransfer von mitochondrialer Superoxiddismutase in einem Modell der warmen Ischämie der Leber in der Maus waren sehr vielversprechend, der Organschaden konnte deutlich reduziert werden [166]. Durch die Überexpression von extrazellulärer Superoxiddismutase mittels adenoviralem Vektor in der Herzmuskulatur von Hasen konnte das Ausmaß der Parenchymschadens nach Myokardinfarkt deutlich vermindert werden [167]. Diese ersten Studien zum Einsatz von adenoviralem Gentransfer konnten beweisen, dass der Gentransfer von Superoxiddismutase prinzipiell möglich ist und zu einer Verminderung des Reperfusionsschadens führen kann. Außerdem konnten andere Studien zeigen, dass der zielgerichtete Gentransfer in die Leber auch unter den Bedingungen der kalten Ischämie, also

der Konservierung eines Lebertransplantates mit University of Wisconsin Lösung, erfolgreich ist und diese Bedingungen nicht das Produkt einschränken [168].

Basierend auf diesen vielversprechenden Vorarbeiten, welche die Umsetzung des Prinzips bestätigten, ergaben sich nun folgende Fragestellungen, welche im Modell der orthotoper Lebertransplantation in der Ratte erarbeitet werden sollten:

1. Adenoviraler Gentransfer von Superoxiddismutase in die Spenderleber – ist diese Technik unter den gegebenen Bedingungen mit einem adenoviralen Vektor erfolgreich, kommt es zu einer erhöhten Expression der Superoxiddismutase nach Organentnahme und auch identisch nach Transplantation?
2. Welchen Einfluß hat die Überexpression von Superoxiddismutase auf die Transplantatfunktion, den postischämischen Transplantatschaden und folglich auf das Überleben nach Lebertransplantation?
3. Können durch Überexpression von Superoxiddismutase marginale Organe als geeignete Spenderorgane verwendet werden, welche ohne protektive Vorbehandlung mit hoher Wahrscheinlichkeit zum primären Organversagen nach Lebertransplantation führen würden? Kann man also durch die Vorbehandlung mittels Gentransfer von Superoxiddismutase den Organpool vermehren und damit den Organmangel mildern?
4. Auf welchen molekularen Mechanismen beruht die Schädigung durch die Sauerstoffradikale? Welchen Einfluß haben die Radikale auf die wesentlichen Mediatoren des zellulären Schadens wie den nukleären Transkriptionsfaktor- κ B (NF- κ B) und TNF α ? Führt die Überexpression von Superoxiddismutase in der Tat zum Abbau von Sauerstoffradikalen, kann man folglich freie Sauerstoffradikale zum Beispiel in der Galle als Exkretionsflüssigkeit nachweisen und werden diese in Organen mit protektiver Therapie weniger stark gebildet und ausgeschieden?
5. Es existieren in der Leber drei verschiedene Isoformen der Superoxiddismutase, welche den jeweiligen Zellkompartimenten zugeordnet werden. Es gibt die extrazelluläre Isoform (Ec-SOD), welche in der Kupfferzellen gebildet wird, die mitochondriale Isoform (Mn-SOD), welche in Mitochondrien den Hepatozyten gebildet wird und schließlich die zytosolische Isoform (Cu/Zn-SOD), welche im Zytosol der Hepatozyten gebildet wird. Welchen Einfluß hat die Überexpression jeder einzelnen Isoform jeweils auf den Reperfusionsschaden? Kann man auf Grund

dieser Ergebnisse auf die wesentliche Lokalisation der Radikalbildung schließen, bzw. läßt sich somit das Zellkompartiment mit dem größten Potential für Radikalbedingte Schäden bestimmen?

6. Welchen Einfluß haben die Sauerstoffradikale auf das Schadensausmaß und das Regenerationsverhalten einer transplantierten Teilleber? Kann man durch Reduktion des postischämischen Schadens die Zellteilung beschleunigen und somit die Phase der kritisch kleinen Lebermasse einer Split-Leber verkürzen? Darf man auf Grund des minimierten Zellschadens in protektiv vorbehandelten Organen eine etwas kleinere Lebermasse transplantieren, als gewöhnlich als Minimum gefordert wird?

2 Materialien und Methoden

2.1 Adenovirale Vektoren

Rekombinante, Replikations-defiziente adenovirale Vektoren, welche das Transgen für β -Galaktosidase als Markerenzym (*Ad.lacZ*), oder Ec-SOD, oder Mn-SOD oder aber Cu/Zn-SOD wurden nach etablierten Standardprotokollen angefertigt [166, 169]. Bei *Ad.lacZ* zum Beispiel wurde der Plasmid Shuttle Vektor pAd5-CMV-*lacZ* entsprechend der bekannten Standard Protokolle wie von Sambrook beschrieben angefertigt [170]. Das adenovirale Shuttle Plasmid wurde in eine HEK 293-Zelllinie transfiziert um ein rekombinantes *Ad.lacZ* Adenovirus herzustellen. Die Herstellung von *Ad.IkB* gestaltete sich wie folgt entsprechend der Literaturangaben [169]: Das Plasmid pRc/CMV-IkB α S32A/S36A, welches den Hämagglutinin-markierten humanen Superrepressor von NF- κ B enthält, wurde in die XbaI-Seite von dem pACCMV.PLPASR Plasmid geklont, um das Plasmid pACCMV/IkB zu klonen, in welchen IkB durch den CMV Promotor verstärkt wird. Das rekombinante Adenovirus *AdIkB* wurde dann durch Cotransfektion einer 293 humanen Nierenzelllinie mit dem pACCMV/IkB Plasmid zusätzlich mit dem gereinigten Fragment der ClaI-behandelten DNA von E1-reduzierten Adenoviren des Typs 5 hergestellt. Die Existenz der IkB Sequenz in dem rekombinanten Ad5 Virus (*AdIkB*) wurde mittels PCR und Western Blots nachgewiesen. *Ad.IkB* Vektoren wurden dann in 293 HEK-Zellen hochgezogen und anschließend gereinigt. Die Titer wurden mittels optischer Dichte und sogenannter Plaque Assays bestimmt. Die Vektoren wurden dann in 10% Glyzerol bei -80°C aufbewahrt. Der Titer der „Vorrats-Lösung“ betrug nach verschiedenen Konzentrierungsschritten über 1×10^{11} PFU (platelet forming units). Die Vektoren mit den drei Isoformen der Superoxiddismutase wurden identisch hergestellt. *Ad.SOD1* (Cu/Zn-SOD) und *Ad.SOD2* (Mn-SOD) wurden dem *Gene Therapy Center der University of North Carolina* in Form eines Grundstockes, aus dem

heraus dann weitere Vorräte jeweils gezüchtet wurden, freundlicherweise von Dr. John Engelhard und Dr. Beverly Davidson, University of Iowa, zur Verfügung gestellt.

An der *University of North Carolina at Chapel Hill* (UNC) ist ein hochspezialisiertes *Gene Therapy Center* ansässig. In einem der gesamten Medizinischen Einrichtungen der UNC zugänglichen *Vector Core* dieses Gene Therapy Centers werden die gewünschten Vektorsysteme zum Gentransfer hergestellt und gelagert.

2.2 Tiere und Tierhaltung

2.2.1 Tierhaltung

Alle Tierversuche waren von der zuständigen Behörde ordnungsgemäß genehmigt und die vom Gesetz geforderten Voraussetzungen zur Haltung und Überwachung der Versuchstiere während des Versuches, sowie ihre ordnungsgemäße Entsorgung nach Beendigung des Versuches waren durch den zuständigen Veterinärmediziner und ausgebildete Tierpfleger der Central Animal Facility, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA gegeben. Richtlinie für alle Tierversuche war die Publikation „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ in *NIH Publication 86-23, revised 1985* sowie der Bestimmungen des *State of North Carolina* und des *Animal Use Committee of the University of North Carolina*. Von allen Tierexperimentatoren wurde an der University of North Carolina die Teilnahme an einem Tierversuchskurs mit Schwerpunkt Tierhaltung und -pflege, Tieranästhesie und postoperative Schmerztherapie vor Aufnahme der Versuche gefordert.

Für alle Untersuchungen wurden kommerziell erhältliche, rückgezüchtete Ratten der Rasse Sprague-Dawley verwendet. Dabei handelte es sich ausschließlich um weibliche Ratten mit einem Gewicht von 190 bis 230 Gramm. Die Tiere wurden frei von spezifischen Pathogenen von der Firma Charles-River Wiga in Raleigh, NC, USA geliefert und in den tierexperimentellen Einrichtungen der University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA, in Gruppen von 2 bis 4 Tieren pro Käfig gehalten. Nach einer Akklimatisierungsphase von 5

Tagen mit einer Tag-Nachtzeitschaltung von jeweils 12 Stunden, wurden die Tiere für die Versuche verwendet. Nach erfolgreicher Transplantation wurden die Tiere wieder in die Versuchstieranlage zurückgebracht. Vor und während der Versuche hatten die Tiere mit Ausnahme der Fettlebergruppe (siehe unten) freien Zugang zu Wasser und Standard-Laboratoriumsdiät für Nager (Agway PROLAB RMH 3000, Syracuse, NY, USA).

2.2.2 Gentransfer mit adenoviralen Vektoren

Die Organspendertiere wurden durch Inhalation von Methoxyfluran narkotisiert. Sodann wurde in der linken Leiste die Vena femoralis freipräpariert. Organspendern, welche zur jeweiligen Kontrollgruppe gehörten, wurde 1 ml Ringer'sche Lösung injiziert und der Zugang zu den Gefäßen der Extremität wieder verschlossen. Allen Tieren, welche ein adenovirales Konstrukt erhielten, wurde Ad.lacZ oder Ad.SOD1 oder Ad.SOD2 oder Ad.SOD3 in einer Konzentration von 3×10^9 PFU aufgelöst in 1 ml Ringer'sche Lösung in identischer Weise injiziert. Diese Dosierung des Virus wurde in Pilotstudien (siehe Vorarbeiten im Ergebnisteil) als optimal herausgearbeitet. Um eine maximale Proteinexpression zu erreichen, wurden die Spendertiere 72 Stunden vor der Organentnahme mit den viralen Konstrukten transfiziert (siehe Vorarbeiten).

2.2.3 Fettleberinduktion – chronisches Ethanol-Modell

Die Spender-Ratten wurden immer zu zweit in einem Käfig untergebracht und erhielten eine minimal modifizierte Ethanol-diät nach Lieber und DeCarli für 4 bis 5 Wochen [171, 172, 173]. Dabei erhalten die Ratten eine vollwertige Ernährung mit äquivalenten Mengen von Getreide-Öl (35% der Kalorien) und 36% der Kalorien stammen von Ethanol in den Ethanol-Fettleber-Gruppen. Die hochkalorisch ernährte Kontrollgruppe ohne Alkohol erhielt ein isokalorisches Maltose-Dextrin Gemisch [171]. Ethanol-behandelte Ratten hatten freien Zugang zu der Diät und die tägliche Nahrungsaufnahme wurde gemessen. Die hochkalorische, Ethanol-freie Kontrollgruppe erhielt entsprechend die identische Menge an

Kalorien und Nahrung für die jeweilig identische Nahrungsaufnahme-Periode. Die Tiere erhielten täglich um 16.00h ihre Diät und wurden täglich gewogen und hinsichtlich des Allgemeinzustandes beurteilt. Mit Hilfe dieses Ernährungsschemas erhöhen sich die Triglyceride in der Ethanol-Gruppe um den Faktor 2,4 innerhalb eines Fütterungszeitraumes von 4 Wochen [171, 174]. Die unbehandelten Kontrolltiere hatten freien Zugang zur Standardlabornahrung für Nager und Wasser.

2.2.4 Fettleberinduktion - Akutes Ethanol-Modell

Die Spenderratten erhielten Ethanol in einer Dosierung von 7 g/kg Körpergewicht direkt oral in den Magen appliziert. Dazu wird reines, unvergälltes Ethanol mit einer 0,9%igen Kochsalzlösung im Verhältnis 1 zu 4 gemischt. Das Volumen wird in einer Spritze aufgezogen und nun dem Tier über eine starre Magensondierung mittels Knopfkanüle direkt in den Magen verabreicht [175, 176]. Durch diese akute, massive Alkoholaufnahme sind die Tiere nicht nur Alkohol-intoxikiert, sie erleiden eine massive feintropfige Leberverfettung, welche reversibel ist. Das Alkoholgemisch wird 20 Stunden vor der Organentnahme appliziert, da nach diesem Zeitraum die Verfettung maximal ausgeprägt ist und die Alkoholintoxikationszeichen insbesondere hinsichtlich Depression der Atmung nicht mehr vorhanden sind, sodass die Inhalationsnarkose komplikationslos durchgeführt werden kann.

2.3 Die Technik der orthotopen Lebertransplantation in der Ratte

2.3.1 Die Spenderoperation

Die Lebertransplantation in der Ratte wurde bereits 1979 von Kamada und Calne ausführlich beschrieben und diese Technik gilt auch heute noch als das Standardverfahren [177, 178], auch wenn viele kleine Modifikationen stattgefunden haben, welche unter anderem der Autor selbst auch eingeführt hat. In Allgemeinnarkose durch Inhalation von Methoxyfluran wurde nach gründlicher Rasur des Abdomens und Hautdesinfektion das Abdomen in der

Medianlinie eröffnet. Anschließend wurde die Leber von fast allen Aufhängebändern befreit. Sodann wurde das Ligamentum hepatoduodenale freigelegt, dargestellt und der Gallengang distal der Leber isoliert, mit einer Ligatur angeschlungen, ein Polyethylenstent (22G) von 5 mm Länge in das Lumen eingebracht und mit der Ligatur fixiert. Intravenös wurden 50 iE Heparin injiziert. Sodann wurde die Pfortader angeschlungen, auf Höhe der V. mesenterica inf. mit einem Mikrogefäß-Clip unterbunden, Leber-wärts davon inzidiert und dann eine Kanüle (18G) eingebracht. Die suprahepatische Vena cava wurde eröffnet und nun die Leber über die Kanüle mit 10 ml eiskalter, isotonischer Kochsalzlösung perfundiert. Sodann wurde die Leber mit 5ml eiskalter University of Wisconsin (UW) Konservierungslösung (ViaSpan®, DuPont Pharma, Wilmington, DE, USA) über die Pfortaderkanüle perfundiert und konserviert. Die Leber wurde nun aus dem Abdomen entnommen, wobei die letzten Aufhängebänder und die A. hepatica communis noch durchtrennt werden mußten. Die gesamte Organentnahmeoperation dauerte bis zu diesem Punkt 7 bis 9 min, wobei minutiös darauf geachtet wurde, dass die Leber annähernd nicht angefaßt oder bewegt wurde, um einen Manipulationsschaden zu verhindern [179]. Das Spendertier verstarb in tiefer Narkose durch Ausbluten. Sodann wurde die Leber in eine Petrischale gelegt, welche mit eiskalter UW-Lösung gefüllt war und auf Eis in einer größeren Schale stand. In dieser kalten Konservierungslösung wurde das Organ präpariert, die Cuff-Manschetten an V. cava inferior und V. portae (jeweils 14G) fixiert und in die A. hepatica communis nach Unterbindung der A. gastrica und A. gastroduodenalis ein Splint (24G) für die Anastomosierung eingebracht. Die so komplett für die Implantation vorbereiteten Organe wurden nun in einem verschlossenen mit UW-Lösung gefülltem Gefäß, welches auf Eis stand, für 24h in einer Kühlkammer bei 4°C aufbewahrt.

Für die Versuchsreihe mit größenreduzierten Lebern wurden die Organe nach Entnahme zunächst in eine mit eiskalter UW-Lösung gefüllten Schale gelegt. Sodann wurden die einzelnen linken und inferioren rechten Leberlappen entfernt, bis schließlich nur noch der

rechts laterale und rechts kaudale Leberlappen übrig blieben. Das Gewicht der Restleber betrug nun nur noch ca. 45% des ursprünglichen Gesamtgewichtes. Die Ligaturen an den einzelnen Gefäßstielen wurden mit 5/0 Seide angelegt. Es wurde bei diesen Schritten exakt darauf geachtet, dass keinerlei Obstruktion von übrigen Strukturen verursacht wurde und insbesondere die verbliebenen Gefäße nicht eingeeengt wurden. Auch wurde besonders auf die Vermeidung jeglicher Manipulation geachtet. Das Gewicht der Restleber wurde auf einer hochsensiblen Waage nach Abtropfen der UW-Flüssigkeit ermittelt und in Relation zum Gesamtgewicht der intakten Leber gesetzt.

2.3.2 Die Empfängeroperation - Implantation

In Allgemeinnarkose durch Inhalation von Methoxyfluran wurde nach gründlicher Rasur des Abdomens und Hautdesinfektion das Abdomen in der Medianlinie eröffnet. Anschließend wurde die Leber von allen Aufhängebändern befreit. Die suprahepatische Vena cava wurde auf ihrer gesamten Länge dargestellt. Sodann wurde das Ligamentum hepatoduodenale freigelegt, dargestellt und der Gallengang an der Leber isoliert, koaguliert und abgesetzt. Die Arterie wurde identisch präpariert und abgesetzt. Die Vena portae wurde nun dargestellt und von umgebenden Bindegewebe befreit, die Vena pylorica als letzte einmündende Vene vor der Leber koaguliert und abgesetzt. Die rechte Nebennierenvene wurde ebenso koaguliert und abgesetzt. Anschließend wurden Klemmen an V. cava inferior und superior sowie die Vena portae gesetzt. Das Organ wurde entfernt und die Spenderleber eingesetzt, nachdem sie zuvor mit 10ml isotoner, eiskalter Kochsalzlösung gespült worden war um die UW Lösung zu entfernen. Die suprahepatische Anastomose wurde durch eine fortlaufende Naht mit 7/0 Prolene[®] (Ethicon, Norderstedt) hergestellt. Die infrahepatische Vena cava und die Vena portae wurden in ihrer Kontinuität durch die Cuff-Anastomosierung und die Arteria hepatica durch Insertion des Splintes in die A. hepatica communis wiederhergestellt. Es erfolgte dann die simultane Reperfusion von Vena portae und Arterie. Auch der Gallengang wurde durch

Insertion des Splintes in den korrespondierenden Gallengang wiederhergestellt. Sodann wurde das Abdomen mittels fortlaufender Naht wieder verschlossen. Die anhepatische Phase dauerte 11 bis 13 Minuten, für die gesamte Implantation wurden 32 bis 36 Minuten benötigt. Nach Abschluß der Operation wurden die Tiere wieder in den Käfig zurückgelegt und unter einer Wärmelampe erwärmt. Die Tiere wachten dann wieder auf und nahmen bald Nahrung zu sich, welche sie frei zu sich nehmen können. Die postoperative Schmerztherapie erfolgte mit Tramal Tropfen.

2.4 Das Überleben - Definition

Um jegliche Komplikationen oder Interferenzen durch eine Rejektion zu vermeiden, welche in der Regel etwa 10 Tage nach der Transplantation einsetzt, wurde das Überleben der Empfänger als ein Überleben von mindestens 7 Tagen nach Transplantation definiert.

2.5 Lebergewicht bei Regenerationsversuchen

Die Empfänger der größenreduzierten Lebern wurden 7 Tage nach Transplantation getötet. Die Lebern wurden entnommen, Cuffs, Kanülen und Nahtmaterial entfernt und anschließend nach Abtropfen gewogen. Um jeglichen Einfluß des Gesamtkörpergewichtes auszuschließen, welches bei den Tieren unmittelbar nach Lebertransplantation in der Regel zunächst abnimmt, wurde die Zunahme des Gewichtes innerhalb der 7 Tage nach Reperfusion mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Leber - Gewichtszunahme} = \frac{(W0 / BW0 - W7 / BW7)}{(W7 / BW7)}$$

(W0 = Gewicht der größenreduzierten Leber vor Transplantation; BW0 = Gewicht des Empfängers unmittelbar nach Transplantation; W7 = Gewicht der transplantierten Leber 7 Tage nach Reperfusion, BW7 = Gewicht des Empfängers 7 Tage nach Transplantation direkt vor Organentnahme).

2.6 Bestimmung der Aktivität von β -Galaktosidase und Superoxiddismutase

Das Lebergewebe wurde in einem speziellen Puffer A (40 mM Tris, 140 mM NaCl und ein Proteaseinhibitor Cocktail mit Aprotinin, Leupeptin, PMSF, und Dithiothreitol) homogenisiert. Nachdem das Homogenat mittels Zentrifugation bei 10,000 x g für 10 min bei 4°C gereinigt worden war, wurde das Extract gesammelt und in Puffer A zu einem Endvolumen von 150 μ L verdünnt. Eine kleine Menge von 150 μ L des Puffers B (120 mM Na_2HPO_4 , 80 mM NaH_2PO_4 , 2 mM MgCl_2 , 100 mM 2-mercaptoethanol) und 1.33 mg/mL von *O*-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG) wurden zu dem Extrakt hinzugegeben und für 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500 μ L einer 2.8%igen Natrium-Karbonat Lösung gestoppt. Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde durch die Reaktion mit ONPG quantifiziert, welches dann gelbes Nitrophenol ergab, das wiederum bei 420 nm spektrophotometrisch gemessen wurde. Die erhaltenen Werte wurden dann auf den Protein-Gehalt bezogen, welcher mittels des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad, Hercules, CA) bestimmt wurde.

Die Superoxiddismutase (SOD) Aktivität wurde mit Hilfe der Reduktion von Ferricytochrom C gemessen [180, 181]. Das Extrakt von Lebergewebe (10 μ L) wurde einer Lösung hinzugegeben, welche 50 mM K_2HPO_4 , 0.1 mM Na_2EDTA , 0.5 mg/mL Cytochrom C, und 0.25 mg/mL Xanthin enthielt. Superoxid wurde durch die Zugabe von 0.004 Einheiten der Xanthinoxidase gebildet. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Kühlung auf Eis gestoppt und die Absorption von Cytochrom C spektrophotometrisch bei 550 nm gemessen. Die Superoxid-Konzentration wurde ermittelt, indem die Hintergrund-Absorption subtrahiert wurde und dieser Wert durch den mmolaren Extinktionskoeffizienten von 18,5 dividiert wurde. Die SOD-Aktivität wurde ermittelt, indem eine Standardkurve als Basis zugrunde gelegt wurde, welche durch die Reaktion mit

gereinigter, boviner Erythrozyten-Superoxiddismutase (Boeringer Mannheim, Mannheim) ermittelt wurde.

2.7 Western Blot von Superoxiddismutase

Lebergewebe wurde in Puffer A (40 mM Tris, 140 mM NaCl, und der Proteaseinhibitor-Cocktail s.o.) homogenisiert. Nach der Zentrifugation bei 900 g wurde der Überstand separiert und darin der Proteingehalt mittels des Bio-Rad Protein Assays (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ermittelt. Der Überstand wurde in Puffer A bis zu einer Konzentration von einem Endvolumen von 15 µL verdünnt. Zu diesem Substrat von 15 µL wurden weitere 15 µL eines 2X Laemlli Puffers hinzugegeben und diese Probe dann bei 95°C für 5 min erhitzt bevor sie auf in Geltasche eingebracht wurde. Die Proteinprobe wurde dann durch Gelelektrophorese in einem 10% SDS-PAGE Gel aufgetrennt und anschließend mittels der semi-dry transfer Methode auf Nitrocellulose übertragen. Die Membran wurde dann in 5% fettfreiem Trockenmilchpulver in TBS/ 0.05% Tween-20 für 1 h inkubiert und anschließend mit einem 1:1000 verdünnten polyklonalen Hase anti-SOD Antikörper (ACCU-SPECS, Westbury, NY, USA) für 2 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit einem Ziege anti-Hase IgG- Meerrettich-Peroxidase conjugated antibody mit einer Verdünnung von 1:5000 für 1 h inkubiert. Zwischen jedem einzelnen Inkubationsschritt wurde die Membran dreimal für 10 min jeweils mit TBS/ 0.05% Tween-20 gewaschen. Schließlich wurde die Membran mit dem ECL Western Detection Reagent (Amersham, Piscataway, NJ, USA) inkubiert und die Banden für SOD so visualisiert.

2.8 Immunopräzipitation bzw Western Blot Analyse von p21 & CyclinD1

Lebergewebe wurde in einem NP-40 Puffer (50mM Tris-HCl (pH7,5), 150mM NaCl, 0,5% Nonidet P-40, 50mM NaF), welcher auch Protease- und Phosphataseinhibitoren (1mM Na₃VO₄, 1mM DTT, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 1x Proteaseinhibitor Mini

Tablets (Roche, Mannheim) enthielt, homogenisiert. Das Homogenat wurde dann bei 15 000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde portioniert und bei -80°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration wurde mittels des BioRad DC Protein Reagenz (BioRad, Hercules, CA) entsprechend der Herstellervorgaben ermittelt.

Für die Western Blot Analyse wurden $100\mu\text{g}$ Proteinextrakt und das identische Volumen eines 2x Lammeli Puffers pro Streifen aufgetragen. Die Proteine wurden in einem 10% SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher and Schuell, Einbeck-Wenzen) in einer Pufferlösung (1% SDS, 20% Methanol, 400mM Glycin, 50mM Tris-HCl (pH 8,3)) bei 4°C über 2h bei 200mA übertragen [182]. Zur Primärantikörper-Inkubation wurden die Membranen mit anti-p21, anti-PCNA und anti-Cyclin D1 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, Ca, USA) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurden Peroxidase-konjugierter Donkey anti-Hase IgG (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) oder anti-Maus IgG (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) benutzt. Diese Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit dem ECL Chemiluminexence Kit (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) dargestellt. Um sicherzustellen, dass in jedem Experiment die identische Proteinmenge verwendet wurde, wurden die Membranen ausgeschnitten und mit anti- α -Tubulin Antikörper (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) inkubiert. Die gesamte Prozedur des Western Blots wurde für jedes Protein mindestens fünf Mal durchgeführt um verlässliche Angaben zu erhalten.

2.9 Histologische Untersuchungen

2.9.1 Nekrose-Rate

Acht Stunden nach Reperfusion wurden die Organe entnommen und das Lebergewebe in 10% gepufferter Formalin-Lösung durch Immersion fixiert. Anschließend wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und in $5\mu\text{m}$ dicken Gewebeschichten auf Objektträger aufgebracht. Der zelluläre Schaden in Form von nekrotischen Arealen wurde an mit Hematoxylin & Eosin-

gefärbten Gewebeschnitten ermittelt. Dabei wurden 5 Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 100x zufällig je an mindestens 4 verschiedenen Abschnitten pro Gewebeschnitt ausgewählt und die durchschnittlichen Werte ermittelt. Die histologischen Untersuchungen wurden mit verdeckter Identifikation der Gewebeschnitte durchgeführt.

2.9.2 Immunohistochemie von β -Galaktosidase

Die Beta-Galaktosidase wurde immunohistochemisch an 5 μ m dicken Paraffinschnitten auf Glasobjektträgern durchgeführt. Hierzu wurden die Schnitte in Xylen deparaffiniert, in einer Reihe verschiedener Alkoholkonzentrationen rehydriert und mit PBS-T (Natriumphosphat Pufferedlösung mit 1% Tween 20 versetzt). Für die Immunhistochemische Darstellung wurde ein monoklonaler primärer Maus Antikörper Anti- β -Galaktosidase (Boehringer-Mannheim, Mannheim) benutzt und die Immunreaktion mit dem EnVision Kit (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) visualisiert. Hierzu wurde der Primärantikörper 1: 500 mit 1% bovinem Albumin (Sigma, St. Louis, MO, USA) in PBS gelöst verdünnt. Die weiteren Inkubationsschritte wurden entsprechend den Anleitung des EnVision Kits durchgeführt.

2.9.3 Steatose

Die Bestimmung der Steatose wurde entsprechend der Standardarbeit von Enomoto 1999 durchgeführt [183]. Es wurde ein Axioskop 50 Mikroskop (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, USA) für die Untersuchung der histologischen Gewebeschnitte benutzt, welches mit einem Bild Aquisitions- und Analysesystem verbunden war (Image-1/AT; Universal Image Corp, Chester, PA, USA). Das Ausmaß der Fettansammlung und Verteilung in den perizentralen Regionen der Leberazini wurde definiert als Anteil der Fetttropfen in der eingesehen Region bzw. Azinus. Um einen repräsentativen Durchschnittswert zu erhalten, wurden durchschnittlich 5 eingesehene Felder pro Gewebeabschnitt auf dem H&E-Schnitt analysiert.

2.9.4 Apoptose

Apoptotische Zellen wurden in H&E gefärbten Gewebeschnitten gezählt, indem fragmentierte oder zerfallende Nuklei gezählt wurden. Hierzu wurden etwa 1000 Nuklei von 5 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern bei einer Vergrößerung von 400x pro Schnitt ausgewählt und ausgezählt. Apoptotische Zellkerne wurden in Prozent von allen Zellkernen pro Schnitt angegeben.

2.9.5 BrdU (Bromodeoxyuridin) Darstellung

Um die Hepatozytenproliferation zu ermitteln, wurde die DNA-Synthese in Hepatozyten 24h nach Transplantation mittels BrdU-Inkorporation ermittelt. Dreiundzwanzig Stunden nach Transplantation wurde den Empfängern BrdU (Bromodeoxyuridin) (100 mg/kg; Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA) intraperitoneal injiziert und 1h später getötet (n=6 pro Gruppe). Die Lebern wurden mittels Immersion von 10%igem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet, und immunohistochemisch weiterbearbeitet. Die Gewebeschnitte wurden deparaffiniert durch jeweiliges Bad von 5-min in Xylen, einer Alkoholreihe (100, 95, 70, und 30%) und in dH₂O rehydriert. Für die immunhistochemische Färbung von BrdU wurde das DAKO Envision system® (DAKO Corp., Carpinteria, CA, USA) benutzt. Hierzu wurden die Schnitte in 4 N HCl für 20 min bei 37°C inkubiert und dann mehrfach mit dH₂O und 1× PBS-Tween 20 (PBST; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) gewaschen. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit monoklonalem Maus anti-BrdU Antikörper (1:200 in PBS enthaltend 5% BSA; Sigma Chemical Co.) über 10 min bei 25°C inkubiert. Nach 2 Waschschritten mit PBST wurden die Gewebeschnitte mit einem markierten Polymer (Peroxidase-markiertes Polymer konjugiert mit Schaf anti-Hase and Schaf anti-Maus Immunglobulinen) über 10 min bei 25°C inkubiert. Die Gewebeschnitte wurden dann erneut 2 fach mit PBST gewaschen, mit 3,3-Diaminobenzidine (DAB) über 8 min inkubiert, mit dH₂O gewaschen, mit DAB Verstärker (Innovex Biosciences, Richmond,

CA, USA) über 5 min inkubiert, erneut mit dH₂O gewaschen und schließlich mit Hematoxylin angefärbt. BrdU-positive Hepatozyten wurden unter dem Lichtmikroskop bei einer Auflösung von 400 begutachtet und die prozentuale Anzahl der BrdU-positiven Zells in Relation zu allen Hepatozyten ermittelt, wobei die Gesamtzahl der Hepatozyten im Gesichtsfeld ermittelt wurde [184].

2.10 Klinische Chemie

Die Blutproben wurden 8 h nach Transplantation von der Vena cava inferior entnommen. Das Serum wurde mittels Zentrifugation gewonnen und zunächst bei -80°C gelagert. Die Transaminasen AST and ALT wurden mit Hilfe von Standard Enzymatischen Test Kits (Sigma, St. Louis, MO, USA) spektrophotometrisch bestimmt, Gesamt-Bilirubin hingegen wurde direkt spektrophotometrisch bei 454 nm bestimmt [185, 186]. In den Tieren, welche eine reduzierte Leber erhalten hatten, wurde das Gesamtbilirubin erst 24h nach Reperfusion bei 454 gemessen.

2.11 Electrophoretic Mobility Shift Assay für NF-κB

NF-κB Aktivität, JNK Kinase Aktivität und TNFα Freisetzung wurden in Lebergewebe untersucht, welches 70 min nach Reperfusion entnommen worden war. Die Technik des Electrophoretic Mobility Shift Assays wurde eingesetzt, um die Menge des aktiv an der Protein-DNA-Interaktionen beteiligten Proteines zu bestimmen. Es handelt sich hierbei um eine Standardmethode, welche in der Literatur ausführlich beschrieben worden war und in diesen Versuchen entsprechend der Standard-Protokolle durchgeführt wurde [187, 188]. Zunächst wurden die Zellen in Nonidet P-40 (0.25%) gelöst in 10mM HEPES und mit verschiedenen Protease Inhibitoren lysiert. Das Homogenat wurde bei 13000 x g und 4°C 10 min lang zentrifugiert und das nukleäre Pellet wurde erneut in 50µl von 50 mM HEPES, Protease Inhibitoren und 10% Glycerol gelöst. Dieses aufbereitete Pellet wurde dann 15 min

lang bei 4°C gemischt, zentrifugiert und der Überstand wurde abgetrennt und nun weiterverwendet. Electromobility Shift Assays wurden mit Strahlen-markierten Oligonucleotiden, welche spezifisch für NF-κB waren, durchgeführt. Identische Mengen (10µg) des nukleären Extrakt wurden zuerst mit 1µg poly(dI-dC), 20µg BSA (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) und 2µl einer ³²P-markierten DNA (10,000 c.p.m./µl, Cerenkov), welche 1ng einer Doppel-Strang Oligonucleotid-Verbindung enthielt, inkubiert, wobei das Endvolumen 20µl betrug. Diese Verbindung wurde dann in einem 5% Polyacrylamid und 0.4 XTBE Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Spezifität der NF-κB Anheftung wurde durch Vergleich mit nicht-markierter DNA nachgewiesen. Außerdem wurde die Bindung von spezifischen Antikörpern gegen die Untergruppen p50 und p65 an die Protein/DNA Verbindungen nachgewiesen. Nach Abschluß der Elektrophorese wurde die Gele auf X-OMAT LS Kodak Film abgelichtet. Die Intensität der NF-κB Bindungsaktivität wurde mit Hilfe des GelScan XL (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden) quantifiziert.

2.12 Kinase Assays

Die Aktivität von JNK und IKK wurde mit Hilfe eines Kinase Assays ermittelt, welches kürzlich vorgestellt wurde [189]. Die Zellextrakte wurden wie folgt hergestellt: Lebergewebe wurde in Triton Lyse-Puffer (20 mM Tris, pH 7.4, 1% Triton X, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, Protease Inhibitoren (40 µg/ml Bestatin, 0.5 µM Pefabloc, 70 µg/ml Pepstatin A, 2 µg/ml Aprotinin, 0.5 µg/ml Leupeptin, Boehringer Mannheim, Mannheim) und Phosphatase Inhibitoren (10 µM 4-Nitrophenylphosphat, Boehringer Mannheim; 20 µM β-Glycerophosphat, Sigma; 50 µM Na₃VO₄, Sigma) bei 4 °C über einen Zeitraum von 30 min aufgelöst. Nach der Zentrifugation bei 10,000 x g über 5 Minutes wurde der Überstand mit der Bradford Methode hinsichtlich des Proteingehaltes untersucht. Bezüglich des IκB Kinase (IKK)-Assays wurden 300 µg Protein mit 2 µl anti-IKKγ (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) gelöst in 500 µl Puffer (20 mM Tris, pH 8.0, 3 mM EDTA, 3mM EGTA, 250 mM

NaCl, 0.05% NP40 plus Protease and Phosphatase Inhibitoren s.o.) über 2h bei 4 °C immunopräzipitiert. Protein A/G Agarose Beads (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) wurden für 1h hinzugegeben und dann drei Mal in dem o.g. Puffer gewaschen um dann nochmals im Kinase Puffer (20 mM HEPES pH 7.7, 2 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 1 mM DTT plus Phosphatase Inhibitoren) gewaschen zu werden. Für die eigentliche Kinasereaktion wurden dann 25 µl Kinase Puffer, 1 µl GST-IκB Substrat (Aminosäuren 1-54) (0.5 mg/ml), 0.5 µCi ³²P ATP und 0.125 µl ATP (10 mM) zu jeder Probe hinzugegeben und incubated bei 30 °C über 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte das spezifische Jun-N-terminal Kinase (JNK)-Assay indem 25 µg Protein zusammen mit 1 µl GST-c-jun gebunden an GSH-Agarose Beads in 500 µl Puffer (40 mM HEPES, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.1 % Triton X) über 3 h bei 4 °C inkubiert wurde. Nach zweifacher Waschung in HBB Puffer wurden 25 µl Kinase Puffer (10 mM MgCl₂ an Stelle von 2 mM MgCl₂), 0.5 µCi ³²P ATP und 0.125 µl ATP (10mM) zu jeder Probe hinzugegeben und die Kinasereaktion lief über 30 min bei 30 °C ab und die Proben wurden dann in einem 10% SDS-Acrylamid Gel aufgetrennt. Die Gele wurden mit Coomassie Blau angefärbt, um die identische Substratmenge zu zeigen, danach getrocknet und schließlich auf Kodak Biomax Film abgebildet.. Die IKK Aktivität wurde durch die Immunopräzipitation von Leberzellextrakten mit anti-IKKγ Antikörpern (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) ermittelt. Nach dem Waschvorgang wurden die Immunopräzipitate der Kinase Reaktion unterzogen, indem GST-IκBα (1-54) als Substrat verwendet wurde. Alle weiteren Schritte entsprachen der JNK Kinase Aufstellung.

