

5. DISKUSSION

5.1. Quantifizierung der rCAR-mRNA-Expression mittels kompetitiver RT-PCR

Die Northern-Blot-Hybridisierung als konventionelle Methode der mRNA-Analyse ist oftmals nicht sensitiv genug, um mRNA mit einer geringen Expressionsstärke nachweisen zu können und erlaubt zudem nur eine grobe Quantifizierung (Gilliland *et al.* 1990). So liegt die maximale Nachweisgrenze im Northern-Blot bei ca. 0,5 pg spezifischer mRNA (Haas, L. und Kaaden, O.R. 1987). Auch die CAR-mRNA wird in einigen Organen und in Abhängigkeit vom Entwicklungszeitpunkt nur gering exprimiert, so dass selbst bei der Verwendung von 2 µg polyA⁺-RNA (kommerzielle Blots) ein Nachweis von CAR-mRNA in einigen Organen (Skelettmuskulatur, Milz) nicht gelang bzw. im Bereich der Nachweisgrenze lag (Tomko *et al.* 1997; Bergelson *et al.* 1998; Fechner *et al.* 1999). Daneben gestattet die Northern-Blot-Hybridisierung keine Differenzierung in CAR1- und CAR2-mRNA. Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten kompetitiven RT-PCR war es möglich, die rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in unterschiedlichen Geweben und zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten sowie in verschiedenen Versuchsanstellungen an neonatalen Rattenkardiomyozyten quantitativ zu ermitteln und miteinander zu vergleichen.

Dazu erfolgte eine relative Quantifizierung der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression. Theoretisch entspräche die absolute mRNA-Expression je 100 ng Gesamt-RNA der jeweils eingesetzten Menge an RNA-Längenstandard (Tab. 4.5.), jedoch nur unter der Bedingung, dass der Quotient aus nativem PCR-Produkt und Standard-PCR-Produkt genau 1 ist, die eingesetzte Gesamt-RNA keinerlei Degradation aufweist und sowohl die fotometrisch ermittelte, als auch die eingesetzte RNA-Längenstandardkonzentration korrekt ist (also beispielsweise in 1 µl C2-Verdünnung auch tatsächlich 10 ng Standard-RNA enthalten sind), Anforderungen, deren Gewährleistung im Rahmen dieser Arbeit nicht in jedem Falle möglich, aber auch nicht zwingend erforderlich waren, da es sich um Verlaufsuntersuchungen handelte, bei denen relative und nicht absolute Expressionsänderungen erfasst wurden.

Die gewählte Versuchsanstellung, bei der für jeden Versuch ein neues Aliquot der entsprechenden Verdünnungsstufe eingesetzt wurde und die Entwicklungstage bzw. Organe, die miteinander verglichen werden sollten am gleichen Tag in einem gemeinsamen Versuchsansatz untersucht wurden, gewährleistete eine größtmögliche Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da sowohl Schwankungen in der eingesetzten Standardkonzentration

(Pipettierungenauigkeit; mögliche Instabilität des RNA-Längenstandards) als auch Systemeinflüsse (RT; PCR; Kapillarelektrophorese) relativiert werden konnten.

Die in der kompetitiven RT-PCR verwendeten Zykluszahlen lagen in einem Bereich, in dem die Amplifikatmenge noch annähernd exponentiell anstieg (Abb. 4.6.), wodurch mögliche Effizienzunterschiede in der Amplifikation von Längenstandard und Zielsequenz und eine daraus resultierende ungenaue Quantifizierung weitestgehend ausgeschlossen werden konnten (Wiesner *et al.* 1993; Dostal *et al.* 1994; Ruster *et al.* 1995). Es wäre jedoch bei einer geringeren mRNA-Expression auch möglich gewesen eine größere Anzahl von Zyklen zu verwenden und in der Plateau-Phase zu arbeiten, unter der Voraussetzung, dass der Längenstandard und die Zielsequenz mit der gleichen Effizienz und von identischen Primern amplifiziert werden (Bouaboula *et al.* 1992; Higuchi *et al.* 1992; ;Siebert and Larrick 1992; Higuchi *et al.* 1993; Cottrez *et al.* 1994; Morrison and Gannon 1994; Cross 1995; Haberhausen *et al.* 1998). Diese Bedingungen bestanden, da zum einen die verwendeten Längenstandards eine Deletion von 11 % (rCAR1 und rCAR2) bzw. 14 % (GAPDH) aufwiesen und eine Differenz von 10 bis 15 % keinen Einfluss auf die Amplifikationseffizienz besitzt (McCulloch *et al.* 1995) und zum anderen identische Primer eingesetzt wurden.

Um mögliche Schwankungen in der RNA-Qualität und -Konzentration auszugleichen, erfolgte in Anlehnung an die von Watzka *et al.* (1997) beschriebene Methode eine Relativierung der ermittelten CAR-mRNA-Expression gegenüber der GAPDH-mRNA-Expression.

Die Ermittlung eines GAPDH-Korrekturfaktors war notwendig, da auch die Expression von Referenzgenen (wie z.B. GAPDH) einer Regulation unterliegen kann (Siebert and Fukuda 1985, Elder *et al.* 1988; Murphy *et al.* 1990; Schmidt and Merrill 1991; Horikoshi *et al.* 1992; Zimmermann and Mannhalter 1996).

Festgestellt werden konnte, dass die GAPDH-mRNA-Expression in der Lunge reguliert wird und vor allem während der Embryonalentwicklung bis zum Zeitpunkt der Geburt abnimmt (Tab. 4.10. und Abb. 4.15.).

Der für den 84. Lebensstag (adult) in der Skelettmuskulatur und im Gehirn ermittelte Korrekturfaktor (Tab. 4.10.), spricht für einen Anstieg der GAPDH-mRNA-Expression zu diesem Zeitpunkt. Er konnte jedoch nicht durch die vergleichende Northern-Blot-Hybridisierung bestätigt werden (Abb. 4.11. und 4.13), möglicherweise aufgrund der geringeren Sensitivität der Northern-Blot-Hybridisierung gegenüber der kompetitiven RT-PCR, die Expressionsänderungen weniger deutlich werden lässt. In den anderen untersuchten

Organen konnte keine entwicklungsbedingte Regulation der GAPDH-mRNA-Expression beobachtet werden.

Die Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der kompetitiven RT-PCR zeigten sowohl für PCR und Fragmentanalyse an sich als auch für die reverse Transkription eine hohe Reproduzierbarkeit. So wurde bei der Wiederholung der PCR nur eine mittlere Abweichung von 5,3% (Leber) bis 35% (Gehirn) und bei der reversen Transkription von 28,8% zu den vorangegangenen Untersuchungen gefunden, wobei der Kurvenverlauf nahezu unverändert blieb. Daher wurde aus kosten- und zeitökonomischen Gründen auf weitere Doppelbestimmungen verzichtet.

5.2. rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression während der Organentwicklung

CAR wird der Immunglobulinklasse zugeordnet, deren Vertreter an zahlreichen Adhäsionsprozessen beteiligt sind und vermittelt die Bindung von Adenoviren und AdV an die Zelloberfläche (Tomko *et al.* 1997; Bergelson *et al.* 1998). Über die physiologische Rolle des Rezeptors ist jedoch bisher wenig bekannt. Untersuchungen von Honda *et al.* (2000) zeigten, dass CAR im sich entwickelnden Nervensystem von Mäusen als Adhäsionsmolekül fungieren kann. Daneben existieren Erkenntnisse, wonach CAR im Gehirn und im Herz während der embryonalen Phase sowie in verschiedenen unreifen Zellen [basale Zellen im geschichteten oropharyngealen Epithel (Hutchin *et al.* 2000), unreife Skelettmuskelfasern (Nalbantoglu *et al.* 1999; Cho *et al.* 2000)] bzw. sich regenerierenden Zellen [regenerierende Skelettmuskelfasern (Nalbantoglu *et al.* 1999)], in Herzmuskelzellen nach experimenteller Autoimmunmyokarditis (Ito *et al.* 2000) sowie in Herzmuskelzellen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (Noutsias *et al.* 2001) erhöht exprimiert wird. Die CAR-Expression während der Entwicklung wurde bisher hauptsächlich an Mäusen und vor allem am Gehirn, z.T. auch am Herzen untersucht (Hotta *et al.* 1998; Nalbantoglu *et al.* 1999; Honda *et al.* 2000; Ito *et al.* 2000), während Verlaufsuntersuchungen und Untersuchungen an anderen Organen weitestgehend fehlen. Untersuchungen über die bei Mensch, Maus und Ratte isolierten CAR-Isoformen (Bergelson *et al.* 1998; Fechner *et al.* 1999), die sich nur in ihrem C-terminalen Ende unterscheiden, zeigten bisher nur, dass beide Isoformen in verschiedenen Geweben adulter Mäuse exprimiert werden und beide Rezeptorfunktion besitzen (Bergelson *et al.* 1998). Daher untersuchte die vorliegende Arbeit die rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression in der peripartalen Periode, unter Berücksichtigung der letzten 5