Das p38 Kinase Assay: 25 µg Protein wurden mit 5 µl Agarose-gebundenem anti-p38 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, USA) gelöst in 300 µl Triton Lyse-Puffer, welcher Protease and Phosphatase Inhibitoren enthielt, über 2h immunopräzipitiert. Nach 3 Waschvorgängen wurde die Kinase Reaktion wie oben bereits beim JNK Assay beschrieben durchgeführt, wobei 5 µg Myelinisches Protein als Substrat eingesetzt wurde. Diese Kinase Reaktion wurde

mittels eines 10% SDS-Acrylamid Geles untersucht und auf einem Phosphorimager quantifiziert. Identische Substratmengen wurden mittels Coomassie Blue Färbung nachgewiesen.

2.13 Ribonuklease Protection Assay für TNF α

Die Ribonukleinsäure wurde mittels des RNA STAT 60 (Tel-Test) Testkits aus der Leber gewonnen. Die Rnase Protection Assays wurden mit Hilfe des RiboQuant® Multiprobe Assay Systemes (Pharmingen, Carpenteria, CA, USA) durchgeführt. ³²P-markierte RNA Proben wurden mit T7 Polymerase transkribiert, indem das Multiprobe Template Set rCK-1 verwendet wurde. Die RNA (10 μ g) wurde mit 4 x 10⁵ cpm der Probe für 18 Stunden bei 56°C hybridisiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Rnase und danach mit Protein Kinase K. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit Phenol/Chloroform und eine Präzipitation mit Ethanol. Die Proben wurden dann in einem 5% Acrylamide-Bisacrylamid (19:1) Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die geschützten Fragmente mittels Autoradiographie dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem GelScan XL.

2.14 Reverse Transkriptions-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Die Gewinnung der Ribonukleinsäure aus Lebergewebe ist ein Standardverfahren und wurde hier entsprechend der einschlägigen Empfehlungen durchgeführt, siehe 2.12 und [190]. RNA (1 μ g) wurde umgekehrt transkribiert, indem Oligo(dT) as ein Primer und Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) gelöst in 25 μ l Tris-EDTA Puffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) verwendet wurden. Die weiteren Schritte der Amplifikation von TNF α und β -Actin mRNA wurden entsprechend der allgemein gültigen und verwendeten Anleitungen durchgeführt [188]. Die amplifizierten PCR

Produkte wurden elektrophoretisch in 1.8% Agarose Gelen aufgetrennt und die Bande der cDNA mittels UV-Illumination nach Färbung mit Ethidium Bromid dargestellt.

2.15 Identifikation und Quantifizierung der freien Radikale mittels Elektronenresonanzspektroskopie

2.15.1 Das Prinzip der Technik

Die Elektronenresonanzspektroskopie (ESR, oder synonym EPR) ist ein Verfahren, bei dem Moleküle mit ungepaarten Elektronen durch Magnetfelder einer monochromatischen Strahlung ausgesetzt werden und dann die resonante Absorption der eingestrahnten monochromatischen Strahlung gemessen wird. Da in der Regel Moleküle mit unpaaren Elektronen eine resonante Absorption bei Magnetfeldern einer Feldstärke von ca. 0,3 Tesla und bei einer Frequenz des elektromagnetischen Feldes von etwa 10 GHz erfolgt, wird die ESR als Mikrowellenverfahren beschrieben. Die ESR eignet sich zum Nachweis eines Radikals in einer Probe, da das magnetische Moment für die Moleküle mit unpaaren Elektronen in der Regel auch bei eingestrahelter monochromatischer Strahlung stabil bleibt. Ein Elektronenspinresonanzspektrometer besteht aus einer Mikrowellenquelle, einer Probenkammer, in die eine Probe in einem Quarzbehälter eingebracht wird, einem Elektromagneten und einem Mikrowellendetektor. Ein ESR-Spektrum wird beobachtet, wenn die Absorption einer Mikrowellenstrahlung gemessen wird, während das Magnetfeld variiert [191]. Die Hyperfeinstruktur eines ESR-Spektrums bezeichnet die Aufspaltung einzelner Resonanzlinien in mehrere Komponenten. Dabei ist eine definierte Hyperfeinstruktur eines definierten Spektrums typisch für ein in einer Probe enthaltenes Radikal [191, 192]. Die Hyperfeinstruktur eines ESR-Spektrums wird durch die Wechselwirkung zwischen den magnetischen Polen der Kerne und des ungepaarten Elektrons definiert [191]. Ein p-Elektron wird wegen seiner Distanz zum Kern einem magnetischen Feld ausgesetzt und die entstehende Wechselwirkung wird als eine wesentliche Komponente der Hyperfeinstruktur

gemessen. Ein s-Elektron hingegen zeigt eine symmetrische Ladungsverteilung um den Kern und weist daher keine messbare Wechselwirkung auf. Das s-Elektron hat jedoch eine endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Nähe des Kernes und ist somit einer Fermi-Kontaktwechselwirkung ausgesetzt, die jedoch keinem Punktdipolfeld entspricht. Insgesamt ergeben die Kombinationen aus Dipol-Dipol- und Fermi-Kontaktwechselwirkungen die in den ESR-Spektra darstellbaren Hyperfeinstrukturen [191, 193]. Bei der hier angewendeten Technik wird das Prinzip des Elektronen Spin Trappings eingesetzt, wobei ein organisches Nitron mit einem freien Radikal reagiert und ein Nitroxid bildet, welches mittels ESR dargestellt werden kann [194, 195]. Sauerstoffradikale können durch die Reaktion mit einer Spin Trapping Substanz somit erfaßt werden [57, 196, 197].

2.15.2 Die Analysen dieser Arbeit wurden wie folgt durchgeführt

Die Radikale wurden 3 Stunden nach Reperfusion in der Gallenflüssigkeit dargestellt. Hierzu wurde den Tieren in Narkose zuerst ein zentralvenöser Katheter in die rechte Vena jugularis implantiert. Sodann wurde das Spin Trapping Reagenz α -(4,4'-dipyridyl 1-oxid)-N-tert-butylnitron (4-POBN: 1g/kg) gelöst in 2 ml NaCl 0,9% langsam über den zentralen Venenkatheter injiziert. Das Abdomen wurde wieder geöffnet, der Gallengangsspilnt entfernt und eine 8 cm lange Kanüle im Gallengang plaziert. Nun wurde die Galle über 90 min in einem Gefäß gesammelt, welches auf Eis lag und 30 μ l von 30 mM 4,4'-Dipyridil enthielt, welches die *ex vivo* Radikalbildung verhindert. Sodann wurden die Proben bei -80°C gelagert. Zur Analyse wurden die Gallenproben dann in ein Quartz Gefäß gegeben und mit Sauerstoff und Ascorbat-Oxidase (Boehringer Mannheim) für 10 Minuten versetzt, um interferierendes Ascorbat zu entfernen, sowie für weitere 5 Minuten mit Stickstoff versetzt, um Sauerstoff zu entfernen. Die freien Radikale wurden dann mittels eines Bruker ESP 300 EPR Spektrometers dargestellt, wobei folgende Einstellungen vorgenommen wurden: 20-mW Mikrowellenleistung, 1.00-G Modulationsamplitude, 80-G Scanweite, 670-sec Scan und 1.3-

sec Zeitkonstante. Die so ermittelten Spektren wurden nun in Bezug auf ihre Hyperfeinstrukturen mit Hilfe einer Computersimulation untersucht [198]. Die Stärke des ESR-Signales wurde in relativen Einheiten angegeben.

2.16 Statistik

Die Mittelwerte \pm Standardabweichung vom Mittelwert der verschiedenen Gruppen und Tiere wurden mit Hilfe des Fisher's Exakt Tests oder aber der zwei-Wege Varianzanalyse in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls post-hoc Test ermittelt. Als Kriterium für die Signifikanz wurde ein $P < 0.05$ Wert festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten zur Bestätigung des Konzeptes des adenoviralen Gentransfers und der Dosisfindung beim Spender

3.1.1 Adenoviren in vivo:

Vor Beginn der Versuche mußte die Anwendbarkeit des adenoviralen Gentransfers demonstriert werden. Dabei ergaben sich drei wesentliche Punkte, welche in Form von Pilotstudien zu klären waren, bevor die eigentlichen Tierexperimente zur Therapie beginnen konnten:

- a) Immunantwort auf die Infektion mit Viren
- b) optimale Dosis-Wirkungs-Nebenwirkungskonzentration
- c) Inkubationszeit bzw. optimales Zeitintervall nach Infektion in Bezug auf maximalen Effekt
- d) Anzahl der in vivo infizierten Hepatozyten in der Leber

Alle Pilotstudien, also jedes einzelne Vor-Experiment, wurde unter den Bedingungen der eigentlichen Zielsetzung der Arbeit der Lebertransplantation in der Ratte durchgeführt, daher wurde die Praktikabilität beim Spender evaluiert. Das Spendertier wurde über eine Injektion direkt intravenös infiziert, wie es unter *Materialien und Methoden* oben beschrieben ist. Hierzu wurde Ratten das Viruskonstrukt mit dem bakteriellen Markerenzym beta-Galaktosidase intravenös appliziert. Aus Erfahrungswerten in der Literatur und eigenen Versuchen des Gene Therapy Centers an der UNC war bekannt, dass die maximale Proteinexpression mit adenoviralem Transfer nach 3 bis 5 Tagen erreicht wird. Ebenso war es aus der Literatur bekannt, dass die viralen Vektoren systemisch appliziert werden konnten, eine organspezifische Applikationsart (z.B. intraarterielle Injektion) war nicht notwendig. Die

Vektoren verteilen sich weitgehend in allen Organen, die Genprodukte können somit fast im gesamten Körper nachgewiesen werden.

Zu a.): Auch Ratten reagieren nach intravenöser Applikation von Adenoviren mit einer immunologischen Reaktion. Diese wurde zum Beispiel an einem deutlichen Anstieg der Lebertransaminasen erkennbar. In einer Versuchsreihe mit einer aus der Literatur und Vorexperimenten des Herstellers bekannten Dosierung von 1×10^9 PFU *Ad.lacZ* mit Blutabnahmen alle 6 Stunden über 5 Tage hinweg nach intravenöser Applikation konnte gezeigt werden, dass der Maximalwert von GOT und GPT etwa 24 h nach Injektion erreicht wurde, nach 72 h waren die Transaminasen wieder im Normbereich.

Da die Adenoviren in einem konservierenden Medium aufbewahrt wurden, war die Frage zu klären, ob in der Tat das Virus das auslösende Agens für die Leberschädigung war, oder aber nicht doch sogar das Konservierungsmedium zur Schädigung der Ratte führte. Die vom UNC Vector Core hergestellten Adenoviren wurden in der Konservierungslösung Glycerol aufbewahrt, welches konzentrationsabhängig zytotoxisch ist. Auffällig bei den Dosisfindungsstudien war, dass die meisten Tiere nach Applikation von 1×10^{11} PFU *Ad.lacZ* verstarben. Daraufhin wurde ausschließlich Glycerol in der Ad 1×10^{11} PFU entsprechenden Konzentrationen appliziert und die Tiere verstarben prompt. Nach Injektion von niedrigeren Dosierungen von Glycerol entsprechend der Menge von *Ad.lacZ* bei 1×10^9 PFU oder 5×10^9 PFU ließen sich keinerlei Anstiege der Transaminasen GOT und GPT im Vergleich zu Kontrollen nachweisen, sodass man davon ausgehen konnte, dass ein Transaminasenanstieg bei einer Dosierung von 1×10^9 oder aber 3×10^9 PFU auf das applizierte Virus zurückzuführen wäre. Injektionen von Glycerol entsprechend einer Dosierung von 1×10^{10} PFU führten zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Transaminasen um ca. 30% zu den Zeitpunkten 6 h und 12 h nach Injektion, 24 h nach Injektion zeigte sich immer noch eine deutliche Transaminasenerhöhung.

Zu b.) Wie bereits oben angesprochen wurden bezüglich der optimalen Dosierung von Adenoviren gemessen in *platelet forming units* (PFU) ausgedehnte Untersuchungen angestellt, da es hierzu in der Literatur für die eingesetzten viralen Konstrukte keine verlässlichen Angaben im Modell der Ratte gab. Hierbei galt es, die Wirkung und Intensität der Proteinexpression in Bezug auf Dosierung der Adenoviren zu überprüfen, sowie potentielle zytotoxische Nebenwirkungen in Relation zu setzen. Für diese Versuche wurde das Markerenzym β -Galaktosidase mit dem Vektor Ad.*lacZ* transfiziert. In der Literatur war bisher keine Methode beschrieben worden, mit welcher man die enzymatische Aktivität von β -Galaktosidase im Lebergewebe bestimmen konnte, sodass zuerst diese Methode etabliert wurde. Ebenso wurde ein immunhistochemisches Nachweisverfahren von β -Galaktosidase an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Lebergewebeproben entwickelt.

Es konnte aufgezeigt werden, dass eine kontinuierliche Steigerung der Proteinexpression von β -Galaktosidase in den Konzentrationen von 1×10^8 auf 1×10^9 und weiter auf 1×10^{10} PFU möglich war und zu einer entsprechend vermehrten Expression 7 Tage nach Transfektion führt. Eine weitere Steigerung auf 1×10^{11} PFU erbrachte keine weiter erhöhte Expression, jedoch 24 h nach Injektion tote Tiere zunächst unklarer Ursache, eventuell auf Grund der hohen Glycerol-Menge, wie oben beschrieben. Je höher die verabreichte Menge an Adenovirus war, um so höher waren die Transaminasen 24 h nach Virusinjektion. Bereits 72 h nach Injektion waren die Transaminasen je nach PFU-Menge wieder im Normbereich, wie es oben bereits beschrieben wurde. Dieses Ergebnis bedeutete, dass man die optimale Konzentration auch nach Nebenwirkungen und potentieller Regeneration bzw. inflammatorischer Antwort beurteilen muß. Dabei war es das Ziel, die bestmögliche Proteinexpression in Abwägung mit geringstmöglichen immunologischen Nebenwirkungen zu erzielen. Bei der als optimal eruierten Dosierung von 3×10^9 PFU waren die Transaminasen nach 72 h wieder im Normbereich. Bei einer Dosierung von 1×10^{10} PFU waren die

Transaminasen nach 72 h immer noch diskret erhöht bei einer nur minimal erhöhten Proteinaktivität im Vergleich zu 3×10^9 PFU.

Zu c.) Die optimale Inkubationszeit ermittelten wir, nachdem die ausgewogenste Konzentration von 3×10^9 PFU von Ad.lacZ feststand: 24 h nach Injektion zeigte sich nur ein minimaler Anstieg der Aktivität des Markerenzymes β -Galaktosidase im Serum. Dagegen konnten wir 1 Woche nach Injektion einen gegenüber dem Basiswert mehrfach erhöhte Konzentration nachweisen. Sodann bestimmten wir die Proteinaktivitäten zu diversen Zeitpunkten, alle 24 h, innerhalb einer Woche nach Reperfusion. Der Höchstwert ließ sich 72h nach Reperfusion nachweisen und bleibt dann auf einem konstant hohen Niveau für mindestens 1 Woche. Im nächsten Schritt konnte dann geklärt werden, dass im Zeitraum 3 Tage bis etwa 3 Wochen nach Inkubation die maximale Proteinexpression nach Injektion mit Adenoviren (Ad.lacZ) im Sine eines Plateaus erhalten werden konnte, dann kam es zu einem langsamen Absinken von Expression und Proteinaktivität. Etwa 6 Wochen nach Injektion war etwa noch 50% der maximalen Proteinaktivität vorhanden, nach 3 Monaten war nur noch eine minimale Restaktivität von β -Galaktosidase in der Rattenleber nachweisbar. Dieses Ergebnis bedeutete, dass der Zeitraum der erwünschten Proteinüberexpression durch adenoviralen Gentransfer genau den Anforderungen für ein Transplantat entspricht, nämlich exakt innerhalb der ersten Stunden und Tage nach Reperfusion eine maximale Überexpression zu bieten.

Zu d.) Wie oben angesprochen wurde ein immunhistochemisches Nachweisverfahren für β -Galaktosidase entwickelt. Wie es aus der Literatur und eigenen Erfahrungen des Gene Therapy Centers bekannt war, infizieren Adenoviren je nach Konzentration der applizierten Menge einen Großteil der Hepatozyten in vivo. In dem hier vorgestellten Modell der Transfektion der Leber in Ratten konnte mit der als optimal erachteten Dosierung eine sehr hohe Infektionsrate von mindestens 80% aller Hepatozyten nachgewiesen werden. Bei

manchen Tieren waren sogar über 90% aller Hepatozyten infiziert. Interessanterweise waren die Infektionsraten nicht bei jedem Tier identisch und es trat eine Schwankungsbreite zwischen 80 und 95% (n=20) auf. Ebenso überraschend war es, dass die Infektionsraten von Tieren infiziert mit 1×10^9 PFU nicht signifikant niedriger waren, als die von Tieren infiziert mit 1×10^{10} PFU (n=10 pro Gruppe). Somit war auch in dieser Hinsicht nachgewiesen, dass eine Dosierung von 3×10^9 PFU vollkommen ausreichend war, um eine optimale Infektionsrate zu erreichen. Diese hohen Transfektionsraten spiegelten sich auch in den Bestimmungen der Proteinaktivität im Leberhomogenat 72 h nach Injektion wieder, wie bereits unter c.) aufgeführt. Auch hier konnte noch eine Aktivitätszunahme von 1×10^9 PFU nach 3×10^9 PFU festgestellt werden, jedoch weitere keine Zunahme mehr nach 5×10^9 PFU und nur noch eine nicht signifikante Steigerung der Aktivität von 3×10^9 PFU nach 1×10^{10} PFU. Die nun mit *Ad.lacZ* erhaltenen Resultate wurden nun auf die Infektion mit *Ad.SOD1* übertragen und bildeten sich in identischer Weise ab. Somit wurde nachgewiesen, dass die Infektion mit *Ad.SOD1* beim Organspender zu einer Überexpression des Zielproteins führt.

3.2 Bestätigung des Konzeptes bei der Lebertransplantation in der Ratte

Nachdem nun die Grundvoraussetzungen für die Durchführung der Versuche entsprechend der Fragestellung gegeben waren, konnte nun die Technik auf die Lebertransplantation in der Ratte übertragen werden. Es folgen nun die Daten zu den ersten Versuchen. Dabei handelt es sich um Tiere, welche nicht mit einer hochkalorischen Diät oder einer Leberteilresektion vorbehandelt wurden. Den Spendern wurde ausschließlich das entsprechende Adenovirus intravenös appliziert, 72 h später die Leber entnommen, 24 h kalt konserviert und dann transplantiert.

Weiterhin sollte nun nach Überprüfung der Praktikabilität der Technik erstmals der Einfluß der Überexpression von zytosolischer Superoxiddismutase auf den Ischämie/Reperfusionsschaden nach Lebertransplantation dargestellt werden.

Der Versuchsaufbau im Schema:

	<u>Kontrolle</u>	<u>Ad.lacZ</u>	<u>Ad.SOD1</u>
Proteinexpression immunhistochemische Analyse β -Galaktosidase	ja	ja	ja
Proteinexpression β -Galaktosidase	ja	ja	ja
Proteinexpression der Superoxiddismutase	ja	ja	ja
Proteinaktivität der Superoxiddismutase	ja	ja	ja
Einfluß von der Überexpression von SOD auf das Überleben	ja	ja	ja
Einfluß von der Überexpression von SOD auf die Transaminasen und die Nekroserate histologisch	ja	ja	ja

3.2.1 Proteinexpression nach adenoviralem Gentransfer

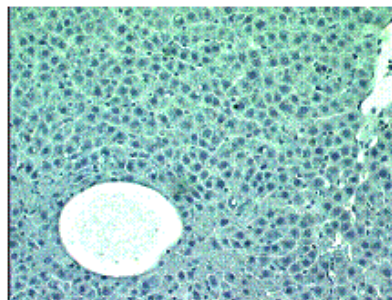
Um die Effektivität des adenoviralen Gentransfers und der Proteinexpression im Zielorgan zu zeigen, sowie auch den Einfluß der kalten Ischämie, der warmen Ischämie und der Reperfusion auf dieses Produkt zu untersuchen, wurden die transplantierten Lebern den

Empfängern 8 h nach erfolgter Transplantation entnommen. Die Lebern wurden aufbereitet und nun hinsichtlich der Proteinexpression und Aktivität untersucht.

β-Galaktosidase:

Zunächst wurde die Proteinexpression von β-Galaktosidase immunhistochemisch untersucht. Dabei konnte eine intensive Anfärbung von Hepatozyten, welche nun nach Transfektion mit *Ad.lacZ* das Enzym β-Galaktosidase exprimierten, erzielt werden (siehe Abb.3B). Die morphometrischen Analysen an 6 Tieren zeigten eine Infektionsrate von $83,4\% \pm 4,9\%$ aller Hepatozyten (siehe Abb.3B). Hingegen zeigte sich keinerlei Anfärbung bei den Kontrollen oder aber den *Ad.SOD1* infizierten Tieren (jeweils $n=6$, siehe Bild A der Abbildung 3).

A unbehandelt



B *ad.lacZ*

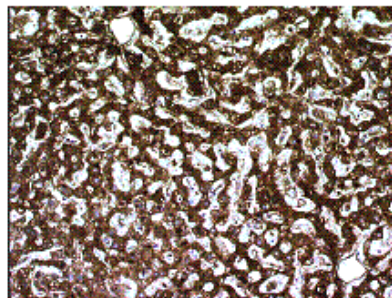


Abb. 3: Histologische Schnitte von unbehandelter Leber nach Transplantation (A), sowie transplantiertes, mit *Ad.lacZ* infizierter Leber (B). Diese repräsentativen Abbildungen zeigen histologische Schnitte von unbehandelter Leber nach Transplantation (A), sowie von transplantiertes, mit *Ad.lacZ* infizierter Leber (B). Die spezifische immunhistochemische Färbung der β-Galaktosidase erkennt man durch die Braunfärbung des Diaminobenzidines von β-Galaktosidase produzierenden Hepatozyten. Ursprüngliche Vergrößerung: X20 (A und B).

Sodann wurde die Aktivität der β -Galaktosidase im Homogenat der Leber untersucht. Bei der β -Galaktosidase handelt es sich um ein pflanzliches Enzym, welches nicht natürlich im Organismus eines Säugetieres vorkommt. Daher eignet sich dieses Protein ähnlich wie das sonst auch gebräuchliche Grün-fluoreszierende Protein (GFP) ideal als Markerenzym für den Gentransfer. Im Homogenat der nicht-infizierten Kontrolltiere zeigte sich eine Hintergrundexpression von 0,3 Absorptionseinheiten/ mg Protein, was angesichts des zuvor Beschriebenen auf die Methode zurückzuführen ist (Abbildung 4). Im Gegensatz dazu konnte in den Tieren, welche mit Ad.lacZ infiziert worden waren, ein Anstieg der Aktivität auf 2.5 Absorptionseinheiten / mg Protein nachgewiesen werden (Abbildung 4). In Ad.SOD1-infizierten Tieren wurde nur das „Hintergrundrauschen“ von 0,3 Absorptionseinheiten/ mg Protein gemessen. Dieses Ergebnis bestätigt die Daten der Vorexperimente jetzt auch nach erfolgter Lebertransplantation. Man kann daraus folgern, dass die Ischämiephase und Reperfusion das Genprodukt nach Transfer nicht schädigen. Außerdem zeigen die Daten, dass die gewählte Dosierung von Adenovirus suffizient ist und das Genprodukt in fast allen Zellen exprimiert wird.

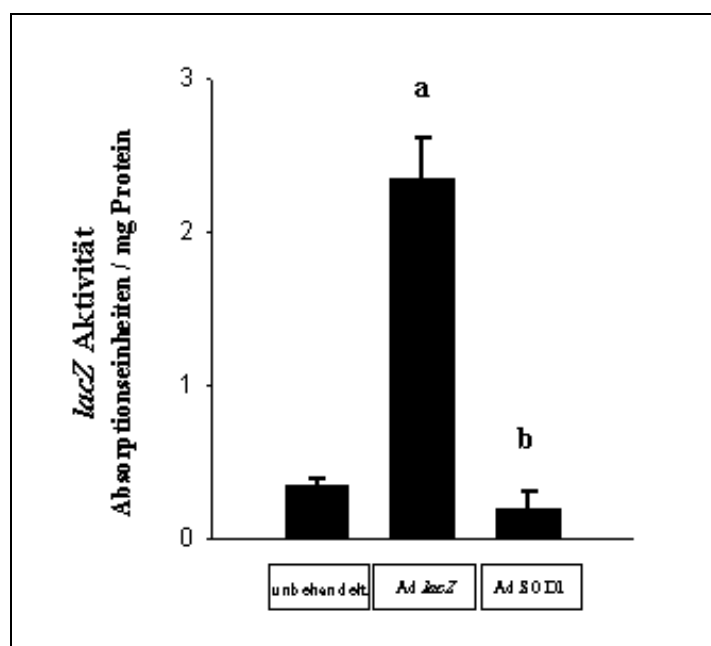


Abb. 4: Einfluß der Spenderleber-Transfektion mit Ad.lacZ auf die β -Galaktosidase-Aktivität.

Superoxiddismutase:

Um nachzuweisen dass die Infektion mit Ad.SOD1 in der Tat zu einer Überexpression von Cu/Zn-SOD in transplantierten Organen führt, wurde die SOD Expression 8 h nach Reperfusion evaluiert. Dabei wurde Leber Homogenat hinsichtlich der Expression von Cu/Zn-SOD mittels Western-Blot untersucht und dabei ein monoklonaler Antikörper spezifisch für die ~16 kDa Isoform von SOD1 eingesetzt. In den mit Ad.SOD1 infizierten Lebern konnte 8 h nach Reperfusion eine annähernd 3-fache Steigerung der Expression von Cu/Zn-SOD gegenüber der natürlichen endogenen Expression in *Ad.lacZ*-infizierten Tieren und den unbehandelten Kontrollen (Abb. 5A). Diese Ergebnisse beweisen, dass Cu/Zn-SOD erfolgreich unter den gegebenen Bedingungen in der Leber überexprimiert werden kann. Weiterhin wurde auch die SOD-Aktivität in transplantierten Organen 8 h nach Reperfusion gemessen. In den Organen, welchen 72 h zuvor Ad.SOD1 injiziert wurde, konnte im Vergleich zu Kontrollen und den *Ad.lacZ* infizierten Tieren eine etwa 10-fach höhere Aktivität gemessen werden (Abb. 5B).

Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde in homogenisiertem Lebergewebe gemessen, indem die Menge von gebildetem O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside spektrophotometrisch bei 420 nm gemessen wurde. Die Spender Tiere wurden 72 h vor Organentnahme mit *Ad.lacZ* infiziert. Das Gewebe wurde 8 h nach Lebertransplantation gewonnen. Die Werte sind auf das Gesamtprotein bezogen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (a: $p < 0.001$ im Vergleich zu unbehandelt und Ad.SOD1; b: nicht signifikant im Vergleich zu unbehandelt; mittels zwei-Wege ANOVA und mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test ermittelt, n = 6 pro Gruppe).

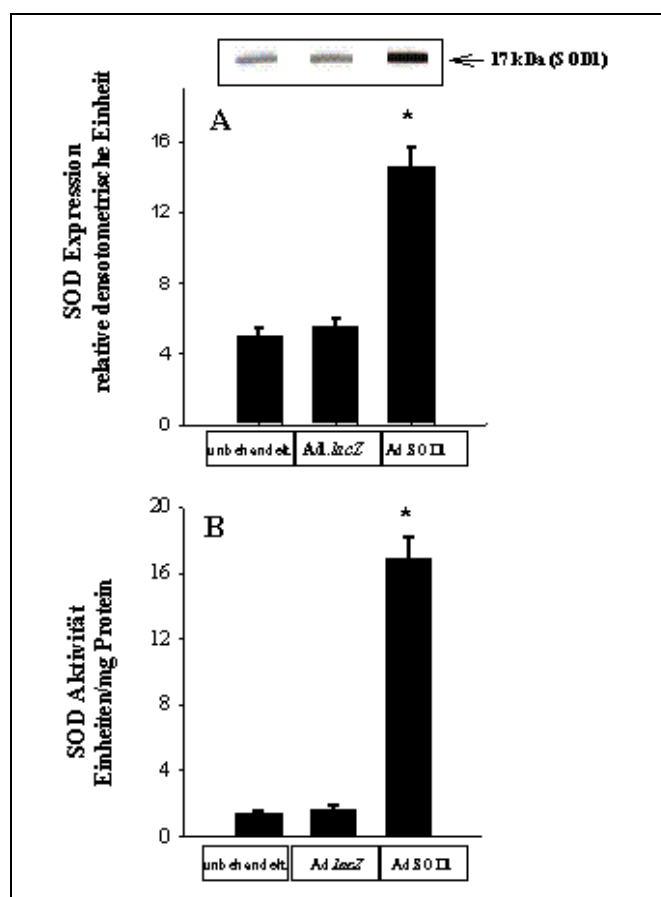


Abb. 5: A: Ergebnis der Transfektion mit Ad.SOD1 auf die Proteinexpression. B: Ergebnis der Transfektion mit Ad.SOD1 auf die Aktivität von Superoxiddismutase. Die Expression von Superoxiddismutase wurde mit Hilfe eines Western Blots evaluiert (Abb.5A). Dabei wurde homogenisiertes Gewebe mittels Gelelektrophorese auf einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf Nitrocellulose mittels der semi-dry Transfermethode übertragen. Die Membranen wurden dann mit einem polyklonalen Hase-gegen-SOD Antikörper inkubiert und die Banden durch das ECL Western Detection Reagent sichtbar gemacht. Bei dem abgebildeten Blot handelt es sich um repräsentative Banden. Relative densitometrische Einheiten wurden somit ermittelt und die Ergebnisse als $MW \pm SEM$ angegeben (* $p < 0.001$ durch zwei-Wege ANOVA verbunden mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test, $n = 6-8$ pro Gruppe). Die Superoxiddismutase Aktivität wurde in homogenisiertem Lebergewebe bestimmt (Abb.5B), indem die Reduktion von Ferricytochrom C durch Superoxid, welches durch die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion gebildet wurde, quantifiziert wurde. Die Absorption von Cytochrom C wurde spektrophotometrisch bei 550 nm bestimmt. Daraus ergab sich dann die SOD Aktivität, welche basierend auf einer Standardkurve, die zuvor mittels reiner, boviner Erythrozyten-Superoxiddismutase erstellt worden war, ermittelt wurde. Auch hier sind die Werte als $MW \pm SEM$ angegeben (* $p < 0.001$ durch zwei-Wege ANOVA verbunden mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test, $n = 6-8$ pro Gruppe).

3.2.2 Protektiver Effekt des Gentransfers von SOD1 bei der Lebertransplantation

Lebertransaminasen

Nachdem bewiesen worden war, dass die Technik des adenoviralen Gentransfers im Spenderorgan auch unter Bedingungen der Lebertransplantation erfolgreich durchführbar ist, stand jetzt die Beantwortungen der entscheidenden Fragen hinsichtlich dem protektiven Einfluß der Überexpression von SOD auf den zellulären Schaden nach Lebertransplantation an. Hierzu wurden zunächst nach erfolgreicher Transplantation die Lebertransaminasen GOT (AST) und GPT (ALT) 8 Stunden nach Reperfusion bestimmt. Die Transaminasen im Serum sind ein gut geeigneter Indikator für den hepatozellulären Schaden und erreichen ihr Maximum im Serum etwa 8 h nach Reperfusion. Unter den hier genannten Bedingungen konnten für AST hohe Werte von 1600 bis zu 2000 U/l 8 h nach Reperfusion ermittelt werden. Identisch ließen sich für ALT Werte von 1100 bis zu 1550 U/l in den Gruppen unbehandelte Kontrolle und Ad.lacZ ermitteln. Hingegen zeigte sich bei den Empfängern von SOD-überexprimierenden Organen nur ein verminderter postoperativer Anstieg der Transaminasen von etwa 40% der Werte bei den Kontrollen oder den Ad.lacZ infizierten Tieren (Abbildung 6 A&B). Folglich kann zusammengefaßt werden, dass die hier eingesetzte Dosierung von Ad.SOD1 (3×10^9 PFU) geradezu optimal ist, den laborchemisch meßbaren zellulären Schaden dramatisch zu reuzieren. Zur Analyse des Traumas ausschließlich hervorgerufen durch Narkose, Manipulation und Eröffnung des Abdomens wurden auch sogenannte Scheinoperationen durchgeführt, bei denen nur das Abdomen eröffnet wurde und Blut zur Analyse gewonnen wurde. Bei diesen Tieren wurden die Werte AST: 52 ± 11 U/l und ALT: 32 ± 10 U/l ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen sich in Form einer Grafik und sind auf der folgenden Seite zu betrachten:

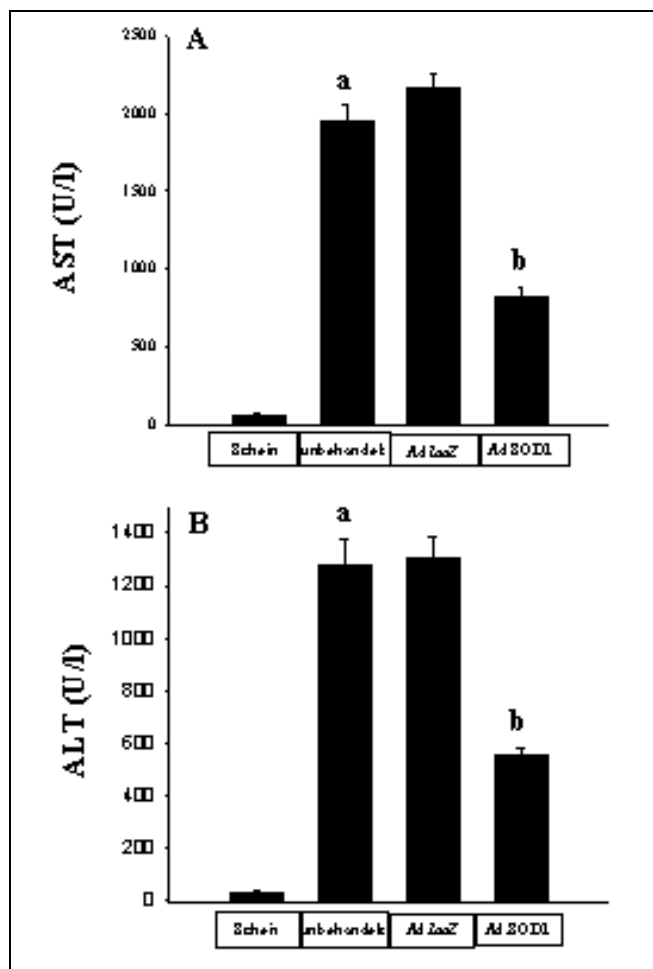
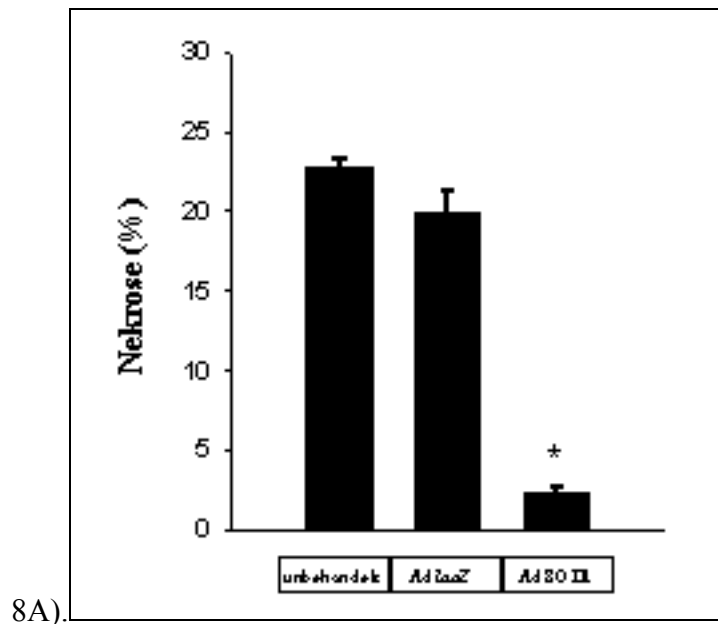


Abb. 6: Einfluß des Gentransfers auf den postoperativen Transaminasenverlauf. Bereits 8 h nach Transplantation wurde Blut der unteren Hohlvene entnommen und die Transaminasen AST (A) und ALT (B) mit Standardmethoden bestimmt. Bei den Tieren mit Scheinoperationen (Schein) wurde nur eine Laparotomie durchgeführt und Blut zur Analyse gewonnen. Die Werte sind als MW \pm SEM angegeben (* $p < 0.001$ durch zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test, $n = 6-8$ pro Gruppe); a: $p < 0.001$ verglichen mit Schein-operierten Tieren; b: $p < 0.001$ verglichen mit unbehandelten oder *Ad.lacZ*-infizierten Lebern nach Transplantation.