Trächtigkeitstage sowie der ersten 6 Lebenstage und verglich sie mit der Expression juveniler (Tag 32 p.p.) und adulter Tiere (Tag 84 p.p.), wobei verschiedene Organe untersucht wurden, die sowohl gentherapeutisch relevant sind als auch vermuten lassen, dass mit der peri- bzw. postpartal einsetzenden quantitativ und qualitativ veränderten Organfunktion Expressionsveränderungen einhergehen könnten.

Die Untersuchung der CAR-mRNA-Expression in einzelnen Organen während der frühen Embryonalentwicklung war nicht möglich, da die geringe Größe des Embryos keine zuverlässige Identifizierung und Isolierung einzelner Organe erlaubte.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten, dass in allen untersuchten Organen sowohl rCAR1- als auch rCAR2-mRNA exprimiert wird (Abb. 4.1.). Dabei fiel die rCAR2-mRNA-Expression gegenüber der rCAR1-mRNA-Expression deutlich geringer aus. So lag der Anteil der rCAR2-Expression an der Summe aus rCAR1- und rCAR2-Expression fast ausschließlich unter 10% (im Mittel bei 3,8%, Streuung 2,4) (Abb. 4.30.). Dies lässt eine eher untergeordnete Bedeutung des rCAR2 als Virusrezeptor vermuten.

Der Verlauf der rCAR-mRNA-Expression im Herzen, wonach es sowohl für rCAR1 als auch für rCAR2 bei juvenilen und adulten Tieren gegenüber der hohen Expression im Geburtszeitraum zu einem deutlichen Rückgang der Expression kam [rCAR1 um Faktor 1,9 (juvenil) bzw. 6,2 (adult), rCAR2 um Faktor 3,4 (juvenil) bzw. 2,3 (adult) (Abb. 4.18. und 4.19.)], steht in Übereinstimmung zu Studien, die im Herzen von Mäusen (Hotta *et al.* 1998) bzw. Ratten ebenfalls während der Embryonalentwicklung bzw. bei neugeborenen Tieren eine hohe CAR-Expression fanden, die bei adulten Tieren stark abfiel bzw. nicht mehr nachweisbar war (Schachtner *et al.* 1999; Ito *et al.* 2000).

Die ermittelten hohen Expressionswerte in der embryonalen und peripartalen Phase lassen vermuten, dass CAR eine Bedeutung für die Entwicklung des Herzen besitzt. Weitere Untersuchungen zur Bedeutung der CAR-mRNA-Expression im kardialen System erfolgten an Rattenkardiomyozyten. Sie gestatteten auch Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung von CAR im Herzen, die im Rahmen dieser Untersuchungen diskutiert werden (siehe 5.3.)