Histologie

Angesichts des drastischen Effektes der protektiven Therapie des adenoviralen Gentransfers von SOD auf den hepatozellulären Schaden stellte sich nun die Frage, ob man diese Ergebnisse der Transaminasen auch in Form eines morphologischen Korrelates histologisch nachvollziehen könnte. Hierzu wurden Paraffinschnitte von Lebern 8 h nach Reperfusion in Formalin fixiert lichtmikroskopisch ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass etwa 20% aller

Hepatozyten von unbehandelten und *Ad.lacZ*-infizierten Lebern nekrotisch waren. Außerdem zeigten die Lebern dilatierte Sinusoide, intrazellulär anoxische Vakuolen und apoptotische Nuklei (Abb. 7 & 8A). Im Gegensatz dazu waren jedoch nur etwa 2% aller Hepatozyten in SOD-überexprimierenden Lebern nekrotisch und die zuvor beschriebenen Pathologien waren nur vereinzelt an wenigen Stellen erkennbar (Abb. 7 &



8A).
Abb. 7: * $p < 0.001$ im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen; zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test, $n=6$ pro Gruppe)

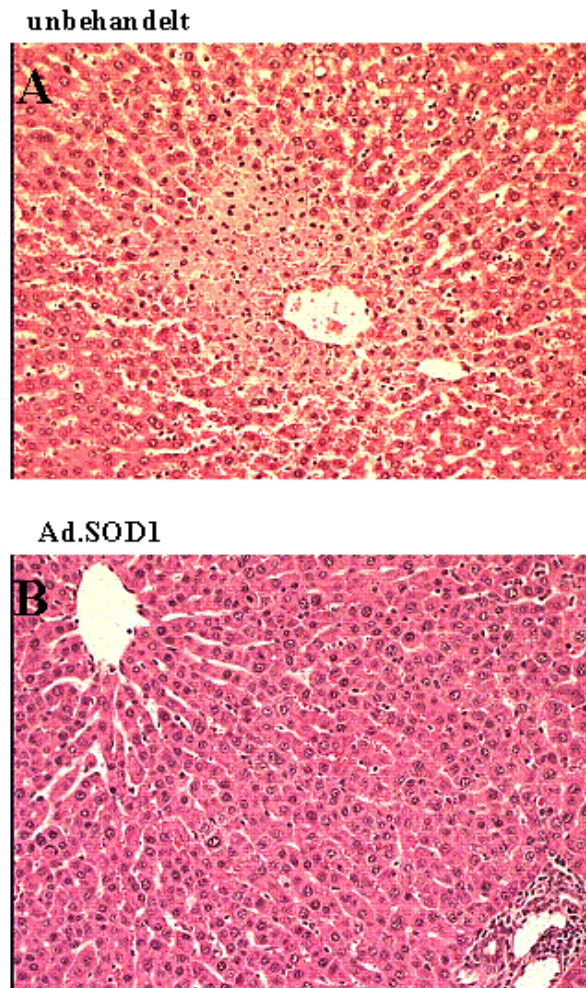


Abb. 8: Histopathologische Analyse der Lebertransplantate 8 h nach Reperfusion. Anfärbung des Gewebes mit Hematoxylin & Eosin.

Überleben

Nachdem der protektive Effekt des Gentransfers von SOD in die Spenderlebern zum frühen Zeitpunkt nach Reperfusion gezeigt werden konnte, stellte sich nun die Frage, ob diese Protektion wirklich in vivo einen Einfluß auf die Organfunktion hat und somit das Konzept der Überexpression eines Radikalfängers einen therapeutischen Nutzen erbringen kann. Hierzu bietet sich als quasi ultimativer Test das Überleben nach Lebertransplantation an. Als Überleben nach erfolgter Lebertransplantation wurde eine Überlebenszeit von 7 Tagen definiert. Die Ratten der verschiedenen Gruppen wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und in dieser Reihenfolge transplantiert, um jeglichen potentiellen Einfluß der chirurgischen Übung auf das Ergebnis im Verlauf des Versuches zu vermeiden. Sowohl die unbehandelten

Kontrollen, wie auch die Empfänger der *Ad.lacZ*-infizierten Spenderlebern zeigten Überlebensraten von ca. 25%. Der Unterschied zwischen den Empfängern der unbehandelten und der *Ad.lacZ*-infizierten Spenderorgane war nicht signifikant. Im Gegensatz zu diesen niedrigen Überlebensraten überlebten alle Empfänger von *Ad.SOD1*-behandelten Spenderorganen.

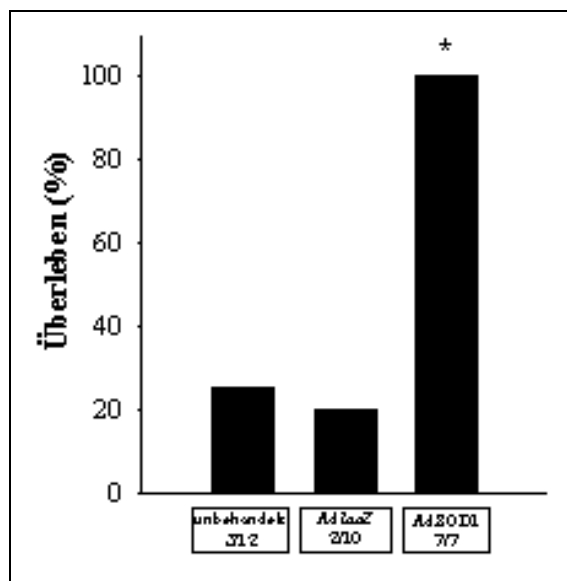


Abb. 9: Die Überlebenden sind angegeben als 3 von 12 Ratten in der unbehandelten Gruppe, 2 von 10 in der *Ad.lacZ*-Gruppe und 7 von 7 in der *Ad.SOD1*-Gruppe (* $p < 0.001$, Fisher's Exact Test gegen beide anderen Gruppen).

3.3 Mechanismen der protektiven Wirkung der SOD-Überexpression – Erweiterung des Spenderpools?

Nachdem nun die prinzipielle Anwendbarkeit des Konzeptes Überexpression von SOD zur Minimierung des Reperfusionsschadens geklärt worden war und insbesondere die tatsächlich protektive Wirkung in Form der weitgehenden Verhinderung des Reperfusionsschadens bewiesen worden war, stellte sich nun die Frage nach der tatsächlichen Wirkungsweise des Radikalfängers SOD und außerdem die Frage nach dem Einfluß auf molekulare Mechanismen der Entzündungsmediation. Unter *Fragestellung* wurden zuvor diese Untersuchungsthemen aufgeführt: Auf welchen molekularen Mechanismen beruht die Schädigung durch die

Sauerstoffradikale? Welchen Einfluß haben die Radikale auf die wesentlichen Mediatoren des zellulären Schadens wie der nukleäre Transkriptionsfaktor- κ B (NF- κ B) und TNF α ? Führt die Überexpression von Superoxiddismutase in der Tat zum Abbau von Sauerstoffradikalen?

Können durch Überexpression von Superoxiddismutase marginale Organe als geeignete Spenderorgane verwendet werden, welche ohne protektive Vorbehandlung zum primären Organversagen nach Lebertransplantation führen würden? Kann man durch Gentransfer von SOD den Organmangel mildern?

Um diese gestellten Fragen beantworten zu können, wurde zunächst die Durchführbarkeit des adenoviralen Gentransfers in hochgradig verfettete Lebern untersucht. Hierzu mußten marginale Spenderlebern geschaffen werden, was man durch die Verabreichung der Ethanolhaltigen, hochkalorischen Lieber-DiCarli-Diät erzeugen kann, wie es in Materialien & Methoden beschrieben ist.

3.3.1 Proteinexpression in marginalen Lebern nach adenoviralem Gentransfer

Um die Effektivität des adenoviralen Gentransfers und der Proteinexpression im Zielorgan marginale, verfettete Leber zu demonstrieren, sowie auch den Einfluß der kalten Ischämie, der warmen Ischämie und der Reperfusion zu untersuchen, wurden die transplantierten Fettlebern den Empfängern 8 h nach erfolgter Transplantation entnommen.

β -Galaktosidase

Zunächst wurde die Proteinexpression von β -Galaktosidase immunhistochemisch untersucht. Dabei konnte eine intensive Anfärbung von Hepatozyten, welche nach Transfektion mit Ad.lacZ das Enzym β -Galaktosidase exprimierten, erzielt werden (siehe Abbildung 10, Bild B). Die morphometrischen Analysen an 6 Tieren zeigten eine Infektionsrate von $81,1\% \pm 5,8\%$ aller Hepatozyten. Hingegen zeigte sich keinerlei Anfärbung bei den Kontrollen oder aber den Ad.SOD1 infizierten Tieren (jeweils n=6, siehe Bild A der Abbildung 10).

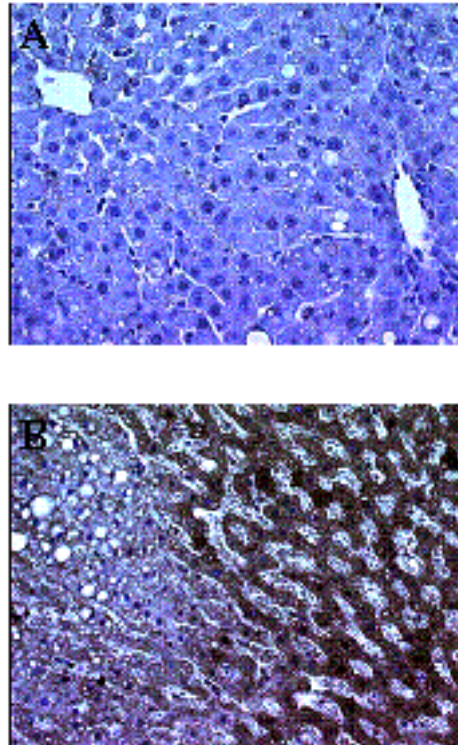


Abb. 10: Repräsentative Bildausschnitte einer unbehandelten Fettleber (A) und einer mit Ad.lacZ (B) transfizierten Fettleber. Nach erfolgter Transplantation wurden die Lebern 8 h später entnommen und dann die β -Galaktosidase nach der üblichen histologischen Vorbereitung mittels eines monoklonalen Antikörpers dargestellt, wobei diese durch Diaminobenzidine erfolgte, was an der braunen Farbe zu erkennen ist. (Ursprüngliche Vergrößerung 200X).

Nachdem der histochemische Nachweis der erfolgreichen Transfektion auch in Fettlebern geführt war, bedurfte es einer Analyse der Funktion dieses Proteins, eine wesentliche Beeinflussung durch die hochgradige Verfettung mußte ausgeschlossen werden. Hierzu wurde die Aktivität der β -Galaktosidase im Homogenat der Leber untersucht. Im Homogenat der nicht-infizierten Kontrolltiere zeigte sich eine geringfügige Hintergrundexpression, die Ad.lacZ-infizierten Tiere zeigen eine ausgeprägte Bande im Blot (Abbildung 11 und 12). In den Untersuchungen zur Aktivität von β -Galaktosidase spiegelten sich die Ergebnisse der Proteindetektion nun in vivo wieder, die Enzymaktivität war in allen nicht Ad.lacZ-infizierten Organ ganz gering entsprechend einem „Hintergrund“-Rauschen. Im Gegensatz dazu war die

Proteinaktivität der Ad.*lacZ*-infizierten Tiere jedoch ausgeprägt und entsprach etwa einem 10-fachen Anstieg gegenüber den Kontrollen (Abbildung 11 und 12).

Die SOD-Expression wurde ebenso in Lebertransplantaten 8 h nach Reperfusion evaluiert. Zunächst wurde Leberhomogenat in Bezug auf die Expression von Cu/Zn-SOD mittels Western Blot untersucht, wobei ein monoklonaler Antikörper gegen die ~19 kDa Isoform von humaner Cu/Zn-SOD eingesetzt wurde. Die Fettlebern der Tiere, welche mit Ad.SOD1 72 h vor Explantation infiziert worden waren, zeigten eine eindeutige Bande, welche die humane Cu/Zn-SOD Expression darstellte (Abb. 11 und 12). Im Gegensatz dazu konnte in keiner anderen Gruppe eine spezifische Bande entsprechend der humanen Cu/Zn-SOD dargestellt werden. Die Banden, welche die endogene SOD bei ~17 kDa darstellten, konnten in identischer Weise in allen Gruppen dargestellt werden (Abb. 11 und 12). Auch die SOD-Aktivität in den transplantierten Organen 8 h nach Reperfusion wurde untersucht. In den mit Ad.SOD1 infizierten, verfetteten Transplantaten erhöhte sich die Aktivität um etwa den Faktor 3 im Vergleich zu allen anderen Untersuchungsgruppen (Abb. 11 und 12). Diese Ergebnisse beweisen, dass der adenovirale Gentransfer von Cu/Zn-SOD äußerst erfolgreich ist und die Expression des Zielproteins in verfetteten Lebern hervorragend gesteigert werden kann.

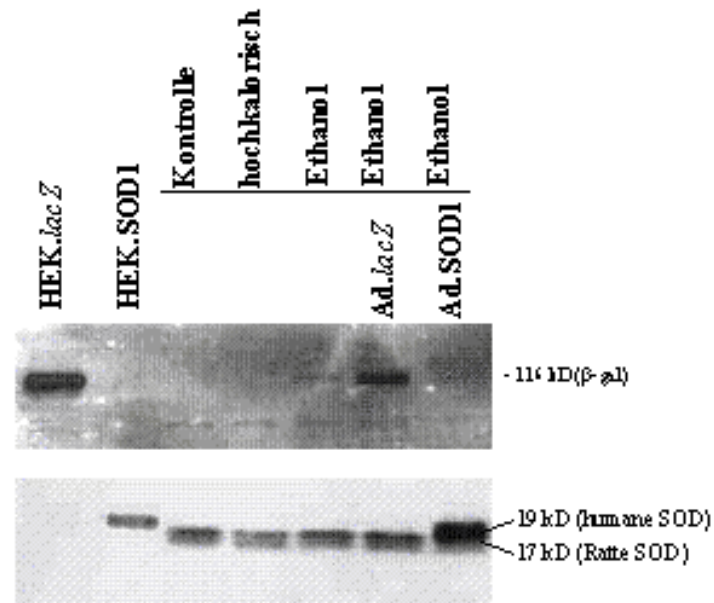


Abb. 11: Die Infektion mit Ad.lacZ und Ad.SOD1 erhöht die Expression von β -Galaktosidase und Cu/Zn-SOD. Die Superoxiddismutase- und β -Galaktosidase Proteinexpression wurden mittels Western Blotting bestimmt, ein repräsentatives Experiment ist hier abgebildet.

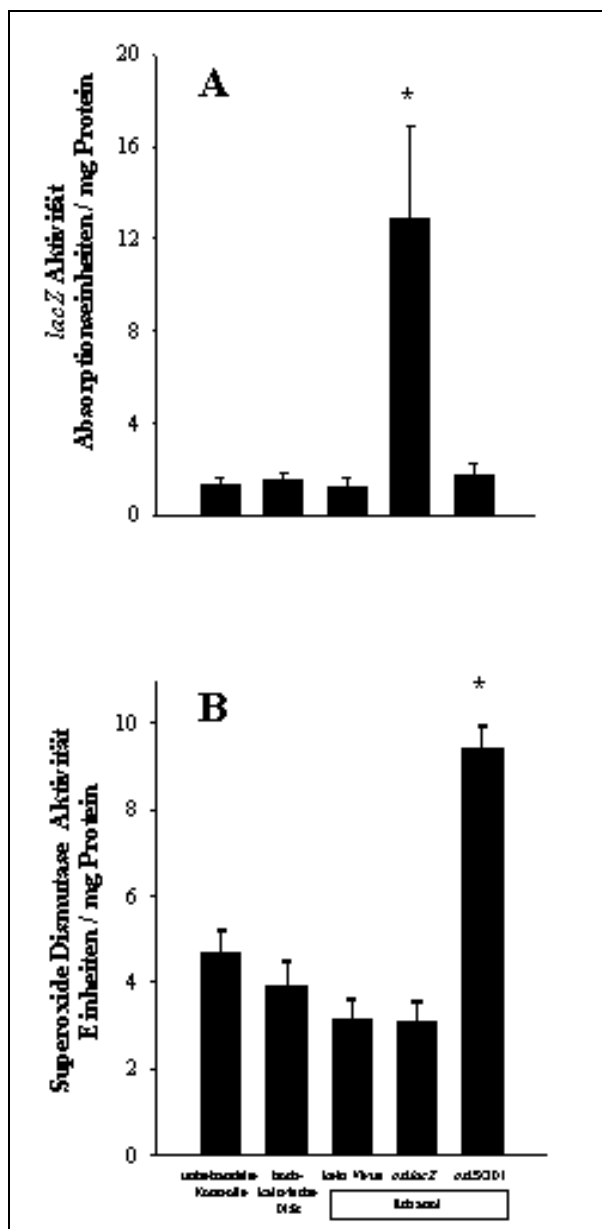


Abb. 12: Einfluß der Spenderorgan Transfektion mit Ad.lacZ und Ad.SOD1 auf die β -Galaktosidase (A) und die Superoxiddismutaseaktivität (B). Die β -Galaktosidase-Aktivität im Lebergewebe wurde durch die Quantifizierung der Bildung von O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid spektrophotometrisch bei 420 nm bestimmt (Abb.12A). Die Werte sind auf das Gesamtprotein bezogen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (*: $p < 0.001$ Ad.lacZ im Vergleich zu allen anderen Gruppen, mittels zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test ermittelt, $n = 6$ pro Gruppe). Superoxiddismutase-Aktivität wurde in homogenisiertem Lebergewebe bestimmt, indem die Reduktion von Ferricytochrom C durch Superoxid, welches durch die Xanthin/Xanthinoxidase-Reaktion gebildet wurde, quantifiziert wurde (Abb.12B). Die Absorption von Cytochrom C wurde spektrophotometrisch bei 550 nm bestimmt. Daraus ergab sich dann die SOD Aktivität, welche basierend auf einer Standardkurve, die zuvor mittels reiner, boviner Erythrozyten-

Superoxiddismutase erstellt worden war, ermittelt wurde. Auch hier sind die Werte als MW \pm SEM angegeben (* $p < 0.001$ Ad.SOD1 im Vergleich zu jeder anderen Gruppe, durch zwei-Wege ANOVA verbunden mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test, $n=6$ pro Gruppe).

3.3.2 Kann die SOD Überexpression das primäre Organversagen von Fettlebern verhindern – was sind die Mechanismen?

Überleben

Nachdem der protektive Effekt des Gentransfers von SOD in die gesunde Spenderlebern in vivo bewiesen werden konnte und somit das Konzept der Überexpression eines Radikalfängers einen therapeutischen Nutzen erbringen kann, stellt sich nun die Frage, ob mit dieser Methode auch ein massiv verfettetes Organ vor dem hochwahrscheinlichen Transplantatversagen bewahrt werden kann. Hierzu bietet sich als entscheidender Test wieder das Überleben nach Lebertransplantation an. Als primäres Überleben nach erfolgter Lebertransplantation wurde eine Überlebenszeit von 7 Tagen definiert, um jeglichen Einfluß von möglichen Rejektionsvorgängen auszuschließen. Außerdem stellt sich das primäre Organversagen innerhalb von einer Woche nach Reperfusion ein. Die Ratten der verschiedenen Gruppen wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und in dieser Reihenfolge transplantiert, um einen potentiellen Einfluß der chirurgischen Übung auf das Ergebnis im Verlauf des Versuches zu vermeiden. Da sich im Vergleich zu der vorangegangenen Studie die Übung in der Lebertransplantation deutlich intensiviert hatte, konnte bei allen Empfängern gesunder Transplantate ein Überleben von 100% erreicht werden. In der Gruppe der Empfänger von mittelgradig verfetteten Lebern, was durch eine hochkalorische Diät erreicht wurde und im Folgenden als *hochkalorische* Gruppe bezeichnet wird, zeigte sich eine Überlebensquote von 50%. Fast alle Empfänger von hochgradig verfetteten Organen, was durch die Ernährung mit der Ethanol-haltigen Diät erreicht wurde und im Folgenden als *Ethanol*-Gruppe bezeichnet wird, überlebten nicht mit Ausnahme der Gruppe der Überexpression von Cu/Zn-SOD. Im Gegensatz dazu überlebten alle Empfänger

von Ad.SOD1-infizierten, hochgradig verfetteten Organen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt. Folglich kann der deletäre Ausgang der Implantation von marginalen, hochgradig verfetteten Lebern durch die Überexpression von Cu/Zn-SOD komplett verhindert werden.

Nachdem diese herausragenden Ergebnisse erzielt wurden, mußte nun die Frage der dem Erfolg zugrunde liegenden Mechanismen eruiert werden. Hierzu wurden zunächst die zellulären Schäden quantifiziert.

Lebertransaminasen

Die Lebertransaminasen GOT (AST) und GPT (ALT) im Serum sind ein gut geeigneter Indikator für den hepatozellulären Schaden und erreichen ihr Maximum etwa 8 h nach Reperfusion. Unter den hier genannten Bedingungen konnten in den Empfängern von hochgradigen Fettlebern ohne Cu/Zn-SOD Überexpression für AST hohe Werte von 2350 bis zu 3000 U/l 8 h nach Reperfusion ermittelt werden. Identisch ließen sich für ALT Werte von 1600 bis zu 2100 U/l in den Gruppen Ethanol-Diät ohne und mit *Ad.lacZ* ermitteln. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Empfängern von SOD-überexprimierenden Organen nur ein verminderter postoperativer Anstieg der Transaminasen von etwa 30% der Werte bei den Kontrollen & Ethanol-Diät oder den *Ad.lacZ*-infizierten Tieren & Ethanol-Diät und diese Werte entsprachen etwa den gesunden, transplantierten Lebern. Die Werte sind im Detail in der Tabelle 1 aufgeführt. Folglich kann zusammengefaßt werden, dass der in den Fettlebern eingesetzte adenovirale Gentransfer von Cu/Zn-SOD den von der massiven Verfettung verursachten, im Vergleich zu den gesunden Transplantaten zusätzlichen parenchymatösen Schaden rückgängig macht bzw. verhindert.

Histologie

Die ausgezeichnete Protektion von Cu/Zn-SOD Überexpression läßt sich sicherlich auch histologisch dokumentieren, was nun im Folgenden durchgeführt wurde. An H&E gefärbten Gewebeschnitten wurden Nekroseraten und die apoptotischen Zellen morphometrisch

ausgewertet. Dabei zeigt sich, dass die protektive SOD Therapie die Nekroserate von etwa 35% auf unter 10% reduziert und auch die Anzahl der apoptotischen Zellen halbiert. Auf die Verfettung der Leber hat der adenovirale Gentransfer erwartungsgemäß keinen Einfluß, die Ethanol-Gabe erstreckte sich über mehr als 4 Wochen. Die Apoptose wurde durch die morphologische Identifikation von geschrumpften oder fragmentierten Zellkernen ermittelt. Die SOD-Überexpression reduzierte die Apoptoserate um etwa 55%. Die genauen Zahlen sind aus der Tabelle 1 unten zu ersehen.

Tabelle 1: Parameter des Parenchymschadens von Fettlebern nach Transplantation:

	Unbehandelt	Hochkalor- ische Nahrung	Ethanol	Ethanol + <i>Ad.lacZ</i>	Ethanol + <i>Ad.SOD1</i>
AST (U/l)	705 ± 28.6	941 ± 146	2457 ± 198	2757 ± 243	833 ± 113 *
ALT (U/l)	418 ± 21.5	737 ± 126	1813 ± 189	1882 ± 205	636 ± 86 *
Überleben (%)	100 (10/10)	50 (7/14)	0 (0/10)	9 (1/11)	100 (10/10) *
Nekrose (%)	16.3 ± 1.4	21.5 ± 1.1	36.1 ± 1.4	34.4 ± 1.6	9.4 ± 1.1 *
Fettinfiltration (%)	3 ± 0.3	18 ± 4.1	38 ± 3.5	41 ± 5.1	39 ± 4.8
Apoptose (%)	7.2 ± 0.9	7.8 ± 1.0	10.6 ± 1.2 #	11.3 ± 0.8 #	5.5 ± 2.0 †

* p<0.05 im Vergleich mit der Ethanol und der Ethanol+*Ad.lacZ* Gruppe; # p< 0.05 im Vergleich mit hochkalorischer Ernährung; † p<0.05 im Vergleich mit der Ethanol+*Ad.lacZ* Gruppe

Hier wird der Einfluß der Infektion mit *Ad.SOD1* auf Serum Transaminasen, Überleben, Nekrose, Fettinfiltration und Apoptose auf Transplantatleber entnommen 8 h nach Transplantation beschrieben. Das Überleben wird aufgeführt in prozentuales Überleben und

in Klammern als überlebende Tiere / alle Tiere dieser Gruppe. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, berechnet durch zwei-Wege ANOVA verbunden mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test, n=6 pro Gruppe.

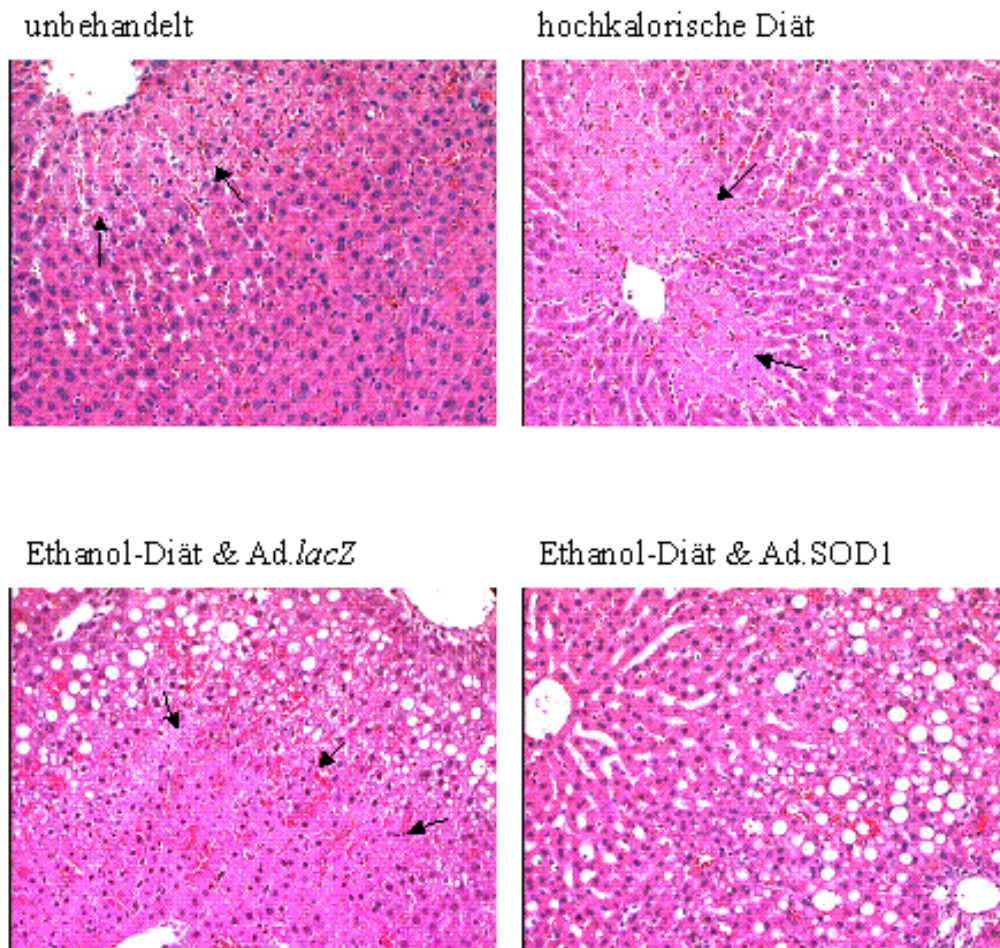


Abb. 13: Repräsentative histologische Untersuchungen an H & E Schnitten der explantierten Lebern 8 h nach Transplantation. Die Abbildung 13 zeigt repräsentative histologische Untersuchungen an H & E Schnitten der explantierten Lebern 8 h nach Transplantation. Besonderes Augenmerk ist auf die Nekroseareale zu richten, welche durch die Pfeile angezeigt werden. Erneut zeigen die Ad.SOD1 infizierten Organe trotz massivster Verfettung weitgehend keine zelluläre Nekrose. Die ursprüngliche Vergrößerung betrug 200x.

Freie Radikale – ESR

In einem weiteren Schritt sollten toxische, freie Radikale nachgewiesen werden und dabei die Schlüsselfrage beantwortet werden, ob denn durch die SOD-Überexpression in der Tat vermehrt freie Radikale intrazellulär abgebaut werden können bzw. sich entsprechend

vermindert nachweisen lassen. Diese Antwort kann erstmals eindeutig die Frage klären, ob tatsächlich die freien Radikale eine Schlüsselposition bei der Pathogenese des Ischämie/Reperfusionsschadens innehaben. Zur Analyse wurde die ElektronenSpinResonanzspektrometrie (ESR) verwendet, wie sie oben unter Materialien und Methoden ausführlich beschrieben wurde.

In der Galle der hochgradig verfetteten Lebern konnte 3 bis 5 Stunden nach Reperfusion ein typisches 6-Linien ESR Spektrum, welches von 4-POBN Radikaladdukten reuliert, aufgezeichnet werden. Die Computersimulation der Spektren ergab dann 2 verschiedene Radikalgruppen. Die eine Gruppe, welche etwa 60% des Spektrums ausmachte, entsprach nach Auswertung der Hyperfeinstruktur der Kohlenstoff-zentrierten Radikalen. Die andere Gruppe hingegen war den Sauerstoff-zentrierten Radikalen zuzuordnen. Die Ergebnisse zeigten, dass die hochgradige Verfettung der Leber zu einem massiven Anstieg der Radikalproduktion führt. Die Überexpression von SOD kann diese extensive Radikalfreisetzung verhindern, ja die nachgewiesenen Radikale waren in der Fettleber + Ad.SOD1 Gruppe sogar noch niedriger als bei den unbehandelten, gesunden transplantierten Spenderorganen. Somit ist die Hypothese bewiesen, dass der protektive Effekt der SOD-Überexpression auf einem gesteigerten Abbau der toxischen Sauerstoffradikale beruht. Weiterhin ergibt sich die Schlußfolgerung, dass toxische Sauerstoffradikale eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese des Reperfusionsschadens einnehmen. Die Spektren sind auf der folgenden Seite in der Abbildung 14 zu erkennen.

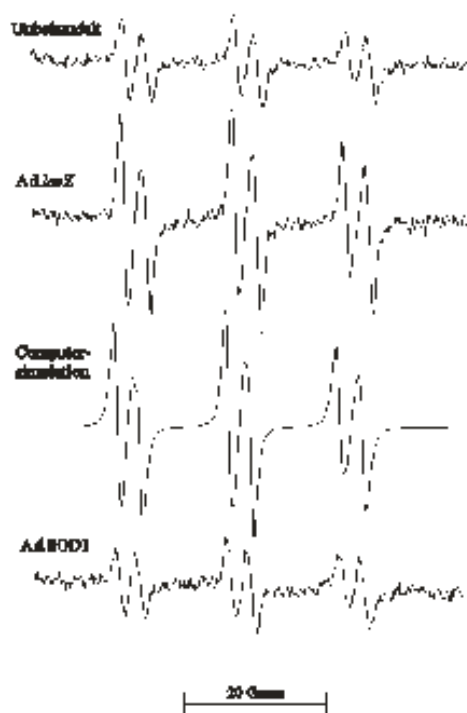


Abb. 14: Einfluß des Cu/Zn-SOD Gentransfers auf die Bildung freier Radikale. Das Spin Trapping Reagenz α -(2,2'-Dipyridyl 1-Oxid)-N-*tert*-butylnitron (4-POBN; 1g/kg in isotoner NaCl-Lsg.) wurde 3 h nach Transplantation langsam über einen zentralvenösen Katheter injiziert. Galle wurde über 90 min in einem Gefäß gesammelt. Freie Radikaladdukte wurden im ESR Spektrometer identifiziert. Typische Signale sind hier abgebildet. Unbehandelt: gesunde Leber; Ad.*lacZ* & Ad.SOD1: Fettleber.

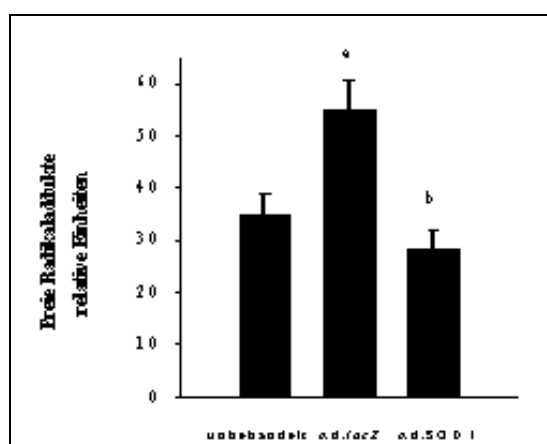


Abb. 15: Die Intensität des ESR Signals wurde unter jeweils identischen Voraussetzungen gemessen und als relative Einheiten dargestellt. Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben, berechnet durch zwei-Wege ANOVA verbunden mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test, $n=6$ pro Gruppe. **a** $p<0.05$ im Vergleich mit der unbehandelten und der Ethanol+Ad.SOD1 Gruppe; **b** $p<0.05$ im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe. Unbehandelt: gesunde Leber; Ad.*lacZ* & Ad.SOD1: Fettleber.

NF- κ B electrophoretic mobility shift assay

Die Aktivität von NF- κ B wurde in nukleären Extrakten von Leberhomogenat, welches 60 min nach Reperfusion gewonnen wurde, bestimmt. In fast allen untersuchten Gruppen zeigten sich intensive Banden, welche NF- κ B darstellten. Ausschließlich im Homogenat von Ad.SOD1-infiziertem Gewebe konnte man nur eine schwache Bande entsprechend geringer Aktivität nachweisen. Die Spezifität der Proteinbindung der nukleären Extrakte an die Oligonukleotide wurde mit Hilfe der Darstellung der aktiven p50/p65 Formen von NF- κ B im Gel Shift Assay dargestellt. Im Gegensatz dazu war die DNA Bindungsaktivität deutlich geringer in Gewebe, welches zuvor mit Ad.SOD1 infiziert worden war (Abbildung 16, siehe unten). Dies ist als eindeutiger Nachweis dafür zu werten, dass Ad.SOD1-Transfektion zu einer deutlich erniedrigten Aktivierung von NF- κ B in diesem Modell führt.

Jun-N-terminale Kinase, I κ B Kinase und p38 Aktivität

Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38 gehören der Familie der MAPK Kinase Gruppe der signalgebenden Kinasen an und sind entscheidend an der Vermittlung von Entzündungsreaktionen beteiligt. Hepatische p38 Kinase war in keiner transplantierten Leber aktiviert (Daten sind nicht aufgeführt). Im Gegensatz dazu war JNK in allen transplantierten Lebern hochreguliert, jedoch nicht in den Schein-operierten Tieren, welche keiner Lebertransplantation unterzogen wurden. Eine entscheidende Ausnahme zeigte sich wieder in Bezug auf die JNK-Aktivität, diese war in Ad.SOD1-infizierten Fettlebertransplantaten fast nicht detektierbar (Abbildung 16, siehe unten). Die Ethanolgabe selbst veränderte die Kinase-Aktivitäten im Vergleich zu unbehandelten Lebern nicht (Abbildung 16, siehe unten). Überraschenderweise wurde die IKK Kinase (I κ B Kinase) durch die Ad.SOD1-Injektion nicht beeinflusst und überhaupt waren die Aktivitäten der IKK in transplantierten Tieren nur geringfügig über denen von Schein-operierten Tieren (Abbildung 16, siehe unten).

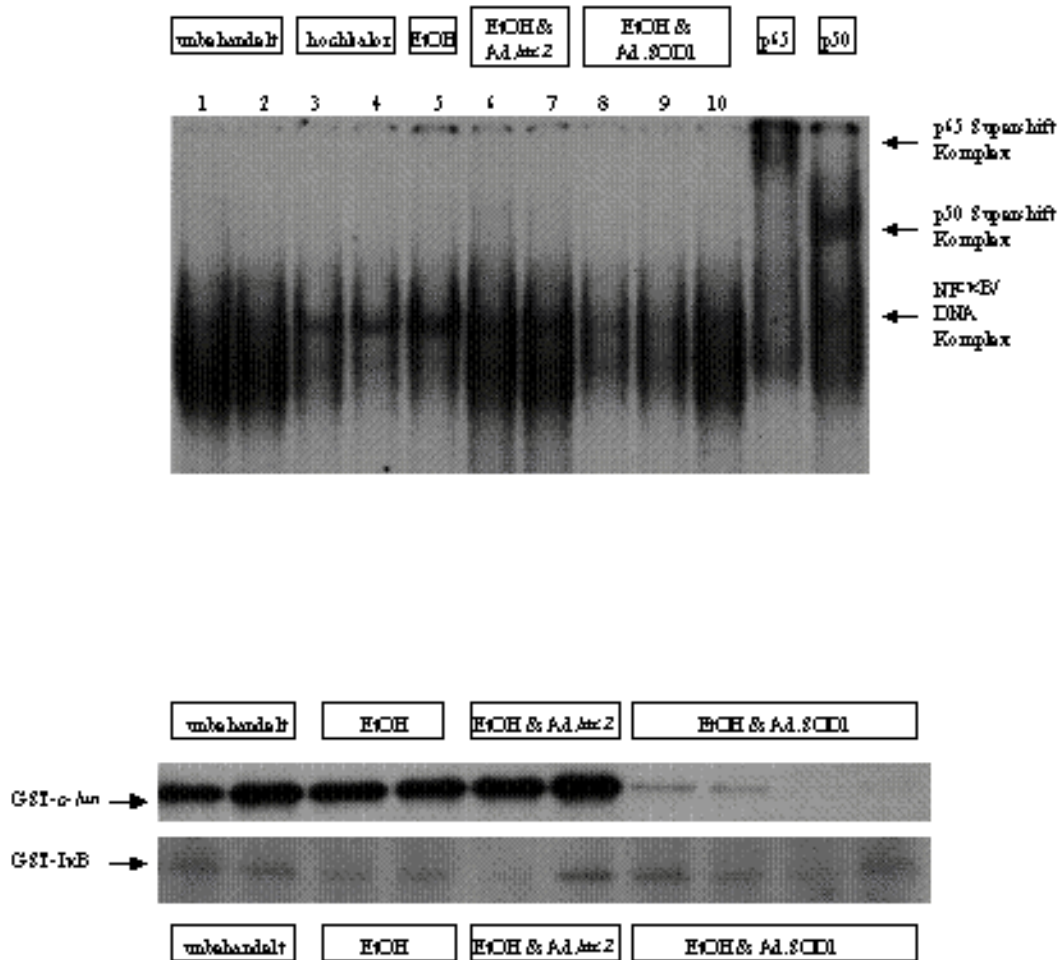


Abb. 16: Der Einfluß der Ad.SOD1-Infektion auf die Aktivitäten von NF-κB und der Kinasen. Die Lebern wurden 1 h nach Transplantation entnommen. Nukleäre Extrakte der Leber wurden mit ^{32}P -markierten Doppelstrang-Oligonukleotiden inkubiert, welche spezifisch für κB Muster waren, um die NF-κB DNA Bindungsaktivität darzustellen. Die Supershift Experimente mit Antiseren gegen die p50 und p65 Proteine wurden an Lebergewebe der Ethanol & Ad.lacZ-Gruppe durchgeführt, um die Spezifität der aktiven Form von NF-κB darzustellen. Die Positionen der nativen und Supershift NF-κB/DNA-Komplexe sind markiert. Rekombinantes GST-c-jun wurde ebenso mit Zellextrakten von Lebern, welche 1 h nach Transplantation entnommen wurden, inkubiert. Die JNK-vermittelte Phosphorylierung von GST-c-jun wurde durch die Inkorporation von ^{32}P -ATP und daran anschließender Elektrophorese und Autoradiographie dargestellt, wie es in Materialien und Methoden beschrieben ist. Die einfachen Banden repräsentieren GST-c-jun. Für die IKK Kinasereaktion wurde GST-IκB Substrat mit jeder Probe inkubiert. Die Abbildungen sind repräsentative Autoradiogramme.

3.4 Welche der drei verschiedenen Isoformen der Superoxiddismutase ist am effektivsten in der Protektion des Ischämie/Reperfusionsschadens?

Wie in der Einleitung bereits beschrieben existieren 3 verschiedene Isoformen der SOD, welche jeweils einem spezifischen Kompartiment der Zelle zugeordnet werden: Die Cu/Zn-SOD ist die zytosolische Isoform, die Mn-SOD ist die mitochondriale Isoform und die Ec-SOD ist die extrazelluläre Isoform, welche von Kupfferzellen gebildet und in den extrazellulären Raum abgegeben wird. Es ist bis zu dieser nun aufgeführten vergleichenden Untersuchung vollkommen unklar, welche Isoform am effektivsten den I/R-Schaden verhindern kann. Um diese Fragestellung zu klären, wurde folgende Versuchsplanung umgesetzt, wobei wieder Fettlebern induziert und als Transplantate benutzt wurden, um einen ausgeprägten Schaden zu erhalten:

Versuchs- Gruppen →	unbeh andelt	Ethanol (EtOH)	EtOH & Ad.lacZ	EtOH & Ad.SOD1	EtOH & Ad.SOD2	EtOH & Ad.SOD3
Untersuch- ungsthema ↓						
SOD Aktivität in der Leber	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
SOD Aktivität im Serum	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
AST	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
ALT	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Nekrose	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Apoptose	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Überleben	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Histologie	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
NF-κB	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
IκB Kinase	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
TNF-α	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

In dieser Versuchsreihe wurde nun statt dem chronischen Ethanol-Modell nach Lieber-DiCarli, welche zu einer grobtropfigen Leberverfettung führt, ein sogenanntes akutes Verfettungsmodell eingesetzt:

Akute Leberverfettung - „Binge“-Modell:

Exzessiver Alkoholgenuß in kurzer Zeit führt zu einer akuten Leberverfettung. Dies gilt auch für gesunde Lebern. Insbesondere in den USA aber auch in europäischen Ländern „rekrutiert“ sich ein nicht geringer Anteil an Organspendern aus Unfallopfern, welche im alkoholisierten Zustand verunglücken. Die Lebern dieser hirntoten Organspender weisen eine feintropfige Leberverfettung auf. Diese Form der Verfettung ist reversibel. Im akuten Zustand gelten auch diese Lebern als marginal, sie zeigen einen ausgeprägten Reperfusionsschaden nach Lebertransplantation auf. Im Tiermodell bei der Ratte kann man den kurzzeitigen, exzessiven Alkoholgenuß durch eine intragastrale Verabreichung von einer Alkohollösung simulieren. Dabei wird mit einer Knopfkanüle der Ösophagus intubiert und die Kanüle in den Magen vorgeschoben. Sodann wird die definierte Menge an Alkohollösung injiziert. Verschiedene Rattenstämme weisen ein unterschiedliches Verhalten bzw. Abbau von Alkohol auf. In den in

dieser Arbeit beschriebenen Experimenten mit Sprague-Dawley Ratten war die subletale Dosis von 7 g/kg Körpergewicht notwendig, um eine ausgeprägte und in allen Tieren konstante Verfettung zu erreichen. Man kann maximal eine 20%ige Lösung in 0.9% NaCl verabreichen. Mit dieser Technik erhält man einen Verfettungsgrad von etwa 25-30% des Parenchymvolumens. Die maximale Verfettung läßt sich etwa 20-24 h nach Alkoholaufnahme nachweisen, in den hier aufgeführten Experimenten wurden die Organe 20 h nach Alkoholinjektion explantiert. 72 h vor Aloholverabreichung wurde den Tieren das jeweilige Adenoviruskonstrukt bzw. Ringerlösung injeziert. In allen Tieren war der Grad der Verfettung weitgehend identisch, insbesondere bei SOD-überexprimierenden Tieren ergab sich keine signifikante Veränderung. Die Empfängertiere erhielten keinen Alkohol.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe im Einzelnen:

3.4.1 Die SOD Aktivität in verschiedenen Kompartimenten:

β -Galaktosidase

Vor der Untersuchung der SOD-Aktivitäten wurde zunächst wieder die Spezifität und Effektivität des adenoviralen Gentransfers in die Lebern, welche 72 h nach adenoviraler Injektion der akuten Alkoholintoxikation unterzogen wurden, nach erfolgter Lebertransplantation mit Hilfe des Markerenzymes β -Galaktosidase untersucht. Wie es bereits aus den Voruntersuchungen bekannt war, gab es auch in diesem Versuch keine Überraschungen, ausschließlich diejenigen Lebern zeigten eine deutliche Aktivität des Markerenzymes, welche zuvor mit Ad.*lacZ* transfiziert worden waren,

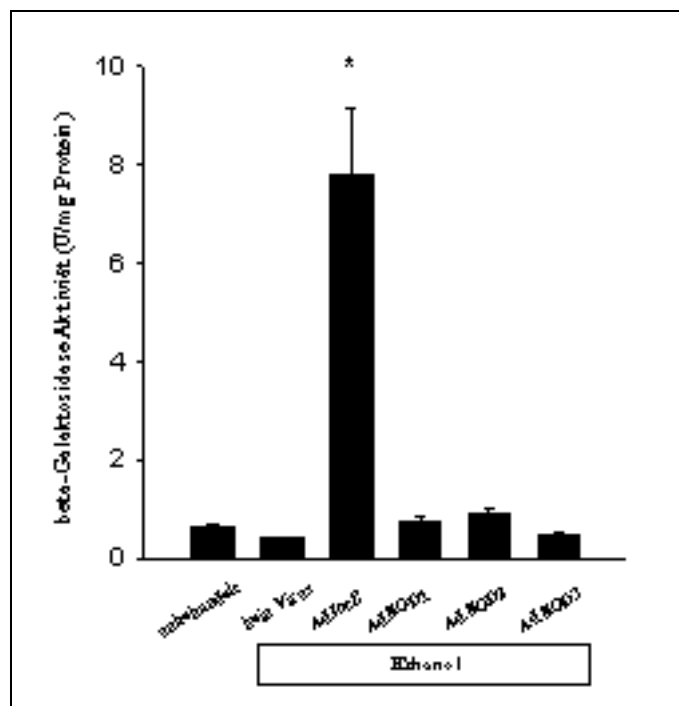


Abb. 17: Einfluß der Spenderorgan Transfektion mit Ad.lacZ auf die Enzymaktivität. Die β -Galaktosidase-Aktivität im Lebergewebe wurde durch die Quantifizierung der Bildung von O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid spektrophotometrisch bei 420 nm bestimmt. Die Werte sind auf das Gesamtprotein bezogen. Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM angegeben (*: $p < 0.001$ Ad.lacZ im Vergleich zu allen anderen Gruppen, mittels zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test ermittelt, $n = 6$ pro Gruppe).

Superoxiddismutase

Im nächsten Schritt wurde die Effektivität des Gentransfers hinsichtlich des Zielproteins SOD untersucht. Da sowohl 2 Isoformen der intrazellulären SOD, als auch die extrazelluläre SOD-Isoform miteinander verglichen wurden, stand zunächst die Frage der Proteinkonzentration und –aktivität intrazellulär im Homogenat zur Klärung an.

Die erhaltenen Ergebnisse (siehe Abbildung 18 nächste Seite) waren hochinteressant:

1. Die Alkoholadministration führt zu einer Reduktion der SOD-Aktivität intrazellulär, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.
2. Die Aktivität der Cu/Zn-SOD ist intrazellulär höher als die der Mn-SOD, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

3. Die Transfektion mit Ad.SOD3 führt nicht zu einer signifikanten Steigerung der SOD-Aktivität intrazellulär.

Um eine Aussage hinsichtlich der Effektivität der Transfektion mit Ad.SOD3 zu erhalten, wurde die SOD Aktivität auch im Serum der Organspender direkt vor der Organentnahme untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Überexpression von extrazellulärer SOD in der Tat vorhanden ist und gut funktioniert, denn sie war in den Ad.SOD3 infizierten Tieren gegenüber den nicht transfizierten Ratten um ca. 60% gesteigert und nur minimal in den Ad.SOD1 oder Ad.SOD2 Tieren erhöht (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu war die SOD Aktivität im Serum der Empfängertiere 8 h nach Reperfusion in allen Gruppen weitgehend identisch (diese Daten sind nicht abgebildet). Die beschriebenen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der adenovirale Gentransfer von Cu/Zn-SOD und Mn-SOD zu einer deutlichen Expression von funktionierenden Enzymen intrazellulär führt. Darüber hinaus wird nur die extrazelluläre Isoform in das Blut sezerniert.

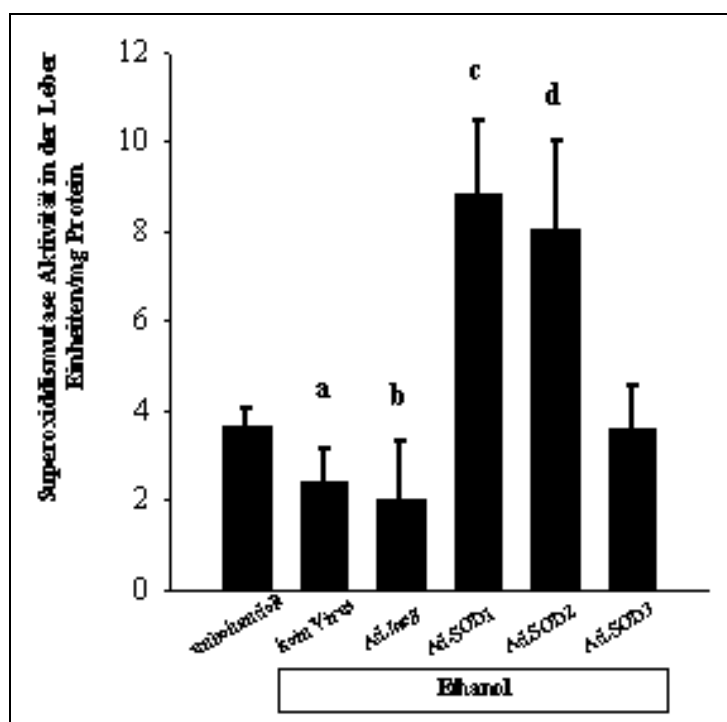


Abb. 18: Einfluß der Organtransfektion mit Ad.SOD1/2/3 auf die Enzymaktivität in der Leber. Die SOD Aktivität wurde im Leberhomogenat der 8 h nach erfolgter LTx in den Empfängern gewonnenen Lebern durch die Quantifizierung der Inhibition der Superoxidproduktion, welche durch die Xanthin/Xanthin-Oxidase-Reaktion generiert worden war, bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben; $n=6$ pro Gruppe. Die Signifikanzen: **a:** $p<0.001$ mittels Fisher's Exakttest, die EtOH-kein Virus Gruppe vergleichend mit der Ad.SOD1 und Ad.SOD2 Gruppe; **b:** $p<0.001$ die Ad.lacZ Gruppe vergleichend mit der Ad.SOD1 Gruppe und der Ad.SOD2 Gruppe; **c:** $p<0.001$ die Ad.SOD1 Gruppe vergleichend mit der unbehandelten und der Ad.SOD3 Gruppe; **d:** $p<0.001$ die Ad.SOD2 Gruppe vergleichend mit der Ad.SOD3 Gruppe und der unbehandelten Gruppe. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede beim Vergleich der EtOH-kein Virus Gruppe mit der Ad.lacZ Gruppe oder mit der Ad.SOD3 Gruppe oder mit der unbehandelten Gruppe. Es konnte ebenso kein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich der Ad.SOD1 Gruppe mit der Ad.SOD2 Gruppe ermittelt werden.

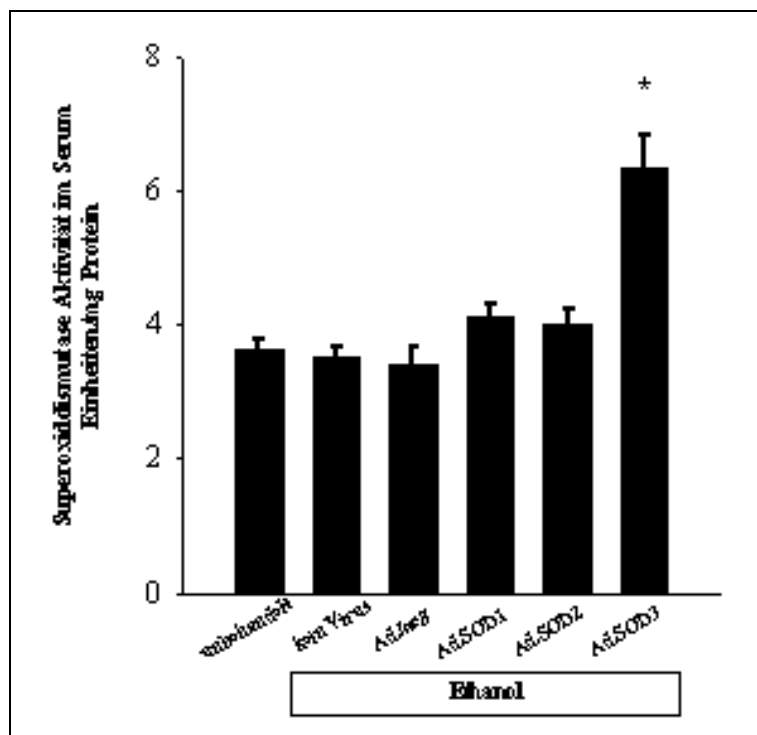


Abb. 19: Einfluß der Organtransfektion mit Ad.SOD1/2/3 auf die Enzymaktivität im Serum der Spendertiere vor Organentnahme: Die SOD Aktivität wurde 72 h nach Transfektion in den Spendern vor Organentnahme in identischer Weise wie oben beschrieben im Serum bestimmt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben (* $p < 0.001$ mittels zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test ermittelt für den Vergleich der Ad.SOD3-Gruppe mit der Ad.SOD1-Gruppe, $n = 6$ pro Gruppe). Der Unterschied zwischen Ad.SOD1 und den anderen 4 Gruppen war statistisch nicht signifikant, ermittelt mittels zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test, $n = 6$ pro Gruppe.

3.4.2 Der Einfluß der 3 verschiedenen SOD-Isoformen auf den I/R-Schaden:

Zur Beurteilung der Effektivität dieser 3 verschiedenen Isoformen hinsichtlich der Verminderung des I/R-Schadens wurden das Überleben der Empfänger, die Histologie und die Kinase-Aktivitäten wie auch TNF- α herangezogen. Die Untersuchungen und Daten im Einzelnen:

Überleben

Die Ratten, also Spender verschiedenen Gruppen, wurden in der Reihenfolge der zu operierenden Tiere nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und der Transplantation unterzogen, um jeglichen Effekt der mit jedem Eingriff zunehmenden chirurgischen Routine über den

gesamten Zeitraum zu verhindern. Das Überleben war als Überleben von mindestens 7 Tagen nach Transplantation definiert. Alle Empfänger von gesunden, unbehandelten Lebern überlebten, jedoch nur 50% von den Empfängern von Lebern, welche durch Ethanol eine Leberverfettung erlitten hatten und entweder nicht infiziert waren, oder aber mit *Ad.lacZ* oder *Ad.SOD3* infiziert worden waren. Etwa 75% aller Empfänger von Fettlebern, welche Mn-SOD überexprimierten, überlebten. Im Gegensatz dazu überlebten alle Empfänger von Organen, welche Cu/Zn-SOD überexprimierten (siehe Abbildung 20). Folglich hat in vivo die Überexpression von ec-SOD keinerlei protektiven Effekt im Rahmen der Lebertransplantation. Jedoch kann das fatale Ergebnis der Transplantation von marginalen Fettlebern durch die Überexpression von Cu/Zn-SOD komplett verhindert werden. Auch die Überexpression der mitochondrialen Isoform von SOD erhöht die Überlebensrate nach Transplantation von Fettlebern, jedoch ist dieser Ansatz nicht so effektiv wie der der Überexpression der zytosolischen Isoform. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 graphisch dargestellt.

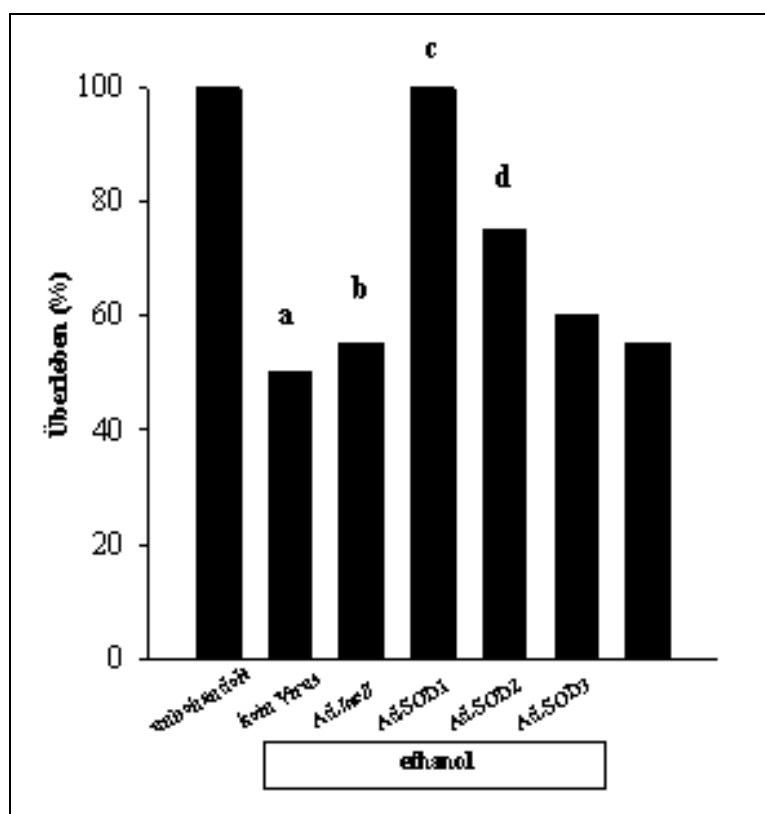


Abb. 20: Einfluß des Gentransfers mit Ad.SOD1/2/3 auf das Überleben nach Lebertransplantation. Den Organspendern wurde 72 h vor Organentnahme Ad.SOD1, oder Ad.SOD2, oder Ad.SOD3, oder Ad.lacZ oder aber Ringer'sche Lösung (unbehandelte Gruppe) intravenös injiziert. Die Organe wurden für 24 h in UW Lösung bei 1-4°C gelagert und dann die Transplantation einschließlich Rearterialisierung durchgeführt. Das Überleben wurde als ein Überleben von mindestens 7 Tagen nach Operation definiert. Als Überlebende ergaben sich 12 von 12 Ratten in der unbehandelten Gruppe, 8 von 16 Ratten überlebten in der Gruppe Fettlebern ohne Virus, 9 von 16 Empfänger überlebten in der Ethanol-Ad.lacZ Gruppe, 16 von 16 Ratten überlebten in der Ethanol-Ad.SOD1 Gruppe, 12 von 16 Tiere überlebten in der Ethanol-Ad.SOD2 Gruppe und 9 von 16 Ratten überlebten in der Ethanol-Ad.SOD3 Gruppe. (a: $p < 0.001$ durch Fisher's Exakttest, die Ethanol-kein Virus Gruppe verglichen mit der Ad.SOD1 Gruppe sowie mit der Ad.SOD2 Gruppe und der unbehandelten Gruppe; b: $p < 0.001$ für die Ethanol-Ad.lacZ Gruppe verglichen mit der Ad.SOD1 Gruppe sowie mit der unbehandelten Gruppe und der Ad.SOD2 Gruppe; c: $p < 0.001$ für die Ethanol-Ad.SOD1 Gruppe verglichen mit der Ad.SOD2 Gruppe, sowie mit der Ad.SOD3 Gruppe; d: $p < 0.001$ für den Vergleich der Ethanol-Ad.SOD2 Gruppe mit der Ethanol-Ad.SOD3 Gruppe. Es konnte keinerlei statistische Signifikanz für den Vergleich der Ethanol-kein Virus Gruppe mit der Ethanol-Ad.lacZ Gruppe oder mit der Ethanol-Ad.SOD3 Gruppe ermittelt werden).

Lebertransaminasen und Histologie

Die Lebertransaminasen wurden wieder als Standardparameter zur Erfassung des hepatozellulären Schadens 8 h nach Reperfusion (im Allgemeinen dem Punktum maximum des Spiegelverlaufes) im Serum gemessen. Zu diesem Zeitpunkt betragen die durchschnittlichen Werte für ALT 762 ± 72 U/l in der unbehandelten Gruppe und etwa 1800 U/l bei den Empfängern von Fettlebern, unabhängig davon ob sie ohne Virus, oder mit *Ad.lacZ* oder *Ad.SOD3* infiziert worden waren. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Empfängern von SOD überexprimierenden Fettlebern deutlich niedrigere ALT-Werte, nämlich 454 ± 52 U/l (*Ad.SOD1*) beziehungsweise 965 ± 115 U/l (*Ad.SOD2*). Die Bestimmungen der AST ergaben spiegelbildliche Ergebnisse für die jeweiligen Gruppen (die Daten sind in der Tabelle 2 unten aufgeführt). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Cu/Zn-SOD im Vergleich zu Mn-SOD das wesentlich effektivere Enzym hinsichtlich der Minimierung des I/R-Schadens nach Lebertransplantation ist.

Etwa 15% aller Hepatozyten von unbehandelten Lebern waren 8 h nach Reperfusion nekrotisch (siehe Tabelle 2 und Abbildung 21). Bei den Fettlebern erhöhte sich diese Nekroserate auf etwa 28%. Im Gegensatz dazu waren nur ca. 6% aller Hepatozyten bei den *Ad.SOD1* infizierten Fettlebern nekrotisch. Bei den *Ad.SOD2* infizierten Fettlebern zeigte sich eine Nekroserate von 14% und bei den Empfängern von *Ad.SOD3* infizierten Fettlebern ergab sich keine protektive Wirkung, die Nekroserate betrug 27% (alle Daten sind in der Tabelle 2 aufgeführt). Apoptotische Zellen wurden, wie in Materialien & Methoden beschrieben, an Hand der kondensierten oder fragmentierten Zellkerne morphometrisch bestimmt. In den unbehandelten Transplantaten konnte eine Apoptoserate von $5.9 \pm 0.9\%$ ermittelt werden. Jedoch zeigte sich in den Fettlebern ohne Virusinfektion, sowie mit *Ad.lacZ* oder *Ad.SOD3* Infektion eine Apoptoserate von etwa 10%. In den Lebern mit einer Cu/Zn-Überexpression war diese Rate um etwa 50% und in den Tieren mit Mn-SOD-Überexpression um etwa 30% reduziert (Tabelle 2).

Die Verfettung wurde durch die Überexpression der verschiedenen SOD Isoformen wie auch durch β -Galaktosidase nicht beeinträchtigt.

Tabelle 2: Einfluß des Gentransfers mittels Ad.SOD1/2/3 auf die Lebertransaminasen, das Überleben, Nekroserate, Verfettung und Apoptose in den Lebertransplantaten 8 h nach Reperfusion

	Unbehandelt	Ethanol kein Virus	Ethanol + Ad.lacZ	Ethanol + Ad.SOD1	Ethanol + Ad.SOD2	Ethanol + Ad.SOD3
AST (U/l)	1184 ± 152	4293 ± 456	4038 ± 439	857 ± 164 ^a	1899 ± 215 ^b	4526 ± 361
ALT (U/l)	762 ± 72	1604 ± 201	1843 ± 263	454 ± 52 ^a	965 ± 115 ^b	1855 ± 211
Nekrose (%)	15.3 ± 1.2	28.1 ± 1.1	26.6 ± 1.5	6.2 ± 0.9 ^a	14.2 ± 1.2 ^b	26.9 ± 1.6
Verfettung (%)	3 ± 0.3 ^c	28 ± 2.8	25 ± 3.1	26 ± 2.9	27 ± 3.2	25 ± 3.1
Apoptose (%)	5.9 ± 0.9 ^d	10.1 ± 0.9	9.5 ± 1.1	5.3 ± 0.8 ^a	7.1 ± 1.1 ^a	10.5 ± 1.4

a: $p < 0.05$ die entsprechende Versuchsgruppe verglichen mit der Ethanol + Ad.lacZ Gruppe, mit der Ethanol kein Virus Gruppe, sowie mit der Ethanol + Ad.SOD3 Gruppe; **b:** $p < 0.05$ die entsprechende Versuchsgruppe verglichen mit Ethanol kein Virus, Ethanol + Ad.lacZ, Ethanol + Ad.SOD1 und Ethanol + Ad.SOD3; **c:** $p < 0.05$ die entsprechende Versuchsgruppe verglichen mit allen anderen Versuchsgruppen mit Ethanolgabe; **d:** $p < 0.05$ die entsprechende Versuchsgruppe verglichen mit der Ethanol + Ad.lacZ Gruppe, mit der Ethanol kein Virus Gruppe, sowie mit der Ethanol + Ad.SOD3 Gruppe.

Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM beschrieben. Die Statistik wurde mittels zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test ermittelt, $n = 8$ pro Gruppe.

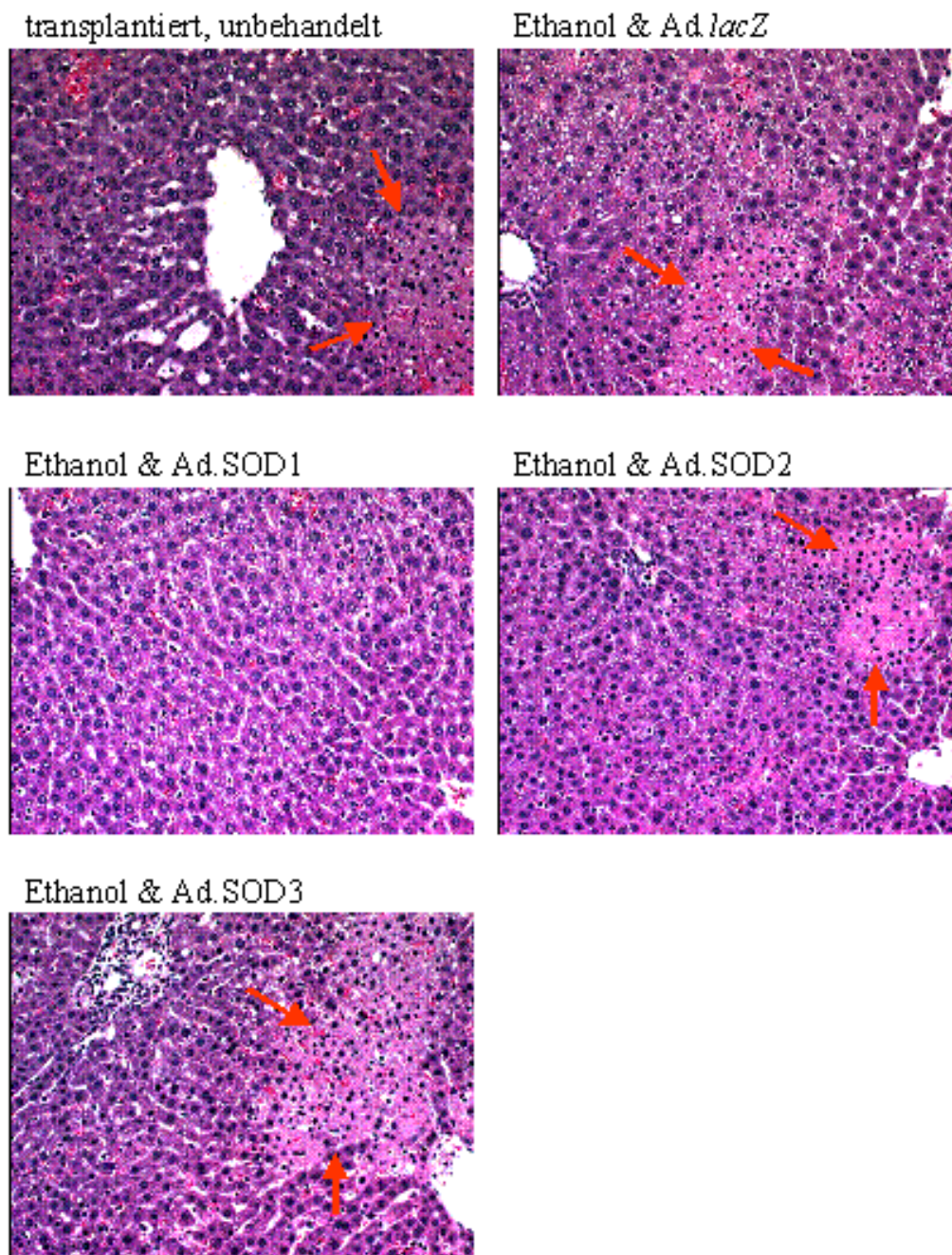


Abb. 21: Repräsentative histopathologische Analyse der Lebertransplantate 8h nach Reperfusion. Das Lebergewebe wurde für die lichtmikroskopische Untersuchung aufbereitet und die Gewebeschnitte mit Hematoxylin & Eosin angefärbt. Die roten Pfeile markieren nekrotische Areale. Ursprüngliche Vergrößerung 20X. Die Schnitte sind repräsentativ aus einer Anzahl von 8 Tieren pro Gruppe ausgewählt.

NF- κ B Electrophoretic Mobility Shift Assay

In den *Electrophoretic Mobility Shift Assays* konnten in fast allen untersuchten Leberproben deutliche Banden dargestellt werden, welche NF- κ B repräsentierten (Abbildung 22A). Die Spezifität der markierten Oligonukleotide wurde durch die aktiven p50/p65 Untereinheiten von NF- κ B im Gel Shift Assay verifiziert (Daten sind nicht abgebildet). Bei den Leberproben von der Ethanol-Ad.SOD1 Gruppe zeigte sich im Vergleich zu allen anderen Gruppen jedoch, dass die DNA Bindungsintensität deutlich geringer ausgefallen war, was speziell bei dem Gewebe dieser Gruppe auf eine deutlich erniedrigte Aktivität von NF- κ B hinwies. Darüber hinaus führte auch die Überexpression von Mn-SOD zu einer deutlich erniedrigten Aktivierung von NF- κ B, jedoch bei weitem nicht so ausgeprägt wie bei der Ad.SOD1-behandelten Gruppe. Im Vergleich mit den Fettlebern ohne Virus hatte die Transfektion mit Ad.SOD3 keinerlei Effekt auf die NF- κ B-Aktivierung.

Jun-N-terminale Kinase Aktivität

JNK war in allen transplantierten Lebern hochreguliert, erwartungsgemäß jedoch nicht in den Schein-operierten Tieren, welche keine Transplantation erfahren hatten. Überraschenderweise war auch bei den Cu/Zn-SOD überexprimierenden Lebern die JNK Aktivität deutlich vermindert. Ebenso war die JNK Aktivität in den Ad.SOD2 transfizierten Lebern erniedrigt, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei den Ad.SOD1 transfizierten Lebern und überhaupt nicht bei Ad.SOD3 transfizierten Organen (Abb. 22 A&B). Die Ethanol-Administration selbst hatte keinerlei Einfluß auf die Kinase Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Organen (Abb. 22 A&B). Überraschenderweise war die IKK Kinase Aktivität von keinerlei Organmanipulation oder Transfektion zu beeinflussen und in den transplantierten Lebern nur knapp über der Aktivität der Schein-operierten Tieren (Daten sind nicht abgebildet).