Das Herz wies in den vorliegenden Untersuchungen, im Vergleich zu anderen Organen, in der embryonalen und neugeborenen Phase (Tag 19 p.c. und Tag 2 p.p.) nach dem Gehirn die höchste CAR-mRNA-Expression auf (Abb. 4.31. und 4.32.) und obwohl die Expression von rCAR1-mRNA nach dem 6. Lebenstag deutlich abnahm, wies das Herz gemeinsam mit Leber

und Lunge auch bei juvenilen Tieren (Tag 32 p.p.) im Vergleich zu anderen Organen die höchste Expression auf. Ähnliche Ergebnisse konnten auch von anderen Untersuchern bei der Ermittlung der CAR-mRNA-Expression in verschiedenen Organen des Menschen und adulter Mäuse und Ratten erhalten werden (Bergelson *et al.* 1998). Da die AdV-Aufnahme in engem Zusammenhang mit der CAR-Expression steht, könnte die hohe CAR-Expression, vor allem in der peripartalen Phase, maßgeblich die AdV-Aufnahme und damit die Gentransfereffizienz positiv beeinflussen, woraus sich gute Perspektiven für den potentiellen Einsatz adenoviraler Vektoren im Rahmen der Gentherapie ergeben können. So konnten bereits *in-vivo*-Untersuchungen mittels Vektorapplikation in die Dottersackgefäße von Mäuseembryonen zeigen, dass besonders das sich entwickelnde kardiovaskuläre System dem adenoviralen Gentransfer zugänglich ist (Schachtner *et al.* 1999)

In der Niere konnte, ähnlich wie im Herzen, bei juvenilen und adulten Tieren ein Rückgang der rCAR1- und rCAR2-mRNA-Expression festgestellt werden, der bei juvenilen Tieren (Tag 32 p.p.) ausgeprägter als bei adulten Tieren war (CAR1 Faktor 8,3 bzw. 1,3 gegenüber Tag 6 p.p., CAR2 Faktor 2,5 bzw. 1,3 gegenüber Tag 2 bis 6 p.p., Abb.). Die z.T. ausgeprägten Schwankungen im Expressionsverlauf, die bei CAR1 vor allem in der neugeborenen Phase, bei CAR2 vor allem in der embryonalen Phase auftraten, gestatten jedoch keine allgemeine Trendaussage. Nach Untersuchungen von Honda *et al.* (2000) wiesen neugeborene Mäuse in der Niere nur eine geringe CAR-mRNA-Expression auf. Tomko *et al.* (1997), Bergelson *et al.* (1998) und Fechner *et al.* (1999) fanden bei adulten Ratten und Mäusen, verglichen mit anderen Organen, eine relativ hohe CAR-mRNA-Expression in der Niere. Unsere Ergebnisse zeigen dagegen, dass die Niere peripartal eine mittlere und bei juvenilen Individuen eine eher geringe CAR1- und CAR2-mRNA-Expression aufweist. Möglicherweise ist die Ursache sowohl für diese Abweichungen als auch für die Schwankungen im Expressionsverlauf in größeren Unterschieden in der individuellen und zwischenartlichen CAR-Expression der Niere zu suchen.

Der im Gehirn ermittelte CAR-Expressionsverlauf bestätigt die Angaben anderer Untersucher. So wies das Rattengehirn in der embryonalen und neugeborenen Phase gegenüber anderen Organen die höchsten rCAR1-mRNA-Expressionswerte auf (Abb. 4.31). Dabei stieg die rCAR1-mRNA-Expression bis zum 5. Lebenstag leicht an und nahm nach dem 6. Lebenstag drastisch ab (um den Faktor 49,5 am Tag 32 p.p. gegenüber dem Mittelwert der Tage 5 und 6 p.p., Abb. 4.20.). Dies steht in Übereinstimmung zu Beobachtungen an