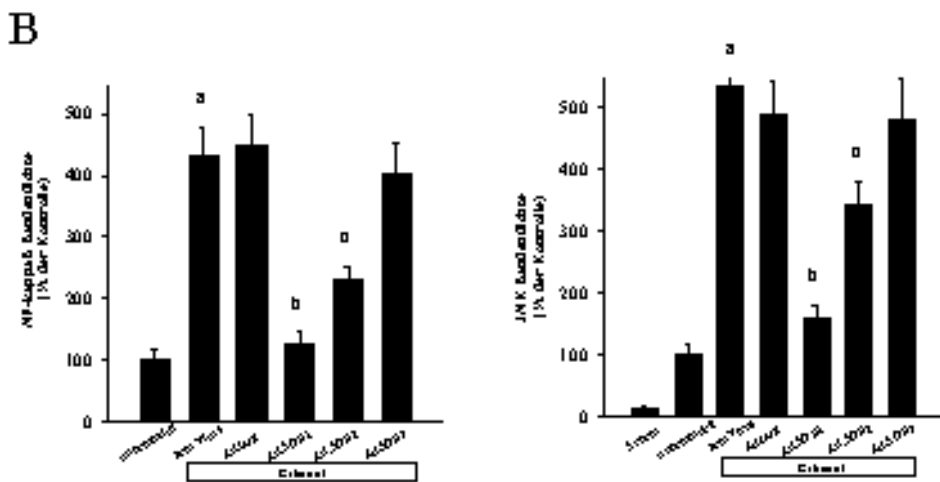
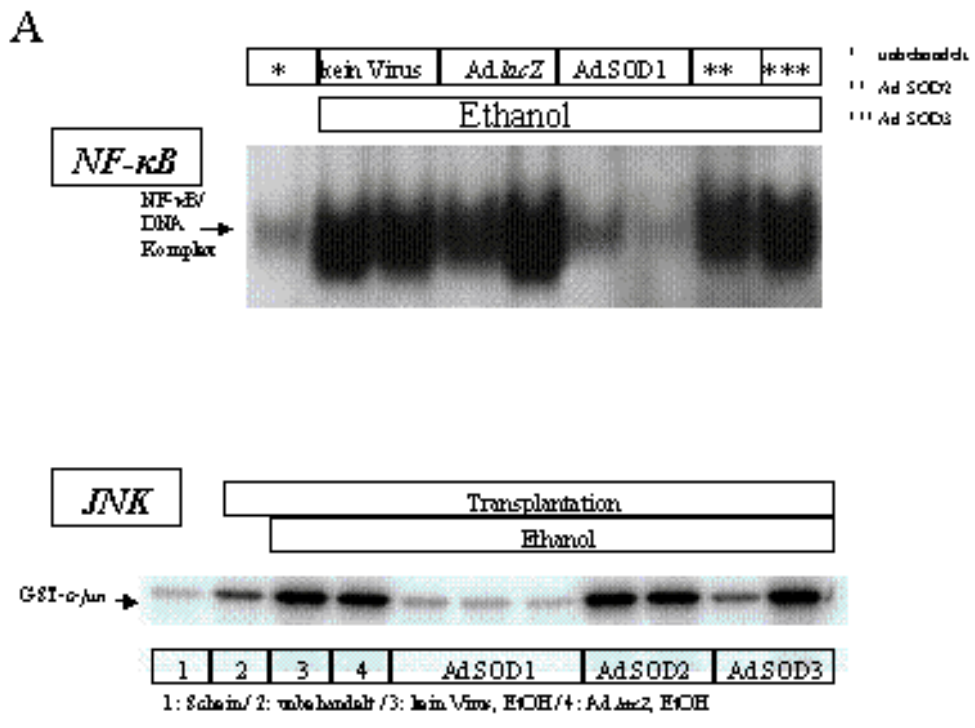


Abb. 22: Einfluß von Ad.SOD1/2/3 Transfektion auf die NF-κB und die JNK Kinase Aktivität. Hepatische Zellkernextrakte wurden mit ³²P-markierten, κB spezifischen Doppelstrangoligonukleotiden inkubiert, um die NF-κB DNA Bindungsaktivität darzustellen. Hier ist ein repräsentativer EMSA abgebildet (Abb.22A). Rekombinantes GST-c-jun wurde mit Zellextrakten inkubiert. Die JNK-vermittelte Phosphorylierung von GST-c-jun wurde durch die Inkorporation von ³²P-ATP dargestellt. Die einzelnen Banden repräsentieren GST-c-jun. Die in Abb.22B dargestellten Daten beruhen auf den densitometrischen Analysen der NF-κB und JNK Expression, dabei wurden die Werte der unbehandelten Gruppe als Bezugsgröße entsprechend 100% gesetzt. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM angegeben (n=6 pro Gruppe). (a: p<0.001 mittels Fisher's Exakttest, die Ethanol-kein Virus Gruppe verglichen mit der Ad.SOD1 Gruppe, der unbehandelten Gruppe und der Ad.SOD2

Gruppe. **b:** $p < 0.001$ Ad.SOD1 Gruppe verglichen mit den Ad.SOD2, Ad.SOD3 und Ad.lacZ Gruppen. **c:** $p < 0.001$ Ad.SOD2 Gruppe verglichen mit den Ad.SOD3, Ad.lacZ und unbehandelten Gruppen. Sonst ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.)

Tumor-Nekrose-Faktor α

Um festzustellen ob TNF α -mRNA Spiegel durch die Gentherapie mit der Transfektion von Ad.SOD1/2/3 beeinflusst werden, wurden die Veränderungen des Spiegels der mRNA mittels eines *RNA Protection Assays* im Lebergewebe bestimmt, welches 70 min nach Reperfusion gewonnen wurde. Dieser Zeitpunkt wurde ausgewählt, weil er wahrscheinlich den Gipfel der Aktivierung nach Lebertransplantation darstellt [188]. Die Transkriptionsprodukte konnten in fast allen Geweben klar dargestellt werden. Jedoch zeigte sich erneut eine wesentliche Ausnahme, der Gentransfer von Cu/Zn-SOD reduzierte die Expression von TNF α mRNA signifikant auf etwa 30% der Spiegel von Fettlebern ohne Gentransfer (Abbildung 23 und 24). Auch die Transfektion mit Ad.SOD2 führte zu einer Reduktion der TNF α mRNA, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Ad.SOD1, und diese Spiegel betragen etwa 55% derjenigen von Fettlebern ohne Gentransfer (Abbildung 23 und 24). Die Transfektion mit Ad.SOD3 hatte keinerlei Effekt auf die TNF α Aktivität verglichen mit Fettlebern ohne Gentransfer (Abbildung 23 und 24).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die 5. Fragestellung eindeutig beantwortet wurde, die zytosolische Isoform der SOD zeigte die am besten ausgeprägten protektiven Eigenschaften und ist in dieser Hinsicht der Mn-SOD überlegen. Außerdem konnte man feststellen, dass die Überexpression von extrazellulärer SOD im Spenderorgan keinerlei protektive Wirkung nach Lebertransplantation in diesem Modell bewirkt.

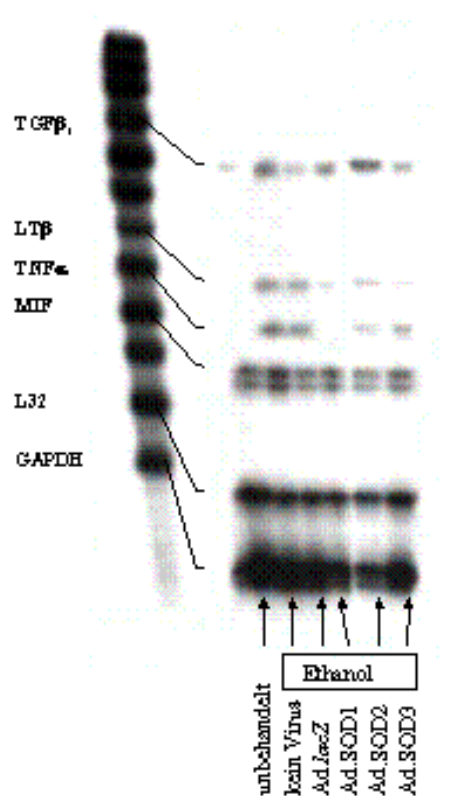


Abb. 23: Der Einfluß der Transfektion mit Ad.SOD1/2/3 auf die TNF α Aktivität. Gesamt RNA wurde aus dem Lebergewebe isoliert, welches 70 min nach Reperfusion gewonnen wurde. Das *Rnase Protection Assay* wurde sodann durchgeführt, wie es ausführlich in Materialien und Methoden beschrieben ist. ^{32}P -markierte *RNA probes* wurden mit T7 Polymerase transkribiert und die RNA wurde mit der Probe über 12 h hybridisiert. Die Proben wurden dann mittels Rnase inkubiert, sodann folgte Proteinkinase K Inkubation, Extraktion und Ethanol Präzipitation. Die Proben wurden dann in einem Acrylamid-bisacrylamid Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die darzustellenden Fragmente autoradiographisch dargestellt. Die Transkripte sind eindeutig erkennbar. Ein repräsentatives Gel ist hier abgebildet.

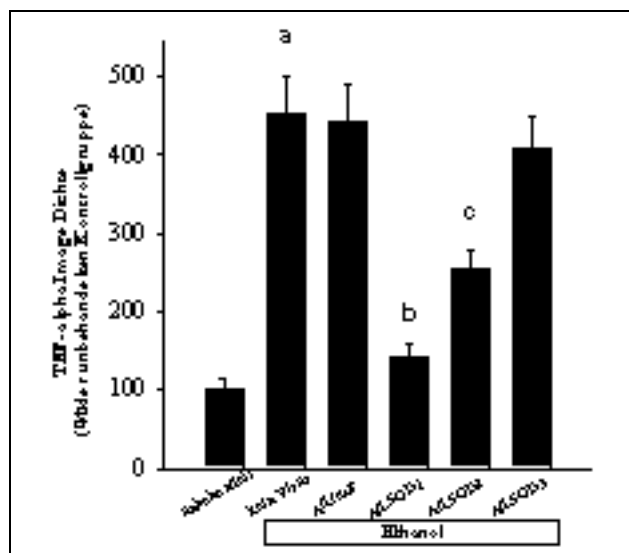


Abb. 24: Die hier abgebildeten Daten repräsentieren die densitometrische Analyse der TNF α Aktivität der einzelnen Experimente. Die Daten der unbehandelten Gruppe wurden als 100% definiert. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM dar, n=6 pro Gruppe, Signifikanzen wurden mittels Fisher's Exakttest ermittelt. **a:** $p < 0.001$ Ethanol-kein Virus Gruppe verglichen mit der Ad.SOD1, Ad.SOD2 und unbehandelten Gruppe. **b:** $p < 0.001$ Ad.SOD1 Gruppe vs. Ad.SOD2, Ad.SOD 3 und vs. Ad.lacZ Gruppe. **c:** $p < 0.001$ Ad.SOD2 Gruppe vs. Ad.SOD3, Ad.lacZ, und der unbehandelten Gruppe. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich der Ethanol-kein Virus Gruppe mit der Ad.lacZ und der Ad.SOD3 Gruppe sowie zwischen der Ad.lacZ und der Ad.SOD3 Gruppe.

3.5 Welchen Einfluß haben die Sauerstoffradikale auf das Schadensausmaß und das Regenerationsverhalten einer transplantierten Teilleber – protektive Therapie durch Ad.SOD1 ?

In der Fragestellung Nr. 6 wurde die Frage aufgeworfen, ob die Sauerstoffradikale, welche im Rahmen der Reperfusion nach Organtransplantation massiv freigesetzt werden, einen Einfluß auf das Regenerationsverhalten einer Größen-reduzierten Leber haben. Somit ergibt sich die Frage, ob man durch Reduktion des postischämischen Schadens die Zellteilung beschleunigen und somit die Phase der kritisch kleinen Lebermasse einer Split-Leber verkürzen kann? Darf

man auf Grund des minimierten Zellschadens in protektiv vorbehandelten Organen eine etwas kleinere Lebermasse transplantieren, als gewöhnlich als Minimum gefordert wird?

Um diese Fragen beantworten zu können, wurde ein Modell entwickelt, welches einer Split-Leber beim Menschen entspricht. Hierzu wurden wesentliche Leberlappen des Explantates bei der sogenannten Backtable-Präparation des Organes entfernt und der jeweilige Gefäßstiel des Leberlappens mit einer Ligatur unterbunden.

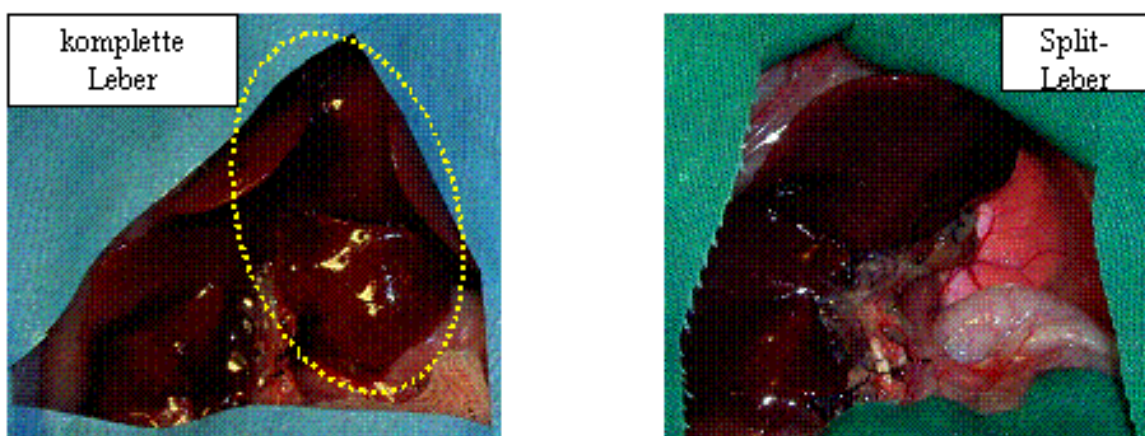


Abb. 25: Die Abbildungen zeigen die Organe nach Reperfusion. Links sind die zu resezierenden Anteile gelb markiert.

Für die Beantwortung der gestellten Fragen wurden mit den hier aufgeführten Versuchsgruppen folgende Untersuchungen durchgeführt:

	Schein- Operation	komplette Leber	Split-Leber Kein Virus	Split-Leber mit Ad.lacZ	Split-Leber mit Ad.SOD1
Größenreduktion in %			Ja	Ja	Ja
Relation			Ja	Ja	Ja

Körpergewicht Spender - Empfänger					
Relation Lebergewicht Spender - Empfänger			Ja	Ja	Ja
Expression β- Galaktosidase		Ja	Ja	Ja	Ja
Expression SOD		Ja	Ja	Ja	Ja
AST		Ja	Ja	Ja	Ja
ALT		Ja	Ja	Ja	Ja
Bilirubin im Serum		Ja	Ja	Ja	Ja
Histologie		Ja	Ja	Ja	Ja
Überleben		Ja	Ja	Ja	Ja
BrdU- Immunhistochemie	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Western Blot PCNA	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

Western Blot Cyclin D1	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Western Blot P21	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

3.5.1 **Einfluß der Größenreduktion auf Organschaden nach Transplantation einer**

Split-Leber und protektive Wirkung von Ad.SOD1:

Größen- und Gewichtsrelation

Um jegliche Ungleichmäßigkeiten bei der Größenreduktion und Gewichtsrelation zwischen Spender, Spenderleber, Empfänger und Empfängerleber zu vermeiden, welche dann eventuell zu einem falschen Ergebnis geführt hätten, wurden diese Parameter bei jedem Spender/Empfängerpaar gemessen und in Relation zueinander gesetzt. Durch die gezielte Auswahl weitgehend identischer Paare konnten annähernd identische Gruppen mit Größenreduzierten Organen erhalten werden (Abbildung 26).

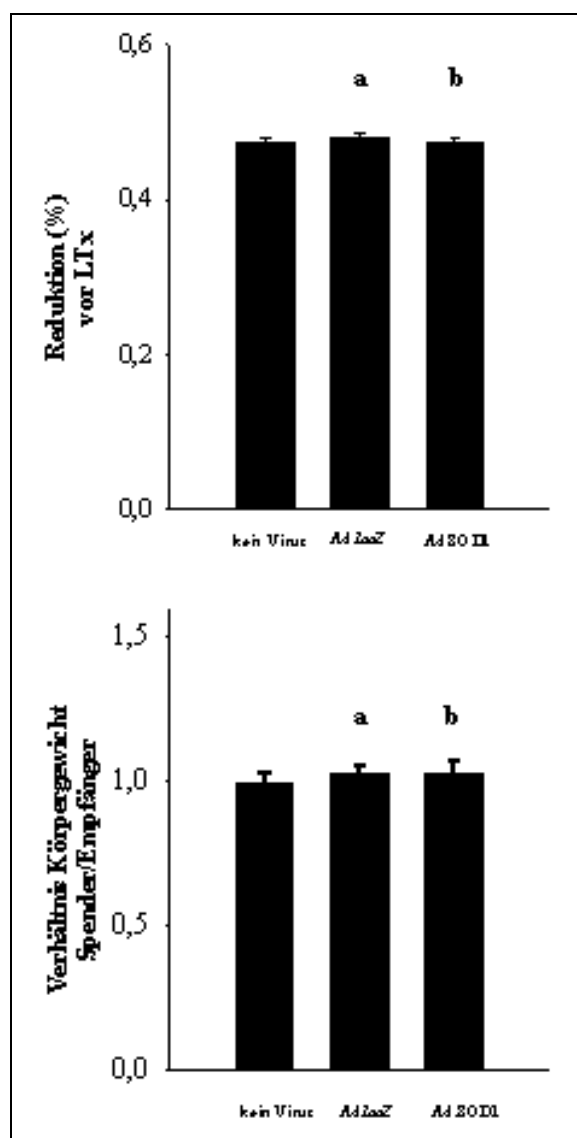


Abb. 26: Die beiden Grafiken demonstrieren die sowohl die Gewichtsreduktion der Lebern, als auch die Körpergewichtsverhältnisse der Spender/Empfängerrelationen. Die Indizes a und b bedeuten, dass die Ad.lacZ Gruppe und die Ad.SOD1 Gruppe keinerlei signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den jeweils anderen 2 Gruppen aufweisen.

Expression der überexprimierten Enzyme

Sowohl β -Galaktosidase, als auch Superoxiddismutase wurden hinsichtlich Ihrer Proteinaktivität im Leberhomogenat untersucht und dabei keine Änderung gegenüber der Versuchsgruppen aus dem Versuchsprotokoll unter 3.1 gefunden. Insbesondere hatte die Leberteilentfernung des zu transplantierenden Organes keinerlei Änderung der Proteinaktivität zur Folge: β -Galaktosidase war ausschließlich in der Ad.lacZ transfizierten

Leber zu messen, die SOD Aktivität in den SOD-überexprimierenden Organen war etwa 10-fach gegenüber den anderen Organen erhöht. Ein Vergleich mit nicht-resezierten, aber SOD-überexprimierenden Lebern zeigte keinerlei Unterschiede in der Proteinaktivität. Dieses Ergebnis war auch für nicht transfizierte Lebern zu erhalten, die Resektion hatte nach Transplantation keinen Einfluß auf die SOD Aktivität. Eine eventuell denkbare kompensatorische Hochregulation der SOD konnte unter den aufgeführten Versuchsbedingungen nicht gemessen werden. Diese Aussage ist vor dem Hintergrund interessant, dass einerseits extensiv viele Sauerstoffradikale nach Reperfusion aus dem Mesenterium über die Pfortader in die Leber eingeschwemmt werden und nun bei geringerer Detoxifikationsmasse noch schlechter abgebaut werden können und somit eine zusätzliche toxische Noxe darstellen. Diese Radikale könnten nach intrazellulär eingeschleust werden und dort zu einer Hochregulation der abbauenden Enzyme führen. Weiterhin führt die ausgeprägte Zufuhr und Hochregulation an Entzündungsmediatoren nach Reperfusion unter anderem zu Antworten auf der zellulären Ebene in der kleinen Restleber, was zu einer vermehrten Ausschüttung an SOD führen könnte. Auch vor diesem Hintergrund wurde die Analyse der SOD Aktivität durchgeführt, welche jedoch keine Veränderung der Split-Leber im Vergleich zur nicht resezierten Leber aufzeigte. Auf eine erneute grafische Darstellung der Ergebnisse wird auf Grund der Duplizität mit den vorangegangenen Untersuchungen und der identischen Ergebnisse zwischen den einzelnen Gruppen verzichtet.

Lebertransaminasen AST und ALT im Serum

Auch in diesem Versuch wurden die Transaminasen 8 h nach Reperfusion im Serum bestimmt. Die Transaminasen eignen sich als idealer Parameter zur Evaluation des hepatozellulären Schadens nach Ischämie und Reperfusion und im Modell der Lebertransplantation der Ratte werden die höchsten Spiegel etwa 8 h nach Reperfusion gemessen [199]. Zu diesem Zeitpunkt betrug der Wert für AST bei den Empfängern der nicht Größen-reduzierten Lebern 132 ± 12.82 U/l, jedoch um 900 U/l bei den Empfängern von

Split-Lebern, welche entweder ohne Gentransfer oder mit Transfektion von *Ad.lacZ* waren. Im Gegensatz dazu betragen die AST Werte bei Empfängern von SOD-überexprimierenden Split-Lebern nur 249 ± 21 U/l (Abbildung 27). Die Werte für ALT entsprechen in der Relation derjenigen der AST-Bestimmung (Abb. 27).

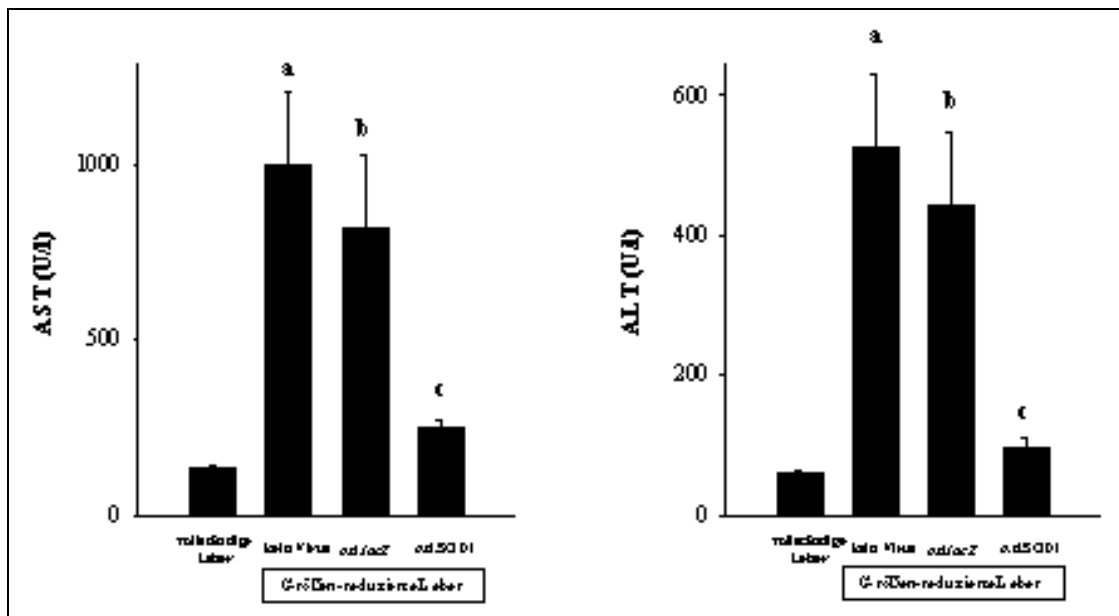


Abb. 27: Einfluß der Größenreduktion von Lebertransplantaten auf die Lebertransaminasen. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM beschrieben. Die Statistik wurde mittels zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test ermittelt, $n = 8$ pro Gruppe. **a:** $p < 0.05$ die *kein Virus* Gruppe verglichen mit der vollständigen Leber und der Ad.SOD1 Gruppe; **b:** $p < 0.05$ die Ad.lacZ Gruppe verglichen der vollständigen Leber und der Ad.SOD1 Gruppe; **c:** $p < 0.05$ die Ad.SOD1 Gruppe verglichen mit den beiden anderen Split-Leber Gruppen, nicht mit vollst. Leber. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich im Vgl. *kein Virus* vs. Ad.lacZ und vollst. Leber vs. Ad.SOD1.

Leberfunktion - Bilirubin

Die Aufgabe der Leber Bilirubin zu verstoffwechseln gilt neben den Gerinnungsfaktoren als ausgezeichneter Parameter, die Leberfunktion zu bestimmen. Hierzu wurde das Gesamtbilirubin im Serum direkt spektrophotometrisch bestimmt. Als geeigneter Zeitpunkt zur Bestimmung des Parameters erwies sich die Messung 24 h nach Transplantation, da dann ein beginnendes Leberversagen bzw. eine eindeutige Lebermalfunktion sich gut differenzieren ließ. Bei den vollständigen Lebern waren die Werte annähernd im Normbereich von

gesunden, nicht-transplantierten Tieren (am verwendeten Rattenstamm 0,05 – 0,15 mg%) und zeigten somit eine sehr gute Transplantatfunktion an, die Werte betragen etwa 0,21 mg%. Bei den Empfängern von Split-Lebern der Gruppen *kein Virus* und *Ad.lacZ* betragen die Werte hingegen durchschnittlich 2,7 mg%, waren also mehr als 12-fach erhöht. In der Gruppe der *Ad.SOD1* transfizierten Split-Lebern betrug der durchschnittliche Wert jedoch nur 0,43 mg%. Somit stand fest, dass die SOD-überexprimierenden Split-Lebern in der Lage sind, den postischämischen Schaden abzuwehren und die Leberfunktion aufrecht zu erhalten.

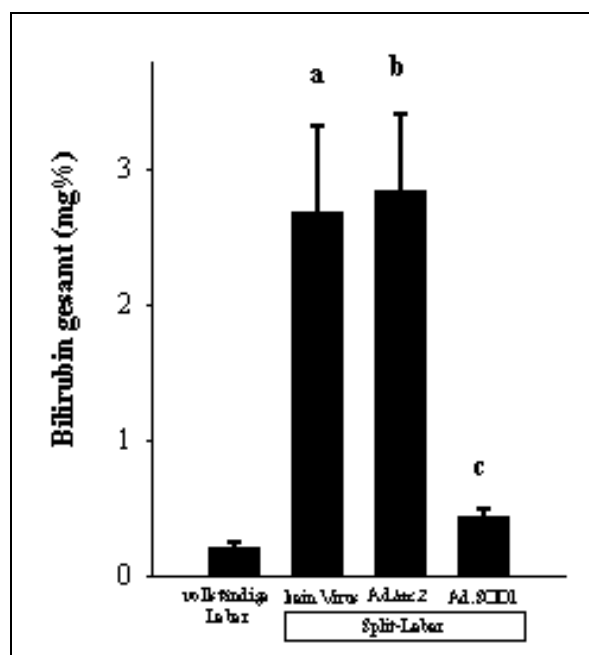


Abb. 28: Einfluß der Größenreduktion von Lebertransplantaten auf die Leberfunktion an Hand des Bilirubinstoffwechsels. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM beschrieben. Die Statistik wurde mittels zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test ermittelt, $n = 8$ pro Gruppe. **a:** $p < 0.05$ die *kein Virus* Gruppe verglichen mit der vollständigen Leber und der *Ad.SOD1* Gruppe; **b:** $p < 0.05$ die *Ad.lacZ* Gruppe verglichen der vollständigen Leber und der *Ad.SOD1* Gruppe; **c:** $p < 0.05$ die *Ad.SOD1* Gruppe verglichen mit den beiden anderen Split-Leber Gruppen, und auch mit der Gruppe *vollständige Leber*. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich im Vgl. *kein Virus* vs. *Ad.lacZ*.

Überleben

Nachdem nun eindeutig nachgewiesen worden war, dass eine verminderte funktionsfähige Lebermasse nach Reperfusion einen ausgeprägten postischämischen Parenchymschaden mit

verminderter Leberfunktion aufzeigt und dieses essentielle Problem sich durch die Überexpression von SOD dramatisch vermindern ließ, stellte sich weiter die Frage, ob denn der protektive Therapieansatz einen Einfluß auf das Überleben hat. Hierzu wurden das Überleben der transplantierten Empfänger der vier verschiedenen Gruppen für 7 Tage beobachtet. Alle Empfänger von vollständigen Lebern überlebten (16 von 16 Empfänger), jedoch nur 6 von 18 Empfängern von Split-Lebern ohne Virus und 4 von 20 Empfängern von Split-Lebern mit Ad.lacZ-Transfektion. Im Gegensatz überlebten alle 16 Empfänger von Split-Lebern mit Ad.SOD1-Transfektion (Abbildung 29). Dieses Ergebnis bedeutet, dass der deletäre Ausgang nach Transplantation einer zu geringen Lebermasse in Verbindung mit einem ausgeprägten Reperfusionsschaden komplett verhindert werden kann.

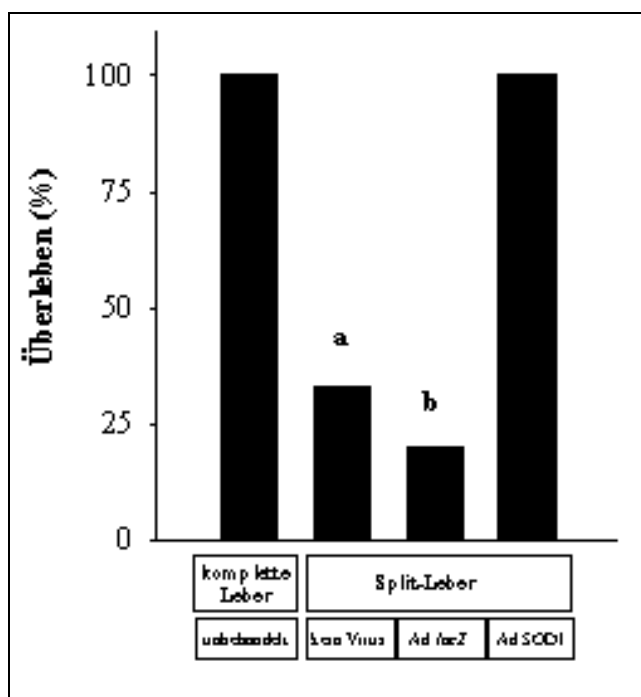


Abb. 29: Einfluß der Größenreduktion von Lebertransplantaten auf das Überleben der Empfänger. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM beschrieben. Die Statistik wurde mittels zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test ermittelt; n=16 Gruppe vollständige Leber, n=18 Gruppe kein Virus, n=20 Gruppe Ad.lacZ, n=16 Gruppe Ad.SOD1. **a:** $p < 0.05$ die *kein Virus* Gruppe verglichen mit der vollständigen Leber und der Ad.SOD1 Gruppe; **b:** $p < 0.05$ die Ad.lacZ Gruppe verglichen der vollständigen Leber und der Ad.SOD1 Gruppe. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich im Vergleich *kein Virus* vs. Ad.lacZ.

Histologie

Bei den histologischen Untersuchungen der Lebertransplantate 24 h nach Reperfusion ergaben sich keine Überraschungen: Die Nekroserate von vollständigen Transplantaten betrug etwa 12%. Bei den Split-Lebern hingegen zeigten sich für die Gruppen kein Virus und Ad.lacZ Werte um 25% nekrotische Hepatozyten (siehe auch Abbildung 30-32). Bei den Split-Lebern mit SOD-Überexpression hingegen betrug diese Rate im Durchschnitt nur 6%. Auf Grund der Duplizität mit histologischen Analysen in den vorangegangenen Untersuchungen wird auf eine erneute Abbildung der Histologie an dieser Stelle verzichtet, die Aussage ist eindeutig, die Unterschiede der nekrotischen Areale in den verschiedenen Gruppen sind auch in den Abbildungen 30-32 zu erkennen.

3.5.2 Einfluß der Größenreduktion und des Organschadens nach Transplantation einer Split-Leber auf die Leberregeneration und protektive Wirkung von Ad.SOD1

BrdU - Immunhistochemie

Nachdem nun eindeutig gezeigt worden war, dass die kleinen Restlebern als Transplantate ausgeprägte postischämische Parenchymschäden aufwiesen und diese Problematik zur hohen Letalität führte, stellte sich nun die Frage, ob dies eine Auswirkung auf die Leberregeneration hat. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Transfektion mit Ad.SOD1 zu einer positiven Veränderung des Regenerationsverhaltens führen kann. Zur Klärung dieser Frage wurden Untersuchungen zur Regeneration durchgeführt. Zunächst wurde eine Immunhistochemie der BrdU (Bromodeoxyuridin) Inkorporation in sich teilenden Hepatozyten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass in einer vollständigen, transplantierten Leber annähernd keine sich teilende Hepatozyten nachweisbar sind. In der Split-Leber ohne Gentransfer zeigten sich wenige sich teilende Hepatozyten, wie auch in der Gruppe der Ad.lacZ-transfizierten Splitlebern. Bei den SOD-überexprimierenden Splitlebern konnten viele angefärbte Zellen gesehen werden, was

für eine aktivierte Zellteilung im Sinne einer Regeneration spricht. Die Abbildungen 30-32 verdeutlichen diese Beobachtung.

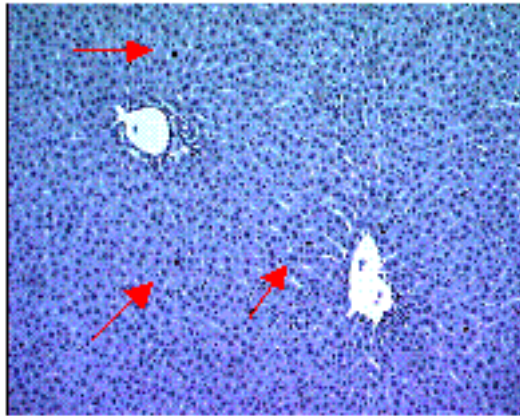


Abb. 30: BrdU-Immunhistochemie zur Darstellung der regenerierenden Zellen; Vollständige Leber. Die wenigen schwarz gefärbten Punkte zeigen sich teilende Zellen. Sie sind mit roten Pfeilen markiert. Repräsentativer Ausschnitt der histologischen Aufarbeitung von 8 Lebern dieser Versuchsgruppe.

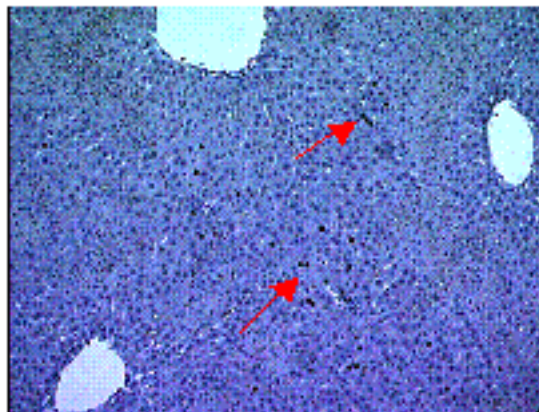


Abb. 31: BrdU-Immunhistochemie der Ad.lacZ transfizierten Split-Leber. Die wenigen schwarz gefärbten Punkte zeigen sich teilende Zellen, welche teilweise mit roten Pfeilen markiert sind. Repräsentativer Ausschnitt der histologischen Aufarbeitung von 8 Lebern.

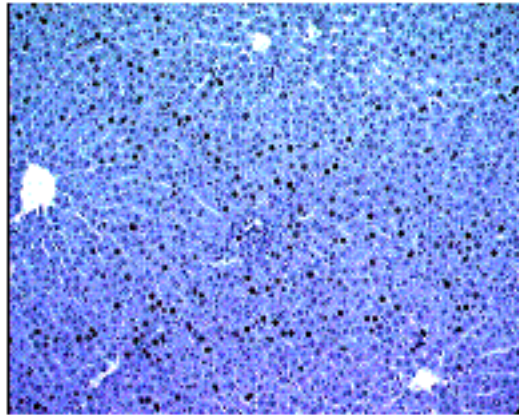


Abb. 32: BrdU-Immunhistochemie der Ad.SOD1 transfizierten Split-Leber, die vielen schwarz gefärbten Punkte zeigen sich teilende Zellen. Auffallend ist die hohe Anzahl dieser Zellen im Vergleich zu den anderen Gruppen Repräsentativer Ausschnitt der histologischen Aufarbeitung von 8 Lebern.

Western Blots von von Cyclin D1 und p21

Die eindeutigen Ergebnisse der Regenerationsfähigkeit von SOD-überexprimierenden Split-Lebern aus der BrdU-Immunhistochemie wurden im nächsten Schritt durch den Nachweis von 2 entscheidenden Faktoren im Zellzyklus Signalweg bestätigt. Hierzu wurden Cyclin D1 und p21 als regulierende Faktoren gewählt, welche im Western Blot von homogenisiertem Gewebe 24 h nach Reperfusion untersucht wurden. Die Ergebnisse entsprachen denen aus der Immunhistochemie, die deutlich vermehrte Expression von Cyclin D1 und p21 läßt die Schlussfolgerung zu, dass die Organprotektion mittels Ad.SOD1 zu einer deutlich akzellerierten Zellproliferation führte. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 33 unten dargestellt, die gezeigten Blots sind repräsentativ für ein untersuchtes Kollektiv von 8 Tieren pro Gruppe.

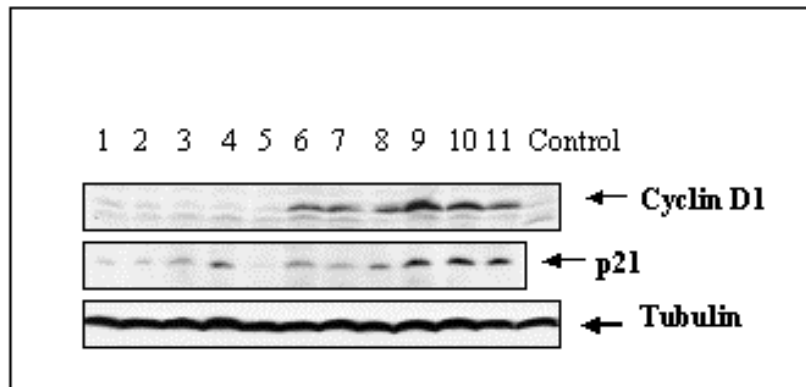


Abb. 33: Expression von Cyclin D1 und p21. Spur 1, 2: Scheinoperiertes Tier, Leber nicht manipuliert. Spur 3, 4: vollständige Leber, transplantiert. Spur 5, 6, 7: Spltleber, kein Virus. Spur 8: Spltleber, Gentransfer mit Ad.*lacZ*. Spur 9, 10, 11: Spltleber, Gentransfer mit Ad.SOD1. Control: Positivkontrolle. α -Tubulin verwendet als positiver Marker und Quantifizierung der untersuchten Proteinmenge, welche pro Spalte identisch war.

Bestimmung der Lebermasse als Maß der Regenerationsfähigkeit

Neben diesen beiden eindeutigen Untersuchungstechniken und Nachweismethoden für Zellregeneration wurde auch noch das Lebergewicht als relativ „grober“, aber ebenso eindeutiger Parameter für die Leberregeneration bestimmt. Die Veränderungen im Lebergewicht wurden 1 Woche nach Transplantation bestimmt, die Quantifizierung erfolgte unter Berücksichtigung von einer möglichen Veränderung des Körpergewichtes entsprechend der unter Punkt 2.5 aufgeführten Berechnungsformel. Die zuvor erhobenen Befunde spiegelten sich in der deutlichen Größenzunahme des Ad.SOD1-behandelten Organes wieder, während die beiden anderen Größen-reduzierten Organe eher geringfügig an Gewicht im Vergleich zur Ausgangsbestimmung verloren hatten (Abb. 34). Die zum Vergleich untersuchten vollständigen Lebern 1 Woche nach Transplantation zeigten annähernd keine Gewichtsveränderung, oder aber minimale Gewichtssteigerungen, was möglicherweise ein Ausdruck eines geringfügigen Ödemes sein könnte (Daten nicht aufgeführt).

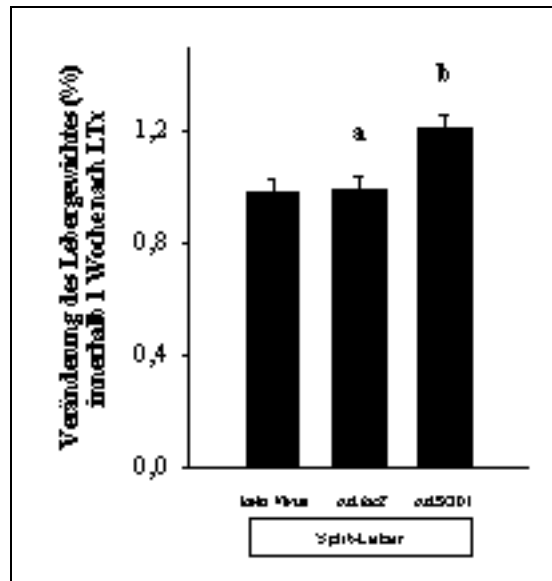


Abb. 34: Einfluß der protektiven Therapie mit Ad.SOD1 bei Splitlebertransplantaten auf die Leberregeneration im postoperativen Verlauf:

Die Lebertransplanate wurden vor Implantation und 1 Woche nach LTx gewogen. Die relative Veränderung (in %) wurde in Abhängigkeit von dem Gewicht des Empfängertieres bestimmt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM beschrieben. Die Statistik wurde mittels zwei-Wege ANOVA in Verbindung mit dem Student-Newman-Keuls posthoc Test ermittelt; $n=8$ pro Gruppe. **a:** $p<0.05$ die Ad.lacZ Gruppe verglichen mit der Ad.SOD1 Gruppe.;**b:** $p<0.05$ die Ad.SOD1 Gruppe verglichen mit der *kein Virus* Gruppe. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich im Vergleich der Gruppen *kein Virus* vs. Ad.lacZ.

4 Diskussion

4.1 Leberdysfunktion und Ischämie/Reperfusionsschaden

Da sich ein primäres Organversagen trotz der seit nunmehr über 2 Jahrzehnten bestehenden erfolgreichen Entwicklung der Lebertransplantation immer noch in 5-30% aller Lebertransplantationen entwickelt, die klinischen Studien hierzu zeigen eine weite Variationsbreite und die Definition des Organversagens, welches zu einer substantiellen Morbidität und Mortalität führt, ist nicht einheitlich, ist die Etablierung neuer, suffizienter Therapieformen dringend notwendig. Das primäre Organversagen stellt eine wesentliche Ursache der frühen postoperativen Morbidität und Mortalität nach Lebertransplantation dar und steht im Mittelpunkt der pathophysiologischen Mechanismen, welche zum Organversagen führen [85, 199]. Freie Sauerstoffradikale sind entscheidend an diesem pathologischen Geschehen beteiligt, sie werden im Wesentlichen von Kupfferzellen, Leukozyten und Hepatozyten produziert [57, 200, 201]. Freie Sauerstoffradikale entstehen auch an anderen Quellen, wie Mitochondrien, dem Cyclooxygenasestoffwechsel und dem Xanthinoxidasestoffwechsel, welche nicht nur in Kupfferzellen, sondern auch in Hepatozyten lokalisiert sind [202]. Diese toxischen Sauerstoffradikale führen zu schwerem hepatozellulären Schaden [57]. Verschiedene Versuche und Ansätze wurden durchgeführt und evaluiert, um den I/R-Schaden nach warmer Organischämie oder aber Organtransplantation durch die Administration von externen Radikalfängern zu vermindern. Beispielsweise wurden die Transplantate vor der Implantation mit einer speziellen Lösung (Carolina Rinse Solution) gespült, welche Antioxidantien und Radikalfänger enthielt. Durch diese Lösung konnte im Tierexperiment der Parenchymschaden nach Lebertransplantation vermindert werden und die Überlebenschancen gesteigert werden [71]. Durch die intravenöse Injektion von extrazellulärer SOD [203] konnten die Lipidperoxide vermindert werden und das Überleben geringfügig gesteigert werden, jedoch wurden die Lebertransaminasen durch diese Therapie

nicht vermindert, was auf einen minimalen Effekt auf den Parenchymschaden zurückzuführen ist [140]. Im Gegensatz zur externen Zufuhr von SOD, bei der die externen Proteine im Blutstrom durch die Proteasen rasch zerstört werden, sollte folglich ein Anstieg der antioxidativen Enzyme im Parenchym des Transplantates im Sinne einer kontinuierlichen Expressions- und Aktivitätssteigerung vor der Transplantation zu einer drastischen Minimierung des Organschadens führen.

Der Gentransfer stellt erstmals eine suffiziente Möglichkeit dar, intrazellulär ein gewünschtes Protein zu exprimieren und seine Aktivität und Funktion entsprechend der Zielvorgaben zu steuern, was insbesondere eine maximale Expression bedeuten kann. Dabei kann die gesteigerte Expression des funktionstüchtigen Proteins von lange anhaltender Dauer sein. Diese Ziele konnten in der Vergangenheit durch die externe Administration eines Proteins nicht erzielt werden. Als neue Entwicklung der vergangenen Jahre haben sich rekombinante Adenoviren in verschiedenen Modellen als hocheffektive Vektoren dargestellt und sie sind in der *in vivo* Forschung etabliert, auch wenn verschiedene negative Nebenwirkungen in Betracht zu ziehen sind und die Applikationsmenge auf Grund von immunologischen Reaktionen beim Empfänger limitiert ist. Erste klinische Versuche waren nicht nur erfolgreich, sondern im Gegensatz auch von fatalem Ausgang gekennzeichnet. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass der adenovirale Gentransfer von SOD den Organschaden nach warmer Ischämie von Leber [166] und Myokard [167] deutlich minimieren kann. In diesen Studien konnte eine substanzielle Reduktion von Parenchymschaden und Verbesserung der Organfunktion nachgewiesen werden. Das gleiche Konzept wurde im Modell der warmen intestinalen Ischämie in transgenen Mäusen, welche Cu/Zn-SOD überexprimierten, verfolgt und als höchst effektiv empfohlen [204]. Dieser beschriebene therapeutische Ansatz wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals auf die Organtransplantation ausgedehnt und angewendet. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine dauerhaft erhöhte Expression von SOD, deren Gen mittels eines Adenovirus in die

Hepatozyten eingeschleust worden war, die Leber vor dem Ischämie/Reperfusionsschaden in einem Modell der Lebertransplantation der Ratte schützen würde. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

4.2 Adenovirale Gene werden erfolgreich in die Leber importiert

Es konnte bereits in der Vergangenheit demonstriert werden, dass der adenovirale Gentransfer auch bei Lebern erfolgreich ist, welche als Organtransplantate benutzt werden und hierzu für einen bestimmten Zeitraum kalt konserviert werden, und die Organkonservierung beeinflusst den Gentransfer nicht [165, 168, 205]. Auch in der vorliegenden Studie konnte in Übereinstimmung mit den genannten Arbeiten eindeutig gezeigt werden, dass der adenovirale Gentransfer erfolgreich für die Transplantationsmedizin genutzt werden kann. Zum Beispiel zeigte die immunhistochemische Darstellung der β -Galaktosidase, dass mindestens 80% aller Hepatozyten das transfizierte Gen exprimieren. Diese Aussage gilt nicht nur für gesunde Lebern, sondern auch für die vorgeschädigten, marginalen Lebern (Abbildungen 3 und 10). Hierbei handelt es sich um eine neue Erkenntnis, bisher wurde der suffiziente adenovirale Gentransfer in marginalen, verfetteten Lebern nicht beschrieben. Überaus erfolgreich war der adenovirale Gentransfer von dem Zielprotein SOD (Abbildungen 5, 11, 12, 18). Der quantitative Unterschied zwischen Dichtebestimmung des Western Blots und der Aktivitätsanalyse im Homogenat kann mit der relativen Unschärfe der Dichtemessung erklärt werden, die Visualisation der Relationen und damit das Ziel dieser Untersuchungen ist jedoch eindeutig. War es noch relativ offensichtlich, ein pflanzliches Protein in einem Säugetierorganismus nachzuweisen und die Aktivität des unnatürlichen Proteins darzustellen, so war es um so spannender, ein im Organismus des Tieres ubiquitär vorkommendes Enzym in deutlich erhöhter Konzentration vorzufinden. Dabei gilt diese Feststellung unabhängig von der Phase der kalten Ischämie und der Dauer dieser, da die Aktivitäten vor und nach kalter

Ischämie identisch waren. Hinsichtlich der SOD Aktivität ist jedoch festzustellen, dass die Proteinaktivität im Homogenat unter der Verfettung der Leber leidet: Sowohl bei den grobtropfig als auch bei den feintropfig verfetteten Lebern zeigte sich ein Unterschied in den SOD Aktivitäten bei den gesunden und verfetteten Lebern, die verfetteten Lebern zeigten eine geringere Steigerung der SOD-Aktivität, auch wenn dieser Unterschied in den hier gezeigten Versuchsreihen nicht signifikant ist. Dies könnte man durch eine relative kleine Tieranzahl pro Gruppe erklären, wobei bei der berechneten Statistik die Power des einzelnen Vergleiches im geforderten Zielbereich war, die statistische Berechnung und Aussage war ohne jegliche Einschränkung und somit war das Argument entkräftet. Ebenso zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der maximalen Aktivität der SOD überexprimierenden Tiere zwischen gesund und verfettet, die gesunden Lebern erreichten deutlich höhere Aktivitätswerte, die Methodik der Berechnung war identisch (vergleiche Abbildung 5 mit 11-12). Auf das herausragend gute Endresultat der SOD-überexprimierenden Lebern hatte dies jedoch keinen Einfluß.

4.3 Die Verwendung der zytosolischen Isoform der SOD

In der ersten Studie zur Beantwortung der Fragestellung 2 (*Welchen Einfluß hat die Überexpression von Superoxiddismutase auf die Transplantatfunktion, den postischämischen Transplantatschaden und folglich auf das Überleben nach Lebertransplantation?*) wurde die zytosolische Isoform der SOD (Cu/Zn-SOD) als das effektivste „Radikalfängersystem“ angesehen und ausgewählt. Die Auswahl beruhte auf der Überlegung, dass die Radikalbildung nicht nur in Mitochondrien, sondern auch im Zytosol der Mitochondrien stattfindet und somit die Cu/Zn-SOD am besten die zytotoxischen Eigenschaften der Sauerstoffradikale neutralisieren könnte. Wie bereits oben angesprochen, werden bei der Reperfusion der Leber die toxischen Radikale hauptsächlich von aktivierten Kupfferzellen und teilweise von Leukozyten gebildet [57, 200, 200, 201, 201]. Die zytosolische Isoform könnte der mitochondrialen Isoform in der Zellprotektion insofern überlegen sein, als dass

wahrscheinlich nach Reperfusion der Großteil der Sauerstoffradikale von Kupfferzellen produziert wird und zuerst das Zytosol der Hepatozyten nach Aufnahme in die Zelle erreicht, bevor die Radikale die Mitochondrien erreichen. Im Model der warmen hepatischen Ischämie in der Maus wurden sehr hohe Titer der mitochondrialen Isoform verwendet (1×10^{11} PFU), welche dann auch einen überzeugend protektiven Effekt zeigten [166]. In der in dieser Arbeit vorgestellten Studie wurde in einem wesentlich größeren Säugetier eine um etwa 1,7 Potenzen niedrigere Dosierung eines Adenovirus jedoch mit dem Gen für die zytosolische Isoform benutzt (Ad.SOD1, 3×10^9 PFU) und in diesem Model mit wesentlich ausgeprägterem Schaden ein deutlich protektiverer Effekt erzielt. Folglich darf man daraus schließen, dass die zytosolische Cu/Zn-Isoform der Superoxiddismutase weitaus effektiver in der Minimierung der zerstörenden Wirkung von Sauerstoffradikalen in Hepatozyten als die Mn-Isoform ist.

4.4 Der protektive Effekt von SOD auf Leberschädigung und Überleben nach LTx

Wie oben dargestellt führt der Gentransfer von Cu/Zn-SOD und die Inkubation über 72 h zu einem deutlichen Anstieg der SOD Aktivität in den transplantierten Lebern, welche 8 h nach Reperfusion untersucht werden. Dieser minimierte Parenchymschaden konnte an Hand der um mindestens 50% reduzierten Lebertransaminasen und den deutlich reduzierten Leberzellnekrosen bewiesen werden. In der Transplantationsmedizin läßt sich die Effektivität einer therapeutischen Maßnahme, welche das Transplantat als Ziel hat, am Überleben des Organempfängers schlußendlich beurteilen (Abbildungen 6 und 7). In der ersten Studie dieser Arbeit konnte das Überleben durch den Gentransfer von 20 auf 100% verbessert werden. Dieses Ergebnis beweist eindeutig, dass die Überexpression von Cu/Zn-SOD äußerst effektiv darin ist, den postischämischen Leberschaden nach Transplantation zu minimieren und diese Therapie resultiert in einer wesentlich verbesserten Organfunktion. Die Beobachtungen

stützen die Hypothese, dass Sauerstoffradikale eine im Zentrum stehende Ursache des Ischämie/Reperfusionen-bedingten Organschadens nach Lebertransplantation darstellen.

4.5 Das Problem der marginalen, verfetteten Lebern als Spenderorgane

Ein nicht geringer Anteil der Spenderorgane zeigt einen nicht unerheblichen Verfettungsgrad auf, wobei die Zahlen in der Literatur leider uneinheitlich sind. Jedoch ist es eindeutig bewiesen, dass die Leberverfettung, welche in aller Regel durch chronischen Alkoholkonsum hervorgerufen wird, eine deutlich erhöhte Rate an primärem Organversagen bzw. Organdysfunktion als Transplantat nach Lebertransplantation aufweisen [33]. Folglich werden viele potentiellen Spenderorgane auf Grund ihrer Verfettung abgewiesen, obwohl diese Organe dringend benötigt würden. Neue Therapiemöglichkeiten sind erforderlich, um diese gesuchten Organe „transplantabel“ zu machen und den Spenderpool zu erweitern. Die durch chronischen Alkoholgenuß verfetteten Lebern zeigten in einem Leberperfusionmodell eine erhöhte Sauerstoffradikalproduktion [174]. Weiterhin konnte in einem Modell der Transplantation von Fettlebern gezeigt werden, dass der Reperfusionsschaden durch die Minimierung von Sauerstoffradikalen, was durch eine Inaktivierung der Kupfferzellen erreicht wurde, dramatisch vermindert werden konnte [206]. Der adenovirale Gentransfer von SOD könnte folglich auch marginale Lebern zu sicher verwendbaren Transplantaten verändern.

Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit bewiesen, die Cu/Zn-SOD überexprimierenden Fettlebern zeigten nach Transplantation nicht nur einen deutlich verminderten Parenchymschaden (Abb. 13, Tabelle 1), sondern auch eine hochsignifikante Verbesserung des Überlebens der Empfänger: Die Empfänger von verfetteten Organen überlebten nicht, jedoch überlebten alle Empfänger von SOD-überexprimierenden Fettlebern (Tabelle 1). Diese Daten beweisen eindeutig, dass der Gentransfer von Cu/Zn-SOD ein

geeignetes Therapieverfahren darstellt, um auch hochgradig verfettete Spenderlebern dem Organpool als „hochwertige“ Transplantate zuzuführen und das primäre Organversagen dieser Lebern zu verhindern. Dieses Verfahren würde zu der dringend benötigten Erweiterung des Spenderpools führen und könnte dazu beitragen, die Versterberate der Patienten auf der Warteliste zu reduzieren.

4.6 Die Rolle der Sauerstoffradikale und der Einfluß auf Transkriptionsfaktoren

Zuvor wurde auf die zweifelsfrei entscheidende Rolle der Sauerstoffradikale beim Ischämie/Reperfusionsschaden eingegangen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die SOD-Überexpression zu einer deutlichen Verminderung der freien Sauerstoffradikale in der Leber führen würde und dies sei der wesentliche Mechanismus der protektiven Wirkung der Ad.SOD1-Therapie. Um diese Hypothese zu beweisen wurden mittels der ESR-Methode (ausführliche Beschreibung der Technik unter Materialien und Methoden) freie Radikaladdukte in der sezernierten Galleflüssigkeit 3 h nach Reperfusion gemessen. Hierbei konnte eindeutig festgestellt werden, dass in der Tat diejenigen Lebern deutlich vermindert freie Radikale sezernieren, welche Cu/Zn-SOD überexprimieren (Abb. 14, 15). Darüber hinaus unterstützen diese ESR-Ergebnisse die bekannte Hypothese, dass toxische Sauerstoffradikale eine wesentliche Ursache des Ischämie/Reperusions-bedingten Organschadens nach Lebertransplantation darstellen.

Die Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B sind wesentliche Mediatoren des zellulären Stresses und außerordentlich sensibel hinsichtlich Veränderungen im Redoxstatus der Zelle [166]. NF- κ B hat sowohl protektive, als auch schädigende Einflüsse auf den Ischämie/Reperfusionsschaden der Leber und wahrscheinlich besteht im Normalzustand ein Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiapoptotischen Funktionen von NF- κ B [166, 207]. In den hier gezeigten Experimenten führte die kalte Ischämie und Reperfusion der

Lebern verbunden mit der übermäßigen Produktion von freien Sauerstoffradikalen zu einer deutlichen Aktivierung von NF- κ B und JNK nach Transplantation. In der Vergangenheit konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die JNK Aktivierung als Antwort auf den I/R Schaden protektiv oder aber zellzerstörend wirkt [188]. Erstmals konnte in der vorliegenden Studie nachgewiesen werden, dass die reduzierte Bildung von freien Radikalen in den Cu/Zn-SOD überexprimierenden Lebern auch zu einer Reduktion der Aktivierung von NF- κ B und JNK nach Transplantation führt. Mit anderen Worten, die Korrelation von hepatozellulärem Schaden und Überleben mit der JNK Aktivierung zeigt, dass die JNK Aktivierung nach Reperfusion offensichtlich zytotoxisch wirkt. Diese Ergebnisse legen die Schlußfolgerung nahe, dass es ein Zusammenspiel zwischen dem Redoxstatus in Hepatozyten nach Reperfusion und der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren geben muß.

JNK war der einzige, hier untersuchte Vertreter der MAP-Kinase Gruppe, der durch Ischämie/Reperfusion kräftig aktiviert wurde und durch CU/Zn-SOD Überexpression annähernd vollständig inhibiert wurde. Wie bereits in anderen Studien gezeigt wurde, war p38 durch Ischämie/Reperfusion nicht aktiviert worden [188]. Überraschenderweise wurde die IKK Aktivität durch Ischämie/Reperfusion nur geringfügig aktiviert, obwohl eine ausgeprägte Aktivierung von NF- κ B zu verzeichnen war. Im Allgemeinen bedarf die Aktivierung von NF- κ B die Aktivierung des IKK Komplexes, um den Inhibitor von κ B zu phosphorylieren und zu degradieren und somit NF- κ B freizusetzen. Jedoch scheint NF- κ B in diesem Falle über einen IKK unabhängigen Mechanismus aktiviert zu werden, wie es unter den Bedingungen des oxidativen Stresses vorkommen kann [208]. Somit können die hier dargestellten Ergebnisse erklärt werden und unterstützen die von Li und Karin beschriebenen Beobachtungen, welche die Ischämie/Reperusions-bedingte Aktivierung von NF- κ B beschrieben hatten.

Die Überexpression von Cu/Zn-SOD führte zur annähernd kompletten Inhibition der JNK Aktivität, jedoch war die AP1 Bindungsaktivität noch eindeutig darstellbar (diese Daten

wurden oben nicht gezeigt). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit einer anderen Studie, welche *in vitro* den Einfluß der Überexpression von Mn-SOD auf die TNF α Aktivierung untersuchte und eine reduzierte Aktivität von NF- κ B und JNK beschrieb [209]. In dem hier durchgeführten *in vivo* Modell blockiert die Überexpression von Cu/Zn-SOD sowohl NF- κ B, als auch JNK und dieser Effekt hängt mit der verbesserten Transplantatfunktion und höherer Überlebensrate zusammen. Es ist also denkbar, dass die JNK Aktivierung durch Sauerstoffradikale vermittelt wird und ein zytotoxisches Signal freisetzt, welches durch Ad.SOD1 vermindert werden kann. Die JNK Aktivierung durch maximale Radikalstimulation kann fatale Folgen haben, im Gegensatz dazu zeigen Ad.SOD1 transfizierte Lebern nur geringe Zeichen des zellulären Schadens und funktionieren problemlos. Die positiven Effekte der Verminderung der NF- κ B Aktivierung durch Ad.SOD1 können auch damit erklärt werden, dass NF- κ B den Zelltod mittels des Fas/FasL Systemes steuert [210].

Es ist bekannt, dass die JNK Aktivierung eine Rolle bei der Induktion der Apoptose spielt, im Gegensatz dazu inhibiert NF- κ B die Apoptose [211]. Die komplette Inhibition von NF- κ B führte zu verstärktem Leberzellschaden und induzierte die Apoptose von Hepatozyten [207]. Folglich ist die komplette Inhibition von NF- κ B im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschadens nicht nützlich. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse legen die Schlußfolgerung nahe, dass eine partielle Inhibition der Aktivierung von NF- κ B in Verbindung mit einer reduzierten JNK Aktivierung zu einer verminderten Apoptoserate führt und somit ein gewünschtes Ziel der Organprotektion nach Reperfusion darstellt. Offensichtlich ist dieser Mechanismus streng von der Quantität der toxischen Sauerstoffradikale intrazellulär abhängig, da die Apoptoserate direkt in Relation mit dem protektiven Potential der überexprimierten SOD-Isoform steht (siehe Tabelle 2). In den hier gezeigten Experimenten war der hepatozelluläre Schaden immer mit minimaler Apoptose,

geringer NF- κ B und JNK Aktivierung vergesellschaftet. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei ausgeprägtem Parenchymschaden immer eine hohe Apoptoserate, sowie eine ausgeprägte NF- κ B und JNK Aktivierung. Diese Ergebnisse unterstützen die oben bereits zitierte Hypothese, dass ein günstiges Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiapoptotischen Eigenschaften von NF- κ B bestehen muß, um den hepatozellulären Schaden nach Ischämie/Reperfusion zu minimieren.

4.7 Das protektive Potential der drei SOD-Isoformen

Wie in der Einleitung bereits ausführlich dargelegt existieren in der Leber drei verschiedene Isoformen der Superoxiddismutase, welche den jeweiligen Zellkompartimenten zugeordnet werden. Es wurde die Frage gestellt, welchen Einfluß die Überexpression jeder einzelnen Isoform jeweils auf den Reperfusionsschaden hat und diese Frage konnte mit den erhaltenen Ergebnissen eindeutig beantwortet werden. Wie oben ausführlich beschrieben und diskutiert vermindert die SOD-Überexpression die freien Radikale, also das wahrscheinlich wichtigste toxische Agens nach Reperfusion in der Leber, und vermindert somit die Organschädigung. Die Kupfferzellen produzieren den größten Anteil an freien Radikalen und sezernieren diese in den extrazellulären Raum. Von dort aus werden die toxischen Radikale zuerst in das Zytosol der Hepatozyten aufgenommen und richten dort zellulären Schaden an, bevor sie in die Mitochondrien eingeschleust werden können. Folglich läßt es sich einfach erklären, warum die zytosolische Isoform der SOD so effektiv in ihrer protektiven Wirkung ist, denn sie detoxifiziert die Radikale, welche im Zytosol produziert werden, aus dem extrazellulären Raum aufgenommen werden und im Mitochondrien produziert werden, die dort im Überschuß vorhanden sind und in das Zytosol abgegeben werden. Somit kann man auch erklären, warum unter identischen Grundvoraussetzungen die Überexpression von Mn-SOD weniger protektiv ist als diejenige von Cu/Zn-SOD. In dieser Studie wurde außerdem festgestellt, dass die SOD Aktivität in der Leber in den mit Ad.SOD1 transfizierten Organen

etwas höher war, als in den mit Ad.SOD2 transfizierten Lebern, obwohl die Konzentration an adenoviralem Vektor (3×10^9 PFU) in jeder Gruppe identisch war. Die Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant.

Sauerstoffradikale, welche im Überschuß in Mitochondrien produziert werden, diffundieren wahrscheinlich in das Zytosol. Außerdem beeinflußt der Status der Radikale in Mitochondrien die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren [209]. Sobald exzessive Mengen an freien Radikalen in Mitochondrien anfallen und in die Funktion derer eingreifen, stirbt die Zelle auf Grund des Energiemangels [212]. Dies mag die Erklärung für die Zellprotektion durch Überexpression von Mn-SOD sein. Außerdem kann man spekulieren, dass Mn-SOD in das Zytosol transportiert wird und dort freie Radikale abbauen kann.

In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Transfektion der Spenderleber mit Ad.SOD3 keinen Einfluß auf den Ischämie/Reperfusionsschaden hat (Abb. 20, Tabelle 2). Im Serum der Spendertiere kann man 72 h nach Injektion von Ad.SOD3 deutlich erhöhte Konzentrationen von SOD nachweisen, da Ad.SOD3 in vielen verschiedenen Organen zur Produktion von extrazellulärer SOD führt (Abb. 19). Im Gegensatz dazu kann man in den Empfängern von Ec-SOD überexprimierenden Lebern keine erhöhte Serumkonzentration von SOD 8 h nach Reperfusion nachweisen. Zumindest sind die in diesen Versuchen verwendeten Dosierungen des adenoviralen Vektors nicht dazu geeignet, systemisch eine Wirkung bei „Ein-Organ-Transfektion“ hervorzurufen. Die Quantität der Ec-SOD, welche in dem hier vorliegenden Fall der genetisch modifizierten, transplantierten Leber hauptsächlich von Kupfferzellen produziert wird, erscheint im Vergleich mit der Gesamtmenge an SOD im Serum sehr gering zu sein, sodass Veränderung aus den Kupfferzellen heraus insgesamt nicht ins Gewicht fallen. Aus den Ergebnissen läßt sich folgern, dass die Überexpression der Ec-SOD überwiegend von Kupfferzellen, welche in der Tat in vivo von Adenoviren infiziert werden [213], nicht

ausreichend ist, um die großen Mengen von Sauerstoffradikalen, welche von den Kupfferzellen gebildet werden, unter den gegebenen Bedingungen dieser Studie abzubauen.

Vor Kurzem konnte in einer experimentellen Studie gezeigt werden, dass die intramuskuläre Infektion mit Ad.SOD3 zu einem deutlichen Anstieg der gesamten SOD Aktivität im Serum führt und signifikant den Ischämie/Reperfusionsschaden in einem Modell der warmen Leberischämie in der Ratte minimiert [214]. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die von Kupfferzellen produzierten Radikale wesentlich am pathologischen Geschehen beteiligt sind und dass die SOD offensichtlich auch durch zelluläre Membranen transportiert wird. Jedoch kann diese einfache Strategie der intramuskulären Infektion von einem adenoviralen Vektor nicht in die klinische Anwendung übertragen werden, da die Transplantatempfänger immunsupprimiert sind und sich unvorhersehbare, unkontrollierbare immunologische Zwischenfälle ereignen könnten.

Auch in den mit Ad.SOD2 transfizierten Lebern zeigte sich eine deutliche Reduktion der Aktivität von NF- κ B und JNK, welche jedoch bei Weitem nicht so ausgeprägt war wie bei Ad.SOD1 infizierten Lebern. Dieses Ergebnis kann man insofern erklären, als dass eine geringere protektivere Wirkung von der Ad.SOD2 Therapie festzustellen war, was wahrscheinlich auf eine geringere Kapazität der Detoxifikation von Sauerstoffradikalen beruht und folglich auch zu einer gesteigerten Aktivierung von NF- κ B und JNK führt. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Ad.SOD1 transfizierten Lebern ergibt sich ein weiterer Hinweis darauf, dass Sauerstoffradikale als zentrale Vermittler der NF- κ B und JNK Aktivierung dienen.

Wie es zu erwarten war, hatte Ad.SOD3 keinen Einfluß auf NF- κ B und JNK, da die intrazellulären Radikale nicht von SOD3 detoxifiziert wurden.

4.8 TNF α Aktivität

Die TNF α Produktion durch aktivierte Kupfferzellen, welche durch Ischämie/Reperfusion verstärkt wird, spielt eine zentrale Rolle in der initialen Phase nach pathophysiologischer Ischämie und Reperfusion und zählt zu den verantwortlichen Stimulatoren für NF- κ B und JNK [215, 216]. In der bereits oben beschriebenen Arbeit von Zwacka et al. in *Nature Medicine* von 1998 wird beschrieben, daß die Veränderung von freien Radikalen theoretisch auch zur Reduktion von TNF α Aktivität führen müßte. Nur dazu konnten die Autoren keine eindeutige Untersuchung zeigen, da Sie keine verwertbaren Ergebnisse in ihrem Modell erhalten hatten. Im Gegensatz dazu wurden in der hier vorliegenden Studie diese Fragestellung in dem Modell der Lebertransplantation mit einer sensibleren Technik untersucht und dann mittels eines RNA-Protection Assay sehr interessante Ergebnisse erhalten. Darin kommt eindeutig zum Ausdruck, daß bei dem hochkomplexen und multifaktoriellen Modell der Lebertransplantation von Fettlebern ein deutlicher Einfluß der Generierung von freien Radikalen auf die Aktivität von TNF α zu verzeichnen ist und sowohl die Überexpression von Cu/Zn-SOD wie auch von Mn-SOD zu einer signifikanten Reduktion der TNF α -Aktivität führt mit dem Unterschied, dass die protektive Wirkung von Cu/Zn-SOD erneut ausgeprägter ist, als die von Mn-SOD. Die Ec-SOD Behandlung hat auch in dieser Hinsicht keinerlei protektive Wirkung zeigen können. Diese Ergebnisse hinsichtlich der SOD-Einwirkung auf TNF α sind eine neue Erkenntnis, sie wurden in der Vergangenheit nicht dargestellt. Die offensichtlich enge Kommunikation zwischen Sauerstoffradikalen und TNF α Aktivierung wurde hiermit erstmals aufgezeigt.

4.9 Protektion von Split-Lebern durch Gentransfer von SOD

Aus den Ergebnissen der Vorarbeiten und der bearbeiteten Teilprojekte ergab sich, dass der adenovirale Gentransfer einen wesentlichen Nachteil für die Lebertransplantation aufweist und dies ist der Faktor Zeit. Unter klinischen Bedingungen wird ein hirntoter Patient zum

Organspender nach vollständiger Hirntoddiagnostik und gegebener Einverständnis entsprechend der nationalen Gesetzgebung des jeweiligen Landes. Nach Freigabe zur Organspende vergehen i.d.R. nur wenige Stunden, bis die Organentnahme stattfindet. Einem hirntoten Organspender sollten zügig nach abgeschlossener Hirntoddiagnostik die Organe entnommen werden, da der Verstorbene häufig zunehmend kardiozirkulatorisch instabil wird, infektionsgefährdet ist, das Immunsystem schrittweise versagt, die Nierenfunktion instabil wird und die Temperaturregulation versagt. Trotz intensivmedizinischer Maßnahmen ist diese Spirale, welche zum Multiorganversagen führt, kaum zu verzögern.

Daher ist ein benötigtes Zeitintervall von 72 Stunden zwischen Injektion eines adenoviralen Vektors und der maximalen Proteinexpression deutlich zu lange für diese Anwendung in einer klinischen Studie zum gegenwärtigen Zeitpunkt. Einen hochwahrscheinlichen Organspender bei noch nicht abgeschlossener Hirntoddiagnostik quasi prophylaktisch mit einem viralen Konstrukt zu infizieren, ist aus vielerlei Gründen nicht durchführbar. Bei den Überlegungen zu einem möglichen klinischen Hintergrund bzw. Anwendungsbereich des Gentransfers durch einen Vektor wurde die neue klinische Entwicklung der Lebendspende definiert. Hierbei könnte man geplant den Organspender mit einem adenoviralen Gentransfer von Cu/Zn-SOD behandeln und würde damit folgende Verbesserungen erzielen:

1. Die zu entnehmende Lebermasse kann vermindert werden, da statt etwa 15-20% Leberzellnekrose nach Reperfusion nur noch mit etwa 2%-5% gerechnet werden muß. Somit reduziert sich das minimal zu transplantierende Organvolumen.
2. Der Organspender wird zusätzlich vor einem Organversagen geschützt. Bei der Organentnahme muß die Leber des Spenders häufig einer kurzzeitigen warmen Ischämie (Pringle-Manöver) unterzogen werden, welche zu einem zusätzlichen Schaden auch für das verbleibende Organ führt. Durch den Gentransfer kann dieser Schaden minimiert werden, der im Spender verbleibende Organanteil kann die anfallenden freien Radikale besser abbauen. Zudem könnte bei Bedarf oder anatomischen Gegebenheiten auch etwas mehr Lebergewebe als üblich entnommen werden, ohne den Spender zu gefährden, und somit dem Empfänger mehr

Parenchym zur Verfügung zu stellen, um dem Ischämie/Reperfusionsschaden besser verarbeiten zu können. Dies ist insbesondere wichtig, da die linke oder auch rechte Hemileber in ihrer Größe ausgeprägten individuellen Schwankungen unterliegt. Weiterhin wird zur Leberlebendspende für erwachsene Empfänger an den meisten Zentren große Teile der rechtseitigen Hemileber verwendet. Das Organversagen der Restleber stellt eine mögliche, gravierende Komplikation dar.