Mäusen, bei denen ebenfalls im Gehirn eine sehr hohe CAR-Expression in der embryonalen Phase ermittelt wurde, die bei adulten Tieren stark abnahm und z.T. nicht mehr nachweisbar war (Hotta *et al.* 1998; Schachtner *et al.* 1999; Honda *et al.* 2000; Tomko *et al.* 2000). Der vom CAR1-Expressionsverlauf abweichende Verlauf der rCAR2-mRNA-Expression, bei dem die höchsten Expressionswerte an den ersten untersuchten Entwicklungstagen (Tag 17 p.c., Tag 18 p.c.) ermittelt wurden und die Expression dann kontinuierlich abnahm (Abb. 4.21.), könnte dafür sprechen, dass rCAR2 bereits in der frühen Embryonalentwicklung von Bedeutung ist, möglicherweise in Gehirnabschnitten die sich zu diesem frühen Zeitpunkt entwickeln. So konnte gezeigt werden, dass die CAR-Expression in verschiedenen Gehirnabschnitten zeitlich versetzt auftritt (Honda *et al.* 2000).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass CAR im sich entwickelnden Nervensystem von Mäusen als homophiles Adhäsionsmolekül fungieren kann (Honda *et al.* 2000). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte hohe CAR-Expression im Rattengehirn während der embryonalen bzw. neugeborenen Phase, also zu einer Periode, in der zahlreiche neuronale Verbindungen aufgebaut werden, unterstützt diese Aussage, da eine transiente Expression von Adhäsionsmolekülen im Gehirn vor allem zu einem Zeitpunkt auftritt, wo die Neuronen hauptsächlich mit Zell-Zell-Interaktionen befasst sind (Hynes and Lander 1992; Goodman and Shatz 1993).

Auch in der Skelettmuskulatur fanden sich Beziehungen zwischen der rCAR-mRNA-Expression und dem Entwicklungszeitpunkt. Dabei zeigte sich für beide CAR-Isoformen ein ähnlicher Verlauf, bei dem die höchste Expression in der embryonalen Phase ermittelt werden konnte. Unmittelbar vor der Geburt (nach Tag 20 p.c.) kam es zu einem abrupten Rückgang der CAR-Expression und auch nach der neonatalen Phase nahm die Expression weiter ab, so dass juvenile und adulte Tiere eine äußerst geringe CAR-m-RNA-Expression aufwiesen. Dabei betrug der Faktor zwischen der höchsten Expression am Tag 20 p.c. und der niedrigsten Expression 190,9 (rCAR1 Tag 84 p.p.) bzw. 45,9 (rCAR2 Tag 32 p.p.) (Abb. 4.26. und 4.27.). Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass diese, in der embryonalen Phase erhöhte CAR-mRNA-Expression im Vergleich zur CAR-mRNA-Expression anderer Organe eher gering ist. So wies die Skelettmuskulatur gegenüber den anderen untersuchten Organen zu allen untersuchten Entwicklungszeitpunkten die geringste CAR1- und CAR2-mRNA-Expression auf (Abb. 4.31. und 4.32.). In Übereinstimmung zu diesen Ergebnissen konnten Nalbantoglu *et al.* (1999) mittels RT-PCR in der Skelettmuskulatur 3 Tage alter Mäuse eine geringe CAR-mRNA-Expression nachweisen, die bei adulten Tieren (Tag 60 p.p.) bis zur

Nachweisgrenze abfiel. Fechner *et al.* (1999) konnten mittels Northern-Blot zeigen, dass bei adulten Mäusen und Ratten die CAR-mRNA-Expression in der Skelettmuskulatur im Vergleich zu anderen Organen sehr gering ist und beim Menschen keine CAR-mRNA-Expression nachweisbar war.

Quergestreifte Skelettmuskelfasern entstehen vorwiegend durch die Fusion von Promyoblasten zu Myoblasten, die mit weiteren mononukleären Zellen zum Myotubus verschmelzen, der durch die Zunahme der Myofibrillen und Zellorganellen sowie die Herausbildung der Enzymmuster zur Muskelfaser wird (Michel 1986). Neugeborene Mäuse und Ratten verfügen über unreife Muskelfasern in Form von Myoblasten, während der Mensch zur Geburt nur reife Skelettmuskelfasern besitzt (Nalbantoglu *et al.* 1999). Untersuchungen von Nalbantoglu *et al.* (1999) und Cho *et al.* (2000) konnten zeigen, dass CAR in unreifen Skelettmuskelfasern (Primärzellkultur von Myoblasten 3 bis 5 Tage alter Mäuse) erhöht exprimiert wird und die CAR-Expression auch im Sarkolemm sich regenerierender Muskelfasern beträchtlich erhöht ist, wobei diese Regeneration ebenfalls unter der Beteiligung von Myoblasten erfolgt.