3. Protektion des Spenderorganes: Die Leberlebendspende wurde initial vornehmlich für die pädiatrische Organtransplantation eingeführt. Mittlerweile wurde dieses Verfahren vor dem Hintergrund des weltweiten Organmangels und der Todesrate auf der Warteliste auch für die adulte Lebertransplantation weiterentwickelt. Religiöse Hintergründe hinsichtlich der Leichenspende im asiatischen Raum stellen eine weitere Motivation zu diesem Verfahren insbesondere in diesen Ländern dar. Patienten, welche sonst kaum eine realistische Chance auf ein Spenderorgan hätten (maligne Grunderkrankung wie z.B. Hepatozelluläres Carcinom, oder Alter über 65 Jahre), können so transplantiert werden. Bei den adulten Empfängern ist die mögliche Rate an primärem Organversagen wegen "*small for size liver*" besonders kritisch und dies ist eine gefürchtete Komplikation. Wenn man z.B. 60% einer adulten Leber transplantiert, fallen quasi rund 20% dieser Restleber wegen postischämischer Nekrose weg, d.h. das eigentlich transplantierte Volumen an funktionsfähigen Hepatozyten reduziert sich deutlich. Dieses Problem könnte man durch den Gentransfer von Cu/Zn-SOD verhindern, das aktive, funktionierende Volumen an Hepatozyten wäre größer und somit wahrscheinlich die Rate an primärem Organversagen niedriger.
4. Die Leberlebendspende ist ein elektiver Eingriff, die Lebertransplantation wird geplant. Daher wäre eine adenovirale Infektion oder anderes Gentransferverfahren des Spenders und ein nachfolgendes Zuwarten von 3 Tagen vor Organteilexplantation problemlos möglich. Somit ist ein wesentlicher Nachteil des Gentransfer-Verfahrens für diese Anwendung nicht mehr existent.
5. Aus Literaturangaben ist bekannt, dass ischämisch geschädigte Organe nach partieller Resektion eine deutlich schlechtere Regeneration zeigen, als reduzierte Organe ohne zusätzlichen ischämischen Schaden. Daraus ist zu folgern, dass Cu/Zn-SOD überexprimierende Organe eine deutlich bessere Regeneration aufweisen müssten, als solche ohne Gentransfer. Somit könnte die kritische Phase nach Reperfusion insbesondere von *small for size* Organen deutlich verkürzt werden.

6. Als einzige, aber entscheidende und limitierende Unsicherheit steht die Reaktion des gesunden Spenders auf ein adenovirales Konstrukt im Raum. In den hier dargestellten Tierversuchen wurde bei der gewählten Konstellation ein Anstieg von Lebertransaminasen und ein angedeutetes Bild einer allgemeinen Erkrankung (viraler Infekt) beobachtet, welches sich 48 Stunden nach Injektion wieder gegeben hatte. Für eine mögliche Anwendung im humanen Bereich steht diese Frage bei adenoviralen Vektoren als momentan noch nicht geklärt im Raum, auf die fatalen Komplikationen nach klinischer Anwendung von adenoviralen Vektoren im Jahre 1999 sei nochmals hingewiesen [217].

In den hier beschriebenen Versuchen war es das Ziel, die eben genannten Hypothesen zu untersuchen. Für die Experimente wurde eine Versuchsreihe so etabliert, daß alle unbehandelten Kontrollen überlebten, jedoch nach 24 h Konservierung nur etwa 30% der Empfänger von *reduced size* Lebern. Die reduzierten Lebern entsprachen etwa 40% der Ausgangsgewichte. Die Lebertransaminasen verdeutlichen den ausgeprägt protektiven Effekt der Cu/Zn-SOD Überexpression auf den zellulären Schaden nach Lebertransplantation von reduzierten Lebern. Warum die Reduktion *per se* zu einem Anstieg der Transaminasen führt, ist nicht definitiv zu erklären. Möglicherweise unterliegen sie durch die *Manipulation backtable* im Rahmen der Vorbereitung auf die Implantation und Größenreduktion einer Schädigung, wobei es sich eher um eine geringfügige Schädigung handelt, da diese Prozeduren mit äußerster Vorsicht hinsichtlich Manipulation durchgeführt worden waren. Zudem potenziert sich bei einem reduzierten Organ durch Einschwemmung verschiedener Mediatoren und Faktoren wie z.B. Endotoxin die schädigende Potenz durch verminderte Parenchymmasse und es ist anzunehmen, dass dies die entscheidende Rolle spielen könnte. Ganz offensichtlich kommt den toxischen Radikalen, auch den extern produzierten Radikalen, eine wesentliche Bedeutung zu, da bei Ad.SOD1 infizierten Organen solch ein ausgeprägt protektiver Effekt zu verzeichnen war.

Die Lebertransaminasen spiegeln die parenchymatöse Schädigung wieder. Das gesamte Bilirubin im Serum hingegen ist ein Parameter der zellulären Exkretion und diese ist ein sehr

guter Parameter für die Leberfunktion, welcher 24 h nach Reperfusion im Serum gemessen wurde. Die Ergebnisse überraschten nicht, eine verminderte Zellschädigung führte zu einer verbesserten zellulären Exkretion als Parameter der Zellfunktion (Abb. 28). Durch Gentransfer mittels Ad.SOD1 ist es bei Split-Lebern möglich, die Zellfunktion auf dem Niveau einer vollständigen Transplantatleber unter identischen Bedingungen zu halten (Abb. 27 & 29).

Nachdem gezeigt worden war, dass die Überexpression von SOD auch bei *reduced size* Lebern zu einer hervorragenden Organprotektion führt, galt es zu überprüfen, welchen Einfluß diese Maßnahme auf den entscheidenden Parameter, das Überleben haben würde. Das drastisch verbesserte Überleben bei den Ad.SOD1 Tieren (Abb. 29) läßt sich neben deutlich vermindertem zelluläre Schaden und dem damit einhergehenden signifikant besseren Regenerationsvermögen (s.u.) begründen (Abb.30-32).

Um das Regenerationsverhalten der reduzierten Lebern zu untersuchen, wurden neben dem BrdU-Staining (Immunhistochemie) auch molekulare Marker, sowie auch ganz einfach das Gewicht von Lebergewebe untersucht. Das Gewicht der Lebern hängt postoperativ stark vom Schwellungszustand des Organes (Ödem) ab, sodass sowohl feuchtes, als auch Lebertrockengewicht bestimmt wurde. Nach 7 postoperativen Tagen zeigte sich, dass die Ad.SOD1 Lebern bereits signifikant an Masse im Vergleich zum Ausgangsgewicht zugenommen hatten, was trotz der relativ unsensiblen Messung für eine gesteigerte Regenerationsfähigkeit spricht.

Als sensibleres Verfahren wurde das immunhistochemische Nachweisverfahren von BrdU (5-Bromo-2'-Deoxyuridin) angewendet, welches in sich teilende Zellkerne eingebaut wird und so einen sehr eindeutigen Überblick in histologischen Untersuchungen erlaubt. Die morphometrische Auswertung zeigte eindeutig die BrdU-positiven Zellen 24h nach

Reperfusion, welche für eine dramatisch gesteigerte Regeneration bei Ad.SOD1 behandelten Split-Lebern sprach (Abb. 30-32).

Diese eindeutigen Ergebnissen sollten durch den Nachweis von entsprechenden Faktoren im Zellzyklus Signalweg bestätigt werden. Hierzu boten sich insbesondere Cyclin D1 und p21 als regulierende Faktoren an. Diese wurden im Western Blot von homogenisiertem Gewebe ebenso 24h nach Reperfusion untersucht. Auch hier erkannte man, dass Organprotektion mittels Ad.SOD1 zu einer deutlich akzellerierten Zellproliferation führte (Abb. 33). Somit stimmten die beschriebenen Beobachtungen überein und es konnte eindeutig die Aussage getroffen werden, dass die ausgezeichneten Überlebensdaten auch mit der verkürzten kritischen Phase von grenzwertig wenig bzw. zu wenig Lebermasse erklärt werden können.

Zusammenfassend konnte eindeutig bewiesen werden, dass ein verbesserter Schutz mittels Überexpression von Cu/Zn-SOD vor dem Ischämie/Reperfusionsschaden von größenreduzierten Lebertransplantaten zu einer deutlich beschleunigten und ausgeprägteren Organregeneration führt. Somit kann man die kritische Phase insbesondere bei grenzwertiger Organgröße sehr kurz halten. Zudem werden die Organe vor dem Ischämie/Reperfusionsschaden geschützt mit der Folge, dass nicht nur die Rate an primärem Organversagen sinkt, sondern somit vor allem auch die minimale Größe eines gerade noch transplantierbaren Teilorganes sinkt. Folglich erhält man einen etwas großzügigeren Sicherheitsspielraum, um eine Implantation durchführen zu können. Weiterhin kann man durch den Gentransfer von SOD, durchgeführt beim Organlebendspender, das im Spender verbleibende Restorgan vor den Folgen einer warmen Ischämie und auch der Manipulation schützen. Mit dieser faszinierenden Technik könnte man in Zukunft den Empfängerpool von Lebertransplantaten um eine Gruppe erweitern, welche derzeit überhaupt kein geeignetes Organ erhalten kann, oder aber dieses quasi zu spät erhalten könnte. Hierbei ist in erster Linie

an Patienten mit hepatozellulärem Karzinom oder aber Patienten in einem Alter von über 65 Jahre zu denken.

4.10 Klinische Relevanz der dargestellten Versuche

Wie bereits unter 4.9 dargestellt ist stellt sich bei der Verwendung von Adenoviren als Vektoren im Rahmen der Lebertransplantation als der wesentlicher Nachteil für die Lebertransplantation der Faktor Zeit ein. Wie bereits angedeutet ist dieses Zeitintervall von 72 h äußerst kritisch für die Anwendung von Gentransfertechniken unter klinischen Bedingungen, da das Zeitintervall von Hirntoddiagnostik und Einverständnis bis zur Organentnahme deutlich kürzer als 72 h, ja sogar kürzer als 48 h ist. Folglich sollte bei einem potentiellen Organspender der Gentransfer so früh wie möglich durchgeführt werden, um hohe Spiegel der Proteinexpression vor Organentnahme zu erreichen, sofern die individuellen, ethischen und juristischen Gegebenheiten dies überhaupt erlauben. Ein wichtiges Einsatzgebiet des adenoviralen Gentransfers stellt die „elektive“ Lebertransplantation in Form der Leberlebendspende dar, welche das Problem der zeitlich ausreichenden Inkubationsphase nicht kennt, wie dies oben ausführlich dargestellt wurde.

Ein weiterer möglicher Nachteil des Einsatzes eines Adenovirus unter klinischen Bedingungen scheint die Tatsache zu sein, dass Adenoviren zu einer akuten Hepatitis führen können, indem sie das Immunsystem aktivieren [218]. Diese Reaktion ist abhängig von der Dosierung und der Inkubationszeit. In den hier gezeigten Versuchen konnte kein zusätzlicher Schaden für Spendertiere oder Transplantate selbst aufgezeigt werden. Folglich kann man davon ausgehen, dass die durch das Adenovirus getriggerte Immunantwort durch eine niedrige Virusdosierung minimiert werden kann [154]. Außerdem ist es anzunehmen, dass unter klinischen Bedingungen die im Transplantat verbliebenen Adenoviren im Empfänger keine immunologische Reaktion hervorrufen können, da der Empfänger immunsupprimiert ist. Die Hemmung der Immunreaktion auf Adenoviren wurde durch Einsatz des

Immunsuppressivums *Cyclosporin A* gezeigt [147]. Da die rekombinanten Adenoviren apathogen sind, sind andere Erkrankungen als die immunologische Reaktion unwahrscheinlich. Die genannten Nachteile des Verfahrens des adenoviralen Gentransfers scheinen überwindbar zu sein und sollten nicht die herausragenden Vorteile und die überzeugende Effektivität des Technik abschwächen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der adenovirale Gentransfer dazu geeignet ist, das gewünschte Protein in der Leber erfolgreich zu überexprimieren. Diese Studie weist zum ersten Mal nach, dass ein adenoviraler Gentransfer mit SOD die Organschädigung nach Lebertransplantation vermindert und die Überlebensrate erhöht. Der adenovirale Gentransfer von SOD stellt ein ausgezeichnetes therapeutisches Verfahren für die Zukunft dar, um Organe vor reperusionsbedingtem Versagen zu schützen. Insbesondere grenzwertig verfettete Spenderlebern könnten hiermit genetisch modifiziert werden, um die hohe primäre Versagensquote dieser Organe zu vermindern und das Überleben der Empfänger sicherzustellen. Marginale Organe könnten ohne erhöhtes Risiko für den Empfänger eingesetzt werden. Der Gentransfer unter Einsatz von sicheren und apathogenen Vektorsystemen könnte also den Einsatz von bisher marginalen Organen sichern und somit den Spenderpool erweitern, was zu einer niedrigeren Todesrate auf der Warteliste führen würde.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Starzl, T. E.; Demetris, A. J. und van Thiel, D. (1989): Liver transplantation (First of two parts), *New England Journal of Medicine* (Band 321), Seite 1014-1022.
- [2] (1994): Consensus Conference on Indications of Liver Transplantation. Paris, France, June 22-23, 1993, *Hepatology* (Band 20), Nr. 1 Pt 2, Seite 1S-68S.
- [3] Jonas, S.; Herrmann, M.; Rayes, N.; Berg, T.; Radke, C.; Tullius, S.; Settmacher, U.; Steinmuller, T. und Neuhaus, P. (2001): Survival after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis according to the underlying liver disease , *Transplantation Proceedings* (Band 33), Nr. 7-8, Seite 3444-3445.
- [4] Jonas, S.; Bechstein, W. O.; Steinmuller, T.; Herrmann, M.; Radke, C.; Berg, T.; Settmacher, U. und Neuhaus, P. (2001): Vascular invasion and histopathologic grading determine outcome after liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis, *Hepatology* (Band 33), Nr. 5, Seite 1080-1086.
- [5] Mueller, A. R.; Platz, K. P.; Krause, P.; Kahl, A.; Rayes, N.; Glanemann, M.; Lang, M.; Wex, C.; Bechstein, W. O. und Neuhaus, P. (2000): Perioperative factors influencing patient outcome after liver transplantation, *Transplant International* (Band 13 Suppl 1), Nr. 1997, Seite Chirurgie.
- [6] Platz, K. P.; Mueller, A. R.; Spree, E.; Schumacher, G.; Nussler, N. C.; Rayes, N.; Glanemann, M.; Bechstein, W. O. und Neuhaus, P. (2000): Liver transplantation for alcoholic cirrhosis, *Transplant International* (Band 13 Suppl 1), Nr. 1997, Seite Chirurgie.
- [7] Starzl, T. E. und Demetris, A. J. (1990): Liver transplantation: a 31-year perspective. Part II, *Curr.Probl.Surg.* (Band 27), Nr. 3, Seite 117-178. URL: PM:2406111
- [8] Belzer, F. O. und Southard, J. H. (1988): Principles of solid-organ preservation by cold storage, *Transplantation* (Band 45), Seite 673-676.
- [9] Kalayoglu, M.; Stratta, R. J.; Hoffmann, R. M.; Sollinger, H. W.; D'Alessandro, A. M.; Pirsch, J. D. und Belzer, F. O. (1988): Extended preservation of the liver for clinical transplantation, *The Lancet* (Band March 19), Seite 617-619.
- [10] Iwatsuki, S.; Shaw, B. W. und Starzl, T. E. (1985): Five-year survival after liver transplantation, *Transplantation Proceedings* (Band 17), Seite 259-263.

- [11] Mirza, DF.; Gunson, BK.; DaSilva, RF.; Mayer, AD.; Buckels, AC. und McMasters, P. (1994): Policies in Europe on "marginal quality" donor livers., *Lancet*. (Band 344), Seite 1480-1483.
- [12] Everhart, J. E.; Lombardero, M. ; Detre, K. M.; Zetterman, R. K.; Wiesner, R. H.; Lake, J. R. und Hoofnagle, J. H. (1997): Increased waiting time for liver transplantation results in higher mortality., *Transplantation* (Band 64), Nr. 9, Seite 1300-1306. URL: PMID: 9371672, UI: 98037723
- [13] Ploeg, R. J.; D'Alessandro, A. M.; Knechtle, S. J.; Stegall, M. D.; Pirsch, J. D.; Hoffmann, R. M.; Sasaki, T.; Sollinger, H. W.; Belzer, F. O. und Kalayoglu, M. (1993): Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--A multivariate analysis, *Transplantation* (Band 55), Seite 807-813.
- [14] Todo, S.; Demetris, A. J.; Makowa, L.; Teperman, L.; Shaver, T.; Tzakis, A. und Starzl, T. E. (1989): Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration, *Transplantation* (Band 47), Nr. 5, Seite 903-905.
- [15] Markmann, J. F.; Markmann, J. W.; Markmann, D. A.; Bacquerizo, A.; Singer, J.; Holt, C. D.; Gornbein, J.; Yersiz, H.; Morrissey, M.; Lerner, S. M.; McDiarmid, S. V. und Busuttil, R. W. (2001): Preoperative factors associated with outcome and their impact on resource use in 1148 consecutive primary liver transplants, *Transplantation* (Band 72), Nr. 6, Seite 1113-1122 .
- [16] Markin, R. S.; Wisecarver, J. L.; Radio, S. J.; Stratta, R. J.; Langnas, A. N.; Hirst, K. und Shaw, B. W. (1993): Frozen section evaluation of donor livers before transplantation., *Transplantation* (Band 56), Seite 1403-1409.
- [17] Hilden, M.; Christoffersen, P.; Juhl, E. und Dalgaard, J. B. (1977): Liver histology in a 'normal' population - Examinations of 503 consecutive fatal traffic accidents, *Scand J Gastroent* (Band 12), Seite 593-597.
- [18] Strasberg, S. M.; Howard, T. K. ; Molmenti, E. P. und Hertl, M. (1994): Selecting the donor liver: Risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation, *Hepatology* (Band 20), Nr. 4, Seite 829-838.
- [19] Pruij, J.; Klompaker, I. J.; Haagsma, E. B.; Bijleveld, C. M. und Slooff, M. J. H. (1993): Selection criteria for liver donation: a review, *Transplant International* (Band 6), Seite 226-235.

- [20] Broelsch, C. E.; Emond, J. C.; Thistlethwaite, J. R.; Rouch, D. A.; Whittington, P. F. und Lichtor, J. L. (1988): Liver transplantation with reduced-size donor organs, *Transplantation* (Band 45), Seite 519-524.
- [21] Emond, J. C.; Whittington, P. F. ; Thistlethwaite, J. R.; Cherqui, D.; Alonso, E. A.; Woodle, I. S.; Vogelbach, P.; Busse-Henry, S. M.; Zucker, A. R. und Broelsch, C. E. (1990): Transplantation of two patients with one liver. Analysis of a preliminary experience with 'split-liver' grafting, *Annals of Surgery* (Band 212), Seite 14-22.
- [22] Grewal, H. P.; Thistlewaite, J. R., Jr.; Loss, G. E.; Fisher, J. S.; Cronin, D. C.; Siegel, C. T.; Newell, K. A.; Bruce, D. S. ; Woodle, E. S.; Brady, L.; Kelly, S.; Boone, P.; Oswald, K. und Millis, J. M. (1998): Complications in 100 living-liver donors, *Ann Surg* (Band 228), Nr. 2, Seite 214-219. URL: PM:0009712567
- [23] Malago, M.; Burdelski, M. und Broelsch, C. E. (1999): Present and future challenges in living related liver transplantation, *Transplant Proc* (Band 31), Nr. 4, Seite 1777-1781. URL: PM:0010371950
- [24] Marcos, A. (2000): Right-lobe living donor liver transplantation, *Liver Transpl.* (Band 6), Nr. 6 Suppl 2, Seite S59-S63.
- [25] Marcos, A.; Fisher, R. A.; Ham, J. M.; Olzinski, A. T.; Shiffman, M. L.; Sanyal, A. J.; Luketic, V. A.; Sterling, R. K.; Olbrisch, M. E. und Posner, M. P. (2000): Selection and outcome of living donors for adult to adult right lobe transplantation, *Transplantation* (Band 69), Nr. 11, Seite 2410-2415.
- [26] Renz, J. F. und Busuttil, R. W. (2000): Adult-to-adult living-donor liver transplantation: a critical analysis, *Semin.Liver Dis.* (Band 20), Nr. 4, Seite 411-424.
- [27] Broering, D. C.; Topp, S.; Schaefer, U.; Fischer, L.; Gundlach, M.; Sterneck, M.; Schoder, V.; Pothmann, W. und Rogiers, X. (2002): Split liver transplantation and risk to the adult recipient: analysis using matched pairs, *J.Am.Coll.Surg.* (Band 195), Nr. 5, Seite 648-657.
- [28] Kiuchi, T.; Inomata, Y.; Uemoto, S.; Asonuma, K.; Egawa, H.; Fujita, S.; Hayashi, M.; Uryuhara, K. und Tanaka, K. (2000): Evolution of living donor liver transplantation in adults: a single center experience, *Transplant International* (Band 13 Suppl 1), Nr. 1997, Seite Chirurgie.
- [29] Fujita, S.; Kim, I. D.; Uryuhara, K.; Asonuma, K.; Egawa, H.; Kiuchi, T.; Hayashi, M.; Uemoto, S.; Inomata, Y. und Tanaka, K. (2000): Hepatic grafts from live donors: donor

morbidity for 470 cases of live donation, *Transplant International* (Band 13), Nr. 5, Seite 333-339.

[30] Beavers, K. L.; Sandler, R. S. und Shrestha, R. (2002): Donor morbidity associated with right lobectomy for living donor liver transplantation to adult recipients: a systematic review, *Liver Transpl.* (Band 8), Nr. 2, Seite 110-117.

[31] Beavers, K. L.; Sandler, R. S.; Fair, J. H.; Johnson, M. W. und Shrestha, R. (2001): The living donor experience: donor health assessment and outcomes after living donor liver transplantation, *Liver Transpl.* (Band 7), Nr. 11, Seite 943-947.

[32] Renz, J. F. und Roberts, J. P. (2000): Long-term complications of living donor liver transplantation, *Liver Transpl.* (Band 6), Nr. 6 Suppl 2, Seite S73-S76.

[33] Alexander, J. W. und Vaughn, W. K. (1991): The use of "marginal" donors for organ transplantation, *Transplantation* (Band 51), Nr. 1, Seite 135-141.

[34] D'Alessandro, A. M.; Kalayoglu, M.; Sollinger, H. W.; Hoffmann, R. M.; Reed, A.; Knechtle, S. J.; Pirsch, J. D.; Hafez, G. R. ; Lorentzen, D. und Belzer, F. O. (1991): The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation, *Transplantation* (Band 51), Seite 157-163.

[35] De Charlis, L.; Sansalone, C. V.; Rondinara, G. F.; Slim, O. A.; Aseni, P.; Rossetti, O.; Colella, G.; Della Volpe, A.; and Forti, D. (1995):

[36] Hassanein, T. I.; Gavalier, J. S.; Fishkin, D.; Gordon, R.; Starzl, T. E. und Van Thiel, D. H. (1991): Does the presence of a measurable blood alcohol level in a potential organ donor affect the outcome of liver transplantation?, *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* (Band 15), Seite 300-303 .

[37] Makowka, L.; Gordon, R. D.; Todo, S.; Ohkohchi, N.; Marsh, J. W.; Tzakis, A. G.; Yokoi, H.; Ligush, J.; Esquivel, C. O.; Satake, M.; Iwatsuki, S. und Starzl, T. E. (1987): Analysis of donor criteria for the prediction of outcome in clinical liver transplantation., *Transplantation Proceedings* (Band 19), Nr. 1, Seite 2378-2382.

[38] Marsman, W. A.; Wiesner, R. H.; Rodrigues, L.; Batts, K. P.; Porayko, M. K.; Hay, J. E.; Gores, G. J. und Krom, R. A. F. (1997): Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival, *Transplantation* (Band 62), Nr. 9, Seite 1246-1251.

- [39] Nagano, H. und Tilney, N. L. (1997): Chronic allograft failure: the clinical problem, *Am.J Med Sci* (Band 313), Nr. 5, Seite 305-309.
- [40] Quiroga, J.; Colina, I.; Demetris, A. J.; Starlz, T. E. und Van Thiel, D. H. (1991): Cause and timing of first allograft failure in orthotopic liver transplantation: A study of 177 consecutive patients, *Hepatology* (Band 14), Seite 1054-1062.
- [41] Greig, P. D.; Woolf, G. M.; Sinclair, S. B.; Abecassis, M.; Strasberg, S. M.; Taylor, B. R.; Blendis, L. M.; Superina, R. A.; Glynn, M. F. X.; Langer, B. und Levy, G. A. (1989): Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E₁, *Transplantation* (Band 48), Seite 447-453.
- [42] Gao, W.; Connor, H. D.; Lemasters, J. J.; Mason, R. P. und Thurman, R. G. (1995): Primary nonfunction of fatty livers produced by alcohol is associated with a new, antioxidant-insensitive free radical species, *Transplantation* (Band 59), Seite 674-679.
- [43] Todo, S.; Demetris, A. J.; Makowka, L.; Tepperman, L.; Podesta, L.; Shaver, T.; Tzakis, A. und Starzl, T. E. (1989): Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration, *Transplantation* (Band 47), Seite 903-905.
- [44] Momii, S. und Koga, A. (1990): Time-related morphological changes in cold-stored rat livers. A comparison of Euro-Collins solution with UW solution, *Transplantation* (Band 50), Nr. 5, Seite 745-750.
- [45] Erhard, J.; Lange, R.; Scherer, R.; Kox, W. J.; Bretschneider, H. J.; Gebhard, M. M. und Eigler, F. W. (1994): Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study, *Transplant International* (Band 7), Nr. 3, Seite 177-181.
- [46] McKeown, C. M. B.; Edwards, V.; Phillips, M. J.; Harvey, P. R. C. ; Petrunka, C. N. und Strasberg, S. M. (1988): Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat, *Transplantation* (Band 46), Seite 178-191.
- [47] Caldwell-Kenkel, J. C.; Currin, R. T.; Tanaka, Y.; Thurman, R. G. und Lemasters, J. J. (1989): Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat liver, *Hepatology* (Band 10), Seite 292-299.
- [48] Caldwell-Kenkel, J. C.; Thurman, R. G. und Lemasters, J. J. (1988): Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers, *Transplantation* (Band 45), Seite 834-837.

- [49] Takei, Y.; Marzi, I.; Gao, W.; Gores, G. J.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1991): Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat, *Transplantation* (Band 51), Seite 959-965 .
- [50] Clavien, P. A.; Morgan, G.; Sanabria, J. R.; Harvey, P. R. C. und Strasberg, S. M. (1991): Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver., *Transplantation* (Band 52), Seite 412-417.
- [51] Marzi, I.; Knee, J.; Menger, M. D.; Harbauer, G. und Buhren, V. (1991): Hepatic microcirculatory disturbances due to portal vein clamping in the orthotopic rat liver transplantation model, *Transplantation* (Band 52), Seite 432-436.
- [52] Holloway, C. M. B.; Harvey, P. R. C. und Strasberg, S. M. (1990): Viability of sinusoidal lining cells in cold-preserved rat liver allografts, *Transplantation* (Band 49), Seite 225-229.
- [53] Gao, W.; Bentley, R. C.; Madden, J. F. und Clavien, P. A. (1998): Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation., *Hepatology* (Band 27), Nr. 6, Seite 1652-1660.
- [54] Sindram, D.; Porte, R. J.; Hoffman, M. R.; Bentley, R. C. und Clavien, P. A. (2000): Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver, *Gastroenterology* (Band 118), Nr. 1, Seite 183-191.
- [55] Marzi, I.; Zhong, Z.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1989): Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation, *Transplantation* (Band 48), Seite 463-468.
- [56] Thurman, R. G.; Bunzendahl, H. und Lemasters, J. J. (1993): Role of sinusoidal lining cells in hepatic reperfusion injury following cold storage and transplantation, *Seminars in Liver Disease* (Band 13), Seite 93-100.
- [57] Connor, H. D.; Gao, W.; Nukina, S.; Lemasters, J. J.; Mason, R. P. und Thurman, R. G. (1992): Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat -- An electron paramagnetic resonance spin trapping study, *Transplantation* (Band 54), Seite 199-204.
- [58] Jaeschke, H. und Farhood, A. (1991): Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver., *American Journal of Physiology* (Band 260), Seite G355-G362.

- [59] Jaeschke, H.; Bautista, A. P.; Spolarics, Z. und Spitzer, J. J. (1991): Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia, *Free Radical Research Communications* (Band 15), Seite 277-284.
- [60] Jaeschke, H.; Bautista, A. P.; Spolarics, Z. und Spitzer, J. J. (1992): Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during *in vivo* reperfusion after hepatic ischemia in rats, *J.Leukoc.Biol.* (Band 52), Seite 377-382.
- [61] Bulkley, G. B. (1983): The role of oxygen free radicals in human disease processes, *Surgery* (Band 94), Seite 407-411.
- [62] Bremer, C.; Bradford, B. U.; Hunt, K. J.; Knecht, K. T.; Connor, H. D.; Mason, R. P. und Thurman, R. G. (1994): Role of Kupffer cells in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury, *American Journal of Physiology* (Band 267), Seite G630-G636.
- [63] Persson, J. O.; Terelius, Y. und Ingelman-Sundberg, M. (1990): Cytochrome P450-dependent formation of reactive oxygen radicals: isozyme-specific inhibition of P450-mediated reduction of oxygen and carbon tetrachloride, *Xenobiotica* (Band 20), Seite 887-900.
- [64] Zhong, Z.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1989): Role of purines and xanthine oxidase in reperfusion injury in perfused rat liver, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Band 250), Seite 470-475.
- [65] Friedl, H. P.; Till, G. O.; Ryan, U. S. und Ward, P. A. (1989): Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells, *FASEB Journal* (Band 3), Seite 2512-2518.
- [66] Brass, C. A.; Narciso, J. und Gollan, J. L. (1991): Enhanced activity of the free radical producing enzyme xanthine oxidase in hypoxic rat liver, *The Journal of Clinical Investigation* (Band 87), Seite 424-431.
- [67] Arroyo, C. M.; Kramer, J. H.; Leiboff, R. H.; Mergner, G. W.; Dickens, B. F. und Weglicki, W. B. (1987): Spin trapping of oxygen and carbon-centered free radicals in ischemic canine myocardium, *Free Radicals Biology and Medicine* (Band 3), Seite 313-316.
- [68] Arroyo, C. M.; Kramer, J. H.; Dickens, B. F. und Weglicki, W. B. (1987): Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO, *FEBS Letters* (Band 221(1)), Seite 101 -104.

- [69] Kramer, J. H.; Arroyo, C. M.; Dickens, B. F. und Weglicki, W. B. (1987): Spin-trapping evidence that graded myocardial ischemia alters post-ischemic superoxide production, *Free Rad.Biol.& Med.* (Band 3), Seite 153-159.
- [70] Bachmann, S.; Caldwell-Kenkel, J. C.; Thurman, R. G.; and Lemasters, J. J. (1991):
- [71] Gao, W.; Takei, Y.; Marzi, I.; Lindert, K. A.; Caldwell-Kenkel, J. C.; Currin, R. T.; Tanaka, Y.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1991): Carolina Rinse solution: A new strategy to increase survival time after orthotopic liver transplantation in the rat, *Transplantation* (Band 52), Seite 417-424.
- [72] Clavien, P. A.; Harvey, P. R. C. und Strasberg, S. M. (1992): Preservation and perfusion injury in liver allografts., *Transplantation* (Band 53), Seite 957-978.
- [73] Takei, Y.; Marzi, I.; Gao, W.; Gores, G. G.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1991): Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat, *Transplantation* (Band 51), Seite 959-965 .
- [74] Koepfel, T. A.; Lehmann, T. G.; Thies, J. C.; Gehrcke, R.; Gebhard, M. M.; Herfarth, C.; Otto, G. und Post, S. (1996): Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation., *Transplantation* (Band 61), Nr. 9, Seite 1397-1409.
- [75] Takei, Y.; Marzi, I.; Kauffman, F. C.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1990): Increase in survival time of liver transplants from injury by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine., *Transplantation* (Band 50), Seite 14-20.
- [76] Gao, W.; Hijioka, T.; Lindert, K. A.; Caldwell-Kenkel, J. C.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1991): Evidence that adenosine is a key component in Carolina Rinse responsible for reducing graft failure after orthotopic liver transplantation in the rat, *Transplantation* (Band 52), Seite 992-998.
- [77] Currin, R. T.; Toole, J. G.; Thurman, R. G. und Lemasters, J. J. (1990): Evidence that Carolina rinse solution protects sinusoidal endothelial cells against reperfusion injury after cold ischemic storage of rat liver, *Transplantation* (Band 50), Seite 1076-1078.
- [78] Sanchez-Urdazpal, L.; Gores, G. J.; Lemasters, J. J.; Thurman, R. G.; Steers, J. L.; Wahlstrom, H. E.; Hay, E. I.; Porayko, M. K.; Wiesner, R. H. und Krom, R. A. F. (1993): Carolina Rinse solution decreases liver injury during clinical liver transplantation, *Transplantation Proceedings* (Band 25), Seite 1574-1575.

- [79] Vollmar, B.; Menger, M. D.; Glasz, J.; Leiderer, R. und Messmer, K. (1994): Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury, *American Journal of Physiology* (Band 267), Nr. 5 Pt 1, Seite G786-G793.
- [80] Hernandez, L. A.; Grisham, M. B.; Twohig, B.; Arfors, K. E.; Harlan, J. M. und Granger, D. N. (1987): Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury, *American Journal of Physiology* (Band 253), Seite H699-H703.
- [81] Hamamoto, I.; Nemoto, E. M.; Shimin, Z. und Todo, S. (1993): Severe tissue damage occurs during cold preservation of liver grafts, *Transplantation Proceedings* (Band 25), Nr. 6, Seite 3228-3229. URL: PM:8266524
- [82] Von Andrian, U. H.; Hansell, P. ; Chambers, J. D.; Berger, E. M.; Torres, Filho, I; Butcher, E. C. und Arfors, K. E. (1992): L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo, *American Journal of Physiology* (Band 263), Nr. 4 Pt 2, Seite H1034-H1044. URL: PM:0001384360
- [83] Steinhoff, G.; Behrend, M.; Schrader, B. und Pichlamyr, R. (1993): Intercellular adhesion molecules in human liver transplants: overview and expression patterns of leukocyte receptor and ligand molecules., *Hepatology* (Band 18), Seite 440-453.
- [84] Fusaoka, T.; Hunt, K. J.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1994): Evidence that activation of Kupffer cells increases oxygen uptake after cold storage, *Transplantation* (Band 58), Seite 1067-1071.
- [85] Thurman, R. G.; Marzi, I.; Seitz, G.; Thies, J.; Lemasters, J. J. und Zimmermann, F. A. (1988): Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat, *Transplantation* (Band 46), Seite 502-506.
- [86] Teramoto, K.; Bowers, J. L.; Kruskal, J. B. und Clouse, M. E. (1993): Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat, *Transplantation* (Band 56), Seite 1076-1082.
- [87] Adam, R.; Reynes, M.; Johann, M.; Morino, M.; Astacioglu, I.; Kafetzis, I.; Castaing, D. und Bismuth, H. (1991): The outcome of steatotic grafts in liver transplantation, *Transplantation Proceedings* (Band 23), Seite 1538-1540.
- [88] Knecht, K. T.; Adachi, Y.; and Thurman, R. G. (1993):

- [89] Adachi, Y.; Moore, L. E.; Bradford, B. U.; Gao, W. und Thurman, R. G. (1995): Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol, *Gastroenterology* (Band 108), Seite 218-224.
- [90] Adachi, Y.; Bradford, B. U.; Gao, W.; Bojes, H. K. und Thurman, R. G. (1994): Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury, *Hepatology* (Band 20), Seite 453-460.
- [91] Arteel, G. E.; Iimuro, Y.; Yin, M.; Raleigh, J. A. und Thurman, R. G. (1997): Chronic enteral ethanol treatment causes hypoxia in rat liver tissue *in vivo.*, *Hepatology* (Band 25), Nr. 4, Seite 920-926.
- [92] Ji, S.; Lemasters, J. J.; Christenson, V. R. und Thurman, R. G. (1982): Periportal and pericentral pyridine nucleotide fluorescence from the surface of the perfused liver: Evaluation of the hypothesis that chronic treatment with ethanol produces pericentral hypoxia, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 79), Seite 5415-5419.
- [93] Thurman, R. G.; Gao, W.; Connor, H. D.; Adachi, Y.; Stachlewitz, R. F.; Zhong, Z.; Knecht, K. T.; Bradford, B. U.; Mason, R. P. und Lemasters, J. J. (1995): Role of Kupffer cells in failure of fatty livers following liver transplantation and alcoholic liver injury, *J.Gastroenterol.Hepatol.* (Band 10 Suppl 1:S24-30), Seite S24-30.
- [94] D'Alessandro, A. M.; Kalayoglu, M.; Sollinger, H. W.; Hoffman, R. M.; Reed, A.; Knechtle, S. J.; Pirsch, J. D.; Hafez, G. R.; Larentzen, D. und Belzer, F. O. (1991): The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation., *Transplantation* (Band 51), Seite 157-163.
- [95] Taneja, C.; Prescott, L. und Koneru, B. (1998): Critical preservation injury in rat fatty liver is to hepatocytes, not sinusoidal lining cells, *Transplantation* (Band 65), Nr. 2, Seite 167-172.
- [96] Belghiti, J.; Noun, R.; Malafosse, R.; Jagot, P.; Sauvanet, A.; Pierangeli, F.; Marty, J. und Farges, O. (1999): Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study, *Annals of Surgery* (Band 229), Nr. 3, Seite 369-375.
- [97] Peralta, C.; Hotter, G.; Closa, D.; Gelpi, E.; Bulbena, O. und Rosello-Catafau, J. (1997): Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine , *Hepatology* (Band 25), Nr. 4, Seite 934-937.

- [98] Clavien, P. A.; Yadav, S.; Sindram, D. und Bentley, R. C. (2000): Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans, *Annals of Surgery* (Band 232), Nr. 2 , Seite 155-162.
- [99] Peralta, C.; Bulbena, O.; Xaus, C.; Prats, N.; Cutrin, J. C.; Poli, G.; Gelpi, E. und Rosello-Catafau, J. (2002): Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion, *Transplantation* (Band 73), Nr. 8, Seite 1203-1211.
- [100] Peralta, C.; Hotter, G.; Closa, D.; Prats, N.; Xaus, C.; Gelpi, E. und Rosello-Catafau, J. (1999): The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors, *Hepatology* (Band 29), Nr. 1, Seite 126-132.
- [101] Redaelli, C. A.; Tian, Y. H.; Schaffner, T.; Ledermann, M.; Baer, H. U. und Dufour, J. F. (2002): Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1, *Hepatology* (Band 35), Nr. 5, Seite 1082-1092.
- [102] Peralta, C.; Bartrons, R.; Riera, L.; Manzano, A.; Xaus, C.; Gelpi, E. und Rosello-Catafau, J. (2000): Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia, *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* (Band 279), Nr. 1, Seite G163-G171 .
- [103] Rudiger, H. A.; Kang, K. J.; Sindram, D.; Riehle, H. M. und Clavien, P. A. (2002): Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver, *Annals of Surgery* (Band 235), Nr. 3, Seite 400-407.
- [104] Columbano, A. (1995): Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo., *J.Cell.Biochem.* (Band 58), Seite 181-190.
- [105] Clavien, P. A.; Rudiger, H. A. und Selzner, M. (2001): Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis, *Hepatology* (Band 33), Nr. 6 , Seite 1555-1557.
- [106] Ichijo, H. (1999): From receptors to stress-activated MAP kinases, *Oncogene* (Band 18), Nr. 45, Seite 6087-6093. URL: PM:0010557099
- [107] Carini, R.; De Cesaris, M. G.; Splendore, R.; Vay, D.; Domenicotti, C.; Nitti, M. P.; Paola, D.; Pronzato, M. A. und Albano, E. (2001): Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes, *Hepatology* (Band 33), Nr. 1, Seite 131-139.

- [108] Schon, M. R.; Kollmar, O.; Wolf, S.; Schrem, H.; Matthes, M.; Akkoc, N.; Schnoy, N. C. und Neuhaus, P. (2001): Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion, *Annals of Surgery* (Band 233), Nr. 1, Seite 114-123.
- [109] Butler, A. J.; Rees, M. A.; Wight, D. G.; Casey, N. D.; Alexander, G.; White, D. J. und Friend, P. J. (2002): Successful extracorporeal porcine liver perfusion for 72 hr, *Transplantation* (Band 73), Nr. 8, Seite 1212-1218.
- [110] Matsumoto, K.; Honda, K. und Kobayashi, N. (2001): Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival, *Transplantation* (Band 71), Nr. 7, Seite 862-868.
- [111] Schlesinger, M. J. (1990): Heat shock proteins, *The Journal of Biological Chemistry* (Band 265), Nr. 21, Seite 12111-12114.
- [112] Kume, M.; Yamamoto, Y.; Saad, S.; Gomi, T.; Kimoto, S.; Shimabukuro, T.; Yagi, T.; Nakagami, M.; Takada, Y.; Morimoto, T. und Yamaoka, Y. (1996): Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury, *J.Lab Clin.Med* (Band 128), Nr. 3, Seite 251-258.
- [113] Jaeschke, H. (1995): Mechanisms of oxidative stress-induced acute tissue injury, *P.S.E.B.M.* (Band 209), Seite 104-111.
- [114] Jaeschke, H.; Farhood, A. und Smith, C. W. (1990): Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver *in vivo*, *FASEB Journal* (Band 4), Seite 3355-3359.
- [115] Jaeschke, H. und Mitchell, J. R. (1989): Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury , *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Band 160), Seite 140-147.
- [116] Richter, C.; Park, J. W. und Ames, B. N. (1988): Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive, *Proc Natl Acad Sci USA* (Band 85), Seite 6465-6467.
- [117] Omar, R.; Nomikos, I.; Piccorelli, G.; Savino, J. und Agarwal, N. (1989): Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation, *Gut* (Band 30), Seite 510 -514.
- [118] Rauen, U.; Polzar, B.; Stephan, H.; Mannherz, H. G. und De Groot, H. (1999): Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species, *FASEB Journal* (Band 13), Nr. 1, Seite 155-168.

- [119] Lander, H. M. (1997): An essential role for free radicals and derived species in signal transduction, *FASEB Journal* (Band 11), Seite 118-124.
- [120] Cohen, G. M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochemical Journal* (Band 326), Nr. Pt 1, Seite 1-16.
- [121] Currin, R. T.; Caldwell-Kenkel, J. C.; Lichtman, S. N.; Bachmann, S.; Takei, Y.; Kawano, S.; Thurman, R. G. und Lemasters, J. J. (1996): Protection by Carolina rinse solution, acidotic pH, and glycine against lethal reperfusion injury to sinusoidal endothelial cells of rat livers stored for transplantation, *Transplantation* (Band 62), Nr. 11, Seite 1549-1558.
- [122] Gao, W.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1992): The second generation of Carolina Rinse, Solution II, improves graft survival following orthotopic liver transplantation in the rat by preventing reperfusion injury, *Transplant International* (Band 5), Seite S362-S365.
- [123] Bachmann, S.; Caldwell-Kenkel, J. C.; Oleksy, I.; Steffen, R.; Thurman, R. G. und Lemasters, J. J. (1992): Warm Carolina Rinse solution prevents graft failure from storage injury after orthotopic rat liver transplantation with arterialization, *Transplant International* (Band 5), Seite 108-114.
- [124] Bachmann, S.; Bechstein, W. O. ; Keck, H.; Lemmens, H. P.; Brandes, N.; John, A. K.; Lemasters, J. J. und Neuhaus, P. (1997): Pilot study: Carolina rinse solution improves graft function after orthotopic liver transplantation in humans., *Transplantation Proceedings* (Band 29), Nr. 1/2, Seite 390-392.
- [125] Strieter, R. M.; Remick, D. G. ; Ward, P. A.; Spengler, R. N.; Lynch, J. P.; Larrick, J. und Kunkel, S. L. (1988): Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Band 155), Seite 1230-1236.
- [126] Currin, R. T.; Lichtman, S. N.; Thurman, R. G.; and Lemasters, J. J. (1991):
- [127] Peng, X. X.; Currin, R. T.; Thurman, R. G. und Lemasters, J. J. (1995): Protection by pentoxifylline against normothermic liver ischemia/reperfusion in rats, *Transplantation* (Band 59), Nr. 11, Seite 1537-1541.
- [128] Ward, A. und Clissold, S. P. (1987): Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy, *Drugs* (Band 34), Nr. 1, Seite 50-97.

- [129] Husberg, B. S.; Genyk, Y. S. und Klintmalm, G. B. (1994): A new rat model for studies of the ischemic injury after transplantation of fatty livers: improvement after postoperative administration of prostaglandin., *Transplantation* (Band 57), Nr. 457, Seite 458.
- [130] Cattral, M. S.; Altraif, I.; Greig, P. D.; Blendis, L. und Levy, G. A. (1994): Toxic effects of intravenous and oral prostaglandin E therapy in patients with liver disease, *Am.J Med* (Band 97), Nr. 4, Seite 369-373.
- [131] Flaherty, J. T.; Pitt, B.; Gruber, J. W.; Heuser, R. R.; Rothbaum, D. A.; Burwell, L. R.; George, B. S.; Kereiakes, D. J.; Deitchman, D. und Gustafson, N. (1994): Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction, *Circulation* (Band 89), Nr. 5, Seite 1982-1991. URL: PM:0008181121
- [132] Hatori, N.; Sjoquist, P. O.; Marklund, S. L.; Pehrsson, S. K. und Ryden, L. (1992): Effects of recombinant human extracellular-superoxide dismutase type C on myocardial reperfusion injury in isolated cold-arrested rat hearts, *Free Radicals Biology and Medicine* (Band 13), Nr. 2, Seite 137-142. URL: PM:0001516840
- [133] Heberer, M.; Jorgensen, J.; Mihatsch, M. J.; Marx, A. und Landmann, J. (1991): Protective effect of allopurinol and superoxide dismutase in renal isografts in cyclosporin A-treated rats, *Ren Fail.* (Band 13), Nr. 4, Seite 233-242. URL: PM:0001780491
- [134] Kondo, S.; Segawa, T.; Tanaka, K.; Izawa, K.; Hashida, M. und Kanematsu, T. (1996): Mannosylated superoxide dismutase inhibits hepatic reperfusion injury in rats, *Journal of Surgical Research* (Band 60), Nr. 1, Seite 36-40.
- [135] Marzi, I.; Knee, J.; Buhren, V.; Menger, M. und Trentz, O. (1992): Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation, *Surgery* (Band 111), Nr. 1, Seite 90-97.
- [136] Pollak, R.; Andrisevic, J. H.; Maddux, M. S.; Gruber, S. A. und Paller, M. S. (1993): A randomized double-blind trial of the use of human recombinant superoxide dismutase in renal transplantation, *Transplantation* (Band 55), Nr. 1, Seite 57-60. URL: PM:0008420065
- [137] Land, W. und Zweler, J. L. (1997): Prevention of reperfusion-induced, free radical-mediated acute endothelial injury by superoxide dismutase as an effective tool to delay/prevent chronic renal allograft failure: a review., *Transplant Proc* (Band 29), Nr. 6, Seite 2567-2568.

- [138] Jaeschke, H.; Smith, C. W.; Clemens, M. G.; Ganey, P. E. und Roth, R. A. (1996): Mechanisms of inflammation liver injury: Adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils, *Toxicology and applied pharmacology* (Band 139), Seite 213-226.
- [139] Karlsson, K.; Sandstrom, J.; Edlund, A.; Edlund, T. und Marklund, S. L. (1993): Pharmacokinetics of extracellular-superoxide dismutase in the vascular system, *Free Radicals Biology and Medicine* (Band 14), Nr. 2, Seite 185-190. URL: PM:0008381106
- [140] Mizoe, A.; Kondo, S.; Azuma, T.; Fujioka, H.; Tanaka, K.; Hashida, M. und Kanematsu, T. (1997): Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat liver transplantation., *Journal of Surgical Research* (Band 73), Nr. 2, Seite 160-165.
- [141] Mizoe, A.; Kondo, S.; Azuma, T.; Fujioka, H.; Tanaka, K.; Hashida, M. und Kanematsu, T. (1997): Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat liver transplantation, *Journal of Surgical Research* (Band 73), Nr. 2, Seite 160-165.
- [142] Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; Saint-Basile, G.; Gross, F. ; Yvon, E.; Nusbaum, P.; Selz, F.; Hue, C.; Certain, S.; Casanova, J. L.; Bousso, P.; Deist, F. L. und Fischer, A. (2000): Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease, *Scienc* (Band 288), Nr. 5466, Seite 669-672.
- [143] Check, E. (2002): A tragic setback, *Nature* (Band 420), Nr. 6912, Seite 116-118.
- [144] Check, E. (2002): Regulators split on gene therapy as patient shows signs of cancer, *Nature* (Band 419), Nr. 6907, Seite 545-546.
- [145] Raper, S. E.; Yudkoff, M.; Chirmule, N.; Gao, G. P.; Nunes, F.; Haskal, Z. J.; Furth, E. E.; Propert, K. J.; Robinson, M. B.; Magosin, S.; Simoes, H.; Speicher, L.; Hughes, J.; Tazelaar, J.; Wivel, N. A.; Wilson, J. M. und Batshaw, M. L. (2002): A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency, *Hum.Gene Ther* (Band 13), Nr. 1, Seite 163-175.
- [146] Eck, S. L.; Alavi, J. B.; Judy, K.; Phillips, P.; Alavi, A.; Hackney, D.; Cross, P.; Hughes, J.; Gao, G.; Wilson, J. M. und Propert, K. (2001): Treatment of recurrent or progressive malignant glioma with a recombinant adenovirus expressing human interferon-beta (H5.010CMVhIFN-beta): a phase I trial, *Hum.Gene Ther* (Band 12), Nr. 1, Seite 97-113.

- [147] Elshami, A. A.; Kucharczuk, J. C.; Sterman, D. H.; Smythe, W. R.; Hwang, H. C.; Amin, K. M.; Litzky, L. A.; Albelda, S. M. und Kaiser, L. R. (1995): The role of immunosuppression in the efficacy of cancer gene therapy using adenovirus transfer of the herpes simplex thymidine kinase gene, *Annals of Surgery* (Band 222), Nr. 3, Seite 298-307. URL: PM:0007677460
- [148] Gleich, L. L.; Gluckman, J. L. ; Armstrong, S.; Biddinger, P. W.; Miller, M. A.; Balakrishnan, K.; Wilson, K. M.; Saavedra, H. I. und Stambrook, P. J. (1998): Alloantigen gene therapy for squamous cell carcinoma of the head and neck: results of a phase-1 trial, *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.* (Band 124), Nr. 10, Seite 1097-1104.
- [149] Ramesh, R.; Saeki, T.; Templeton, N. S.; Ji, L.; Stephens, L. C.; Ito, I.; Wilson, D. R.; Wu, Z.; Branch, C. D.; Minna, J. D. und Roth, J. A. (2001): Successful treatment of primary and disseminated human lung cancers by systemic delivery of tumor suppressor genes using an improved liposome vector, *Mol.Ther* (Band 3), Nr. 3, Seite 337-350.
- [150] Sterman, D. H.; Molnar-Kimber, K.; Iyengar, T.; Chang, M.; Lanuti, M.; Amin, K. M.; Pierce, B. K.; Kang, E.; Treat, J.; Recio, A.; Litzky, L. ; Wilson, J. M.; Kaiser, L. R. und Albelda, S. M. (2000): A pilot study of systemic corticosteroid administration in conjunction with intrapleural adenoviral vector administration in patients with malignant pleural mesothelioma, *Cancer Gene Ther* (Band 7), Nr. 12, Seite 1511-1518.
- [151] Kim, D.; Martuza, R. L. und Zwiebel, J. (2001): Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *AB: , Nat.Med* (Band 7), Nr. 7, Seite 781-787.
- [152] Dettweiler, U. und Simon, P. (2001): Points to consider for ethics committees in human gene therapy trials, *Bioethics.* (Band 15), Nr. 5-6, Seite 491-500.
- [153] Kovesdi, I.; Brough, D. E.; Bruder, J. T. und Wickham, T. J. (1997): Adenoviral vectors for gene transfer, *Curr Opin Biotechnol.* (Band 8), Nr. 5, Seite 583-589. URL: PM:0009353227
- [154] Ritter, T.; Lehmann, M. und Volk, H. D. (2002): Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors, *BioDrugs.* (Band 16), Nr. 1, Seite 3-10.
- [155] Klimatcheva, E.; Rosenblatt, J. D. und Planelles, V. (1999): Lentiviral vectors and gene therapy, *Front Biosci.* (Band 4), Seite D481-D496. URL: PM:0010352135

- [156] Robbins, R. D. und Ghivizzani, S. C. (1998): Viral vectors for gene therapy, *Pharmacol.Ther.* (Band 80), Seite 35-47.
- [157] Schiedner, G.; Hertel, S.; Johnston, M.; Biermann, V.; Dries, V. und Kochanek, S. (2002): Variables affecting in vivo performance of high-capacity adenovirus vectors, *Journal of Virology* (Band 76), Nr. 4, Seite 1600-1609.
- [158] Schiedner, G.; Morral, N.; Parks, R. J.; Wu, Y.; Koopmans, S. C.; Langston, C.; Graham, F. L.; Beudet, A. L. und Kochanek, S. (1998): Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity, *Nat.Genet.* (Band 18), Nr. 2, Seite 180-183.
- [159] Wilson, D. R. (2002): Viral-mediated gene transfer for cancer treatment, *Curr.Pharm.Biotechnol.* (Band 3), Nr. 2, Seite 151-164.
- [160] Cemazar, M.; Sersa, G.; Wilson, J.; Tozer, G. M.; Hart, S. L.; Grosel, A. und Dachs, G. U. (2002): Effective gene transfer to solid tumors using different nonviral gene delivery techniques: electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector, *Cancer Gene Ther* (Band 9), Nr. 4, Seite 399-406.
- [161] Cowan, K. H.; Moscow, J. A.; Huang, H.; Zujewski, J. A.; O'Shaughnessy, J.; Sorrentino, B.; Hines, K.; Carter, C.; Schneider, E.; Cusack, G.; Noone, M.; Dunbar, C.; Steinberg, S.; Wilson, W.; Goldspiel, B.; Read, E. J.; Leitman, S. F.; McDonagh, K.; Chow, C.; Abati, A.; Chiang, Y.; Chang, Y. N.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. und Nienhuis, A. (1999): Paclitaxel chemotherapy after autologous stem-cell transplantation and engraftment of hematopoietic cells transduced with a retrovirus containing the multidrug resistance complementary DNA (MDR1) in metastatic breast cancer patients, *Clin.Cancer Res.* (Band 5), Nr. 7, Seite 1619-1628.
- [162] Bruder, J. T. und Kovesdi, I. (1997): Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signaling pathway and induces interleukin-8 expression, *J Virol.* (Band 71), Nr. 1, Seite 398-404. URL: PM:0008985363
- [163] Fisher, K. D.; Stallwood, Y.; Green, N. K.; Ulbrich, K.; Mautner, V.; and Seymour, L. W. (2001):
- [164] DeMatteo, R. P.; McClane, S. J.; Fisher, K.; Yeh, H.; Chu, G.; Burke, C. und Raper, S. E. (1997): Engineering tissue-specific expression of a recombinant adenovirus: selective transgene transcription in the pancreas using the amylase promoter, *Journal of Surgical Research* (Band 72), Nr. 2, Seite 155-161.

- [165] Jaffe, H. A.; Danel, C.; Longenecher, G.; Metzger, M.; Setoguchi, Y.; Rosenfeld, M. A.; Gant, T. W.; Thorgeirsson, S. S.; Stratford-Perricaudet, L. D. und Perricaudet, M. (1992): Adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer and expression in normal rat liver, *Nat.Genet.* (Band 1), Nr. 5, Seite 372-378.
- [166] Zwacka, R. M.; Zhou, W.; Zhang, Y.; Darby, C. J.; Dudus, L.; Halldorson, J.; Oberley, L. und Engelhardt, J. F. (1998): Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation., *Nature Medicine* (Band 4), Nr. 6, Seite 698-704. URL: PMID: 9623979, UI: 98285460
- [167] Li, Q.; Bolli, R.; Qiu, Y.; Tang, X. L.; Murphree, S. S. und French, B. A. (1998): Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits, *Circulation* (Band 98), Nr. 14, Seite 1438-1448.
- [168] Bilbao, G.; Contreras, J. L.; Gomez-Navarro, J.; Eckhoff, D. E.; Mikheeva, G.; Krasnykh, V.; Hynes, T.; Thomas, F. T.; Thomas, J. M. und Curiel, D. T. (1999): Genetic modification of liver grafts with an adenoviral vector encoding the BCL-2 gene improves organ preservation, *Transplantation* (Band 67), Seite 775-783.
- [169] Graham, F. L. und Prevec, L. (1995): Methods for construction of adenovirus vectors, *Mol.Biotechnol.* (Band 3), Nr. 3, Seite 207-220. URL: PM:0007552690
- [170] Sambrook, J.; Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- [171] Lieber, C. S. und DeCarli, L. M. (1989): Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update, *Alcohol and Alcoholism* (Band 24), Seite 197-211.
- [172] Lieber, C. S.; DeCarli, L. M. und Sorrell, M. F. (1989): Experimental models of ethanol administration., *Hepatology* (Band 10), Seite 501-510.
- [173] Lieber, C. S. und DeCarli, L. M. (1994): Animal models of chronic ethanol toxicity, *Methods Enzymol.* (Band 233), Seite 585-594.
- [174] Zhong, Z.; Connor, H. D.; Mason, R. P.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1998): Ethanol, not fat accumulation *per se*, increases free radical production in a low-flow, reflow liver perfusion model, *Transplantation* (Band 66), Seite 1431-1438.
- [175] Zhong, Z.; Connor, H.; Stachlewitz, R. F.; Frankenberg, M. v.; Mason, R. P.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1997): Role of free radicals in primary non-function of

marginal fatty grafts from rats treated acutely with ethanol., *Molecular Pharmacology* (Band 52), Seite 912-919 .

[176] Zhong, Z.; Arteel, G. E.; Connor, H. D.; Schemmer, P.; Chou, S. C.; Raleigh, J. A.; Mason, R. P.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1999): Binge drinking disturbs hepatic microcirculation after transplantation: prevention with free radical scavengers, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Band 290), Nr. 2, Seite 611-620.

[177] Kamada, N. und Calne, R. Y. (1979): Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage, *Transplantation* (Band 28), Seite 47-50.

[178] Kamada, N. und Calne, R. Y. (1983): A surgical experience with five hundred thirty liver transplantations in the rat, *Surgery* (Band 93), Seite 64-69.

[179] Schemmer, P.; Schoonhoven, R.; Swenberg, J. A.; Bunzendahl, H. und Thurman, R. G. (1997): Gentle *in situ* liver manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation: role of Kupffer cells, *Transplantation* (Band in press).

[180] McCord, J. M. und Fridovich, I. (1968): The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase, *The Journal of Biological Chemistry* (Band 243), Seite 5753-5760.

[181] McCord, J. M. und Fridovich, I. (1970): The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers., *The Journal of Biological Chemistry* (Band 245), Nr. 6, Seite 1374-1377.

[182] Ludde, T.; Kubicka, S.; Plumpe, J.; Liedtke, C.; Manns, M. P. und Trautwein, C. (2001): Ras adenoviruses modulate cyclin E protein expression and DNA synthesis after partial hepatectomy, *Oncogene* (Band 20), Nr. 38, Seite 5264-5278. URL: PM:11536040

[183] Enomoto, N.; Yamashina, S.; Schemmer, P.; Rivera, C. A.; Bradford, B. U.; Enomoto, A.; Brenner, D. A. und Thurman, R. G. (1999): Estriol sensitizes rat Kupffer cells via gut-derived endotoxin, *American Journal of Physiology* (Band 277), Nr. 3 Pt 1, Seite G671-G677.

[184] Iimuro, Y.; Nishiura, T.; Hellerbrand, C.; Behrns, K. E.; Schoonhoven, R.; Grisham, J. W. und Brenner, D. A. (1998): NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration, *J Clin Invest* (Band 101), Nr. 4, Seite 802-811.

- [185] Savier, E.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1994): Kupffer cells participate in rejection following liver transplantation in the rat, *Transpl Int* (Band 7), Seite S183-S186.
- [186] Bergmeyer, H. U. (1988): *Methods of enzymatic analysis*, Academic Press, New York.
- [187] Zabel, U.; Schreck, R. und Baeuerle, P. A. (1991): DNA binding of purified transcription factor NF- κ B. Affinity, specificity, Zn²⁺ dependence, and differential half-site recognition, *The Journal of Biological Chemistry* (Band 266), Seite 252-260.
- [188] Bradham, C. A.; Stachlewitz, R. F.; Gao, W.; Qian, T.; Jayadev, S.; Jenkins, G.; Hannun, Y. A.; Lemasters, J. J.; Thurman, R. G. und Brenner, D. (1997): Reperfusion after liver transplantation in rats differentially activates the mitogen activated protein kinases, *Hepatology* (Band 25), Seite 1128-1135.
- [189] Schwabe, R. F.; Bennett, B. L. ; Manning, A. M. und Brenner, D. A. (2001): Differential role of I kappa B kinase 1 and 2 in primary rat hepatocytes, *Hepatology* (Band 33), Nr. 1, Seite 81-90. URL: PM:11124824
- [190] Chirgwin, J. M.; Przybyla, A. E.; MacDonald, R. J. und Rutter, W. J. (1979): Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, *Biochemistry* (Band 18), Seite 5294-5299.
- [191] Mason, R. P. (1988): *An introduction to electron resonance and its application to the study of free radical metabolites, Reactive oxygen species in chemistry, biology, and medicine* , Plenum Press, New York.
- [192] Lancaster, J. R.; Langrehr, J. M.; Bergonia, H. A.; Murase, N. ; Simmons, R. L. und Hoffman, R. A. (1992): EPR Detection of Heme and Nonheme Iron-containing Protein Nitrosylation by Nitric Oxide during Rejection of Rat Heart Allograft, *The Journal of Biological Chemistry* (Band 267), Seite 10994-10998.
- [193] Mason, R. P. (1984): *Spin trapping free radical metabolites of toxic chemicals*, Holtzman, J. L., *Spin Labelling in Pharmacology* , Seite 87-129, Academic Press, New York.
- [194] Arroyo, C. M.; Kramer, J. H.; Leiboff, R. H.; Mergner, G. W.; Dickens, B. F. und Weglicki, W. B. (1987): Spin trapping of oxygen and carbon-centered free radicals in ischemic canine myocardium, *Free radical biology & medicine* (Band 3), Seite 313-316.

- [195] Janzen, E. G.; Stronks, H. J.; DuBose, C. M.; Poyer, J. L. und McCay, P. B. (1985): Chemistry and biology of spin-trapping radicals associated with halocarbon metabolism in vitro and in vivo, Environmental Health Perspectives (Band 64), Seite 151-170.
- [196] Nakazawa, H.; Arroyo, C. M.; Ichimori, K.; Saigusa, Y.; Minezaki, K. K. und Pronai, L. (1991): The demonstration of DMPO superoxide adduct upon reperfusion using a low non-toxic concentration, Free Radical Research Communications (Band 14), Seite 297-302.
- [197] Connor, H. D.; Galizi, M. D.; Thurman, R. G.; and Mason, R. P. (1985):
- [198] Duling, D. R. (1994): Simulation on multiple isotropic spin-trap EPR spectra, J.Magnetic Resonance (Band 104), Seite 105-110.
- [199] Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1997): Reperfusion injury after liver preservation for transplantation., Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology (Band 37), Seite 327-338.
- [200] Bremer, C.; Bradford, B. U.; Hunt, K. J.; Knecht, K. T.; Connor, H. D.; Mason, R. P. und Thurman, R. G. (1994): Role of the Kupffer cell in the pathogenesis of hepatic reperfusion injury, American Journal of Physiology (Band 267), Seite G630-G636.
- [201] Stachlewitz, R. F.; Gao, W.; Zhong, Z.; Connor, H. D.; Mason, R. P. und Thurman, R. G. (1998): Generation of lipid free radicals by adherent leukocytes from transplanted rat liver, Transpl.Int (Band 11), Nr. 5, Seite 353-360.
- [202] Adkinson, D.; Höllwarth, M. E.; Benoit, J. N.; Parks, D. A. ; McCord, J. M. und Granger, N. D. (1986): Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver., Acta Physiol.Scand. (Band Suppl. 548), Seite 101-107.
- [203] Connor, H. D.; Gao, W.; Nukina, S.; Lemasters, J. J.; Mason, R. P. und Thurman, R. G. (1992): Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat - an electron paramagnetic resonance spin trapping study, Transplantation (Band 54), Seite 199-204.
- [204] Horie, Y.; Wolf, R.; Flores, S. C.; McCord, J. M.; Epstein, C. J. und Granger, D. N. (1998): Transgenic mice with increased copper/zinc-superoxide dismutase activity are resistant to hepatic leukostasis and capillary no-reflow after gut ischemia/reperfusion., Circ Res (Band 83), Nr. 7, Seite 691-696.

- [205] Fujisawa, K; Saito, S.; Okada, Y; Fujiwara, T; Ota, K. und Tanaka, N. (1998): Possibility of gene transfer to the hepatic graft under cold preservation conditions, *Transplant Proc* (Band 30), Nr. 7, Seite 2911-2912.
- [206] Zhong, Z.; Connor, H. D.; Mason, R. P.; Qu, W.; Gao, W.; Lemasters, J. J. und Thurman, R. G. (1995): Role of Kupffer cells in reperfusion injury in fat-loaded livers from ethanol-treated rats, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Band 27), Seite 1512-1517.
- [207] Bradham, C. A.; Schemmer, P.; Stachlewitz, R. F.; Thurman, R. G. und Brenner, D. A. (1999): Activation of nuclear factor-kappaB during orthotopic liver transplantation in rats is protective and does not require Kupffer cells, *Liver Transpl Surg* (Band 5), Nr. 4, Seite 282-293. URL: PM:0010388501; <http://www.ltsjournal.org/cgi/content/full/5/4/282>; <http://www.ltsjournal.org/cgi/content/abstract/5/4/282>
- [208] Li, N. und Karin, M. (1999): Is NF-kB the sensor of oxidative stress?, *FASEB Journal* (Band 13), Seite 1137-1143.
- [209] Manna, S. K.; Zhang, H. J.; Yan, T.; Oberley, L. W. und Aggarwal, B. B. (1998): Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1, *The Journal of Biological Chemistry* (Band 273), Nr. 21, Seite 13245-13254. URL: PM:0009582369
- [210] Kuhnel, F.; Zender, L.; Paul, Y.; Tietze, M. K.; Trautwein, C.; Manns, M. und Kubicka, S. (2000): NFkappaB Mediates Apoptosis through Transcriptional Activation of Fas (CD95) in Adenoviral Hepatitis, *The Journal of Biological Chemistry* (Band 275), Nr. 9, Seite 6421-6427. URL: PM:0010692445
- [211] Verheij, M.; Bose, R.; Lin, X. H.; Yao, B.; Jarvis, W. D.; Grant, S.; Birrer, M. J.; Szabo, E.; Zon, L. I.; Kyriakis, J. M.; Haimovitz-Friedman, A.; Fuks, Z. und Kolesnick, R. N. (1996): Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress- induced apoptosis, *Nature* (Band 380), Nr. 6569, Seite 75-79. URL: PM:8598911
- [212] Breen, A. P. und Murphy, J. A. (1995): Reactions of oxyl radicals with DNA, *Free Radic.Biol Med* (Band 18), Nr. 6, Seite 1033-1077. URL: PM:0007628729
- [213] Wheeler, M. D.; Yamashina, S.; Froh, M.; Rusyn, I. und Thurman, R. G. (2001): Adenoviral gene delivery can inactivate Kupffer cells: role of oxidants in NF-kappaB

activation and cytokine production, *J.Leukoc.Biol.* (Band 69), Nr. 4, Seite 622-630. URL: PM:11310849

[214] Wheeler, M. D.; Katuna, M.; Smutney, O. M.; Froh, M.; Dikalova, A.; Mason, R. P.; Samulski, R. J. und Thurman, R. G. (2001): Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury, *Hum.Gene Ther.* (Band 12), Nr. 18, Seite 2167-2177. URL: PM:11779401

[215] Colletti, L. M.; Remick, D. G. ; Burtch, G. D.; Kunkel, S. L.; Strieter, R. M. und Campbell, D. A. (1990): The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiologic alterations following hepatic ischemia/reperfusion injury, *The Journal of Clinical Investigation* (Band 85), Seite 1936-1943.

[216] Lowenthal, J. W.; Ballard, D. W.; Bogerd, H.; Bohnlein, E. und Greene, W. C. (1989): Tumor necrosis factor-alpha activation of the IL-2 receptor-alpha gene involves the induction of kappa B-specific DNA binding proteins, *The Journal of Immunology* (Band 142), Nr. 9, Seite 3121-3128. URL: PM:0002785134

[217] Marshall, E. (1999): Gene therapy death prompts review of adenovirus vector [news], *Scienc* (Band 286), Nr. 5448, Seite 2244-2245. URL: PM:0010636774

[218] Muruve, D. A.; Barnes, M. J.; Stillman, I. E. und Liberman, T. A. (1999): Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo, *Hum.Gene Ther.* (Band 10), Seite 965-976.

Abkürzungsverzeichnis

Ad.lacZ	adenoviraler Vektor mit dem Gen für β -Galaktosidase
Ad.SOD1	adenoviraler Vektor mit dem Gen für zytosolische Superoxiddismutase
Ad.SOD2	adenoviraler Vektor mit dem Gen für mitochondriale Superoxiddismutase
Ad.SOD3	adenoviraler Vektor mit dem Gen für extrazelluläre Superoxiddismutase
Cu/Zn-SOD	zytosolische Superoxiddismutase
Ec-SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EtOH	Ethanol
LacZ	β -Galaktosidase
LTx	orthotope Lebertransplantation
Mn-SOD	mitochondriale Superoxiddismutase
PNF	primäres Transplantatversagen (<i>primary nonfunction</i>)
SOD1	zytosolische Superoxiddismutase
SOD2	mitochondriale Superoxiddismutase
SOD3	extrazelluläre Superoxiddismutase

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gebührt meinem Lehrer Herrn Professor Dr. Neuhaus für seine großzügige Unterstützung und Förderung, sowie die Ermöglichung der Habilitation an der Charité.

Weiterhin danke ich meinem früheren Chef Herrn em. Professor Dr. Herfarth für die Ermöglichung meiner experimentellen Forschungsarbeiten an der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg und seiner Unterstützung meines Auslandsaufenthaltes an der University of North Carolina, Chapel Hill. Herrn Professor Dr. S. Post verdanke ich die Einführung und Begeisterung in und für die experimentelle Chirurgie und die Mikrozirkulationsforschung.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die großzügige Unterstützung meines Auslandsaufenthaltes gedankt (DFG Le 1164/1-1 bis -3).

Während meiner experimentellen Forschungstätigkeit am Laboratory of Hepatobiology and Toxicology des Department of Pharmacology der University of North Carolina, Chapel Hill, NC, USA habe ich ein hervorragendes, hochproduktives und motiviertes Team um Herrn Professor Dr. Ronald G. Thurman kennengelernt und durfte ein Teil davon werden. Ihm verdanke ich eine intensive Lehre in grundlagenwissenschaftlicher Forschung, die unermüdlige Diskussion der beabsichtigten Projekte, der bearbeiteten Thematik, der Ergebnisse und der Präsentation der Daten. Er hat mich in die hochaktuelle wissenschaftliche Welt des Gentransfers eingeführt und meine Forschungsvorhaben auf diese Thematik konzentriert. Leider ist Ron Thurman im Jahre 2001 verstorben.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. H. Bunzendahl, Dept. of Surgery, University of North Carolina, Chapel Hill für seine vielfältige, kontinuierliche Unterstützung bis zum heutigen Tag. Wesentliche Unterstützung erhielt ich von Professor Dr. R. Jude Samulski, Direktor des Gene Therapy Center, University of North Carolina, Chapel Hill und seinen

Mitarbeitern Dr. Gabriele Kroner-Lux und Dr. Doug McCarty, die mich verlässlich mit einwandfreien adenoviralen Vektoren belieferten. Bei der Anfertigung der molekularbiologischen Untersuchungen wurde ich wesentlich von Professor Dr. D. Brenner, Direktor des Dept. of Gastroenterology, Internal Medicine der University of North Carolina, Chapel Hill (heute: Direktor der Dept. of Internal Medicine, Columbia University, New York) und seinem Mitarbeiter Robert Schwabe unterstützt. Die histopathologischen Evaluationen wurden "blind" von Dr. John Woosley, Department of Surgical Pathology, University of North Carolina at Chapel Hill nachuntersucht. Ohne seine Mithilfe wäre eine objektive Evaluation nicht möglich gewesen.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

11. Februar 2004

Datum

..gez. Thorsten Lehmann

Unterschrift