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse sowie der in dieser Arbeit ermittelten höchsten Expressionswerte in der embryonalen Phase, also zum Zeitpunkt der Muskelfaserentstehung durch Aneinanderlagerung und Fusion von Zellen, lässt sich vermuten, dass CAR auch in der sich entwickelnden Skelettmuskulatur als Adäsionsmolekül beim Aufbau von Zellkontakten fungiert.

Interessanterweise werden auch α_v -Integrine, die Adenoviren als Internalisierungsrezeptor dienen, in der Glia des ZNS und der Skelettmuskulatur von Mäusen dynamisch reguliert (Hirsch *et al.* 1994). So konnte präpartal ein hoher α_v -Integrinwert im Neuralrohr und in myotomalen Zellen nachgewiesen werden, der sich mit der fortschreitenden Entwicklung auf die radialen Gliafasern und den apikalen Teil des Myotubus konzentrierte. Am Tag 8 p.p. wurde eine starke Abnahme festgestellt und bei adulten Tieren konnte kein α_v -Integrin mehr nachgewiesen werden. Diese Verteilung steht in Übereinstimmung zu der Rolle, die α_v -Integrine bei der Neuron-Glia-Interaktion während der Organisation der neuronalen Schicht des Cortex und des Cerebellums und bei der myotendinalen Verbindung während der Embryonalentwicklung spielen und weist Parallelen zur CAR-Expression im Gehirn und in der Skelettmuskulatur auf (Hirsch *et al.* 1994).

Während es in Herz, Gehirn, Skelettmuskulatur und bedingt auch in der Niere mit zunehmender Organausreifung zu einer Abnahme der rCAR-mRNA-Expression kam, konnte

in der Lunge und der Leber keine derartige Beziehung gefunden werden. So wiesen juvenile und adulte Ratten in der Lunge eine ähnliche rCAR1-mRNA-Expression auf wie Feten und neonatale Tiere und in der Leber zeigte sich nur bei neonatalen Tieren eine geringfügig höhere rCAR1-mRNA-Expression (Abb. 4.22. und 4.28.). Die rCAR2-mRNA-Expression in der Lunge neonataler, juveniler und adulter Tiere betrug etwa das Doppelte der Expression bei Rattenfeten und auch in der Leber wiesen juvenile und adulte Tiere eine höhere Expression auf als Feten und neonatale Tiere (Abb. 4.23. und 4.29.).

Honda *et al.* (2000) konnten bei neugeborenen Mäusen in der Leber, nicht jedoch in der Lunge CAR-mRNA nachweisen, während Schachtner *et al.* (1999) bei Mäuseembryonen (Tag 12 p.c.) in der Leber und im Epithel der Luftwege eine hohe CAR-mRNA-Expression feststellen konnte. Die vorliegenden Untersuchungen zeigte bei Feten und neonatalen Tieren in der Lunge und der Leber eine vergleichsweise geringe CAR-mRNA-Expression (Abb. 4.31. und 4.32.), wobei die rCAR2-mRNA-Expression in Lunge und Leber im Vergleich zur rCAR2-mRNA-Expression in den übrigen Organen vergleichsweise hoch war, aufgrund des geringen Anteils der rCAR2-mRNA-Expression an der Gesamt-rCAR-mRNA-Expression jedoch nicht ins Gewicht viel.

In der Lunge und der Leber juveniler Tiere wurde im Vergleich zu den übrigen untersuchten Organen die höchste rCAR-mRNA-Expression ermittelt (Abb. 4.31. und 4.32.). Auch Tomko *et al.* (1997), Bergelson *et al.* (1998) und Fechner *et al.* (1999) zeigten, dass adulte Ratten und Mäuse in der Leber und der Lunge über eine vergleichsweise hohe CAR-mRNA-Expression verfügen. Mit immunhistologischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass CAR im Epithel des Respirationstraktes (nicht jedoch in den Lungenalveolen) und in epithelialen Zellen der Leber exprimiert wird (Tomko *et al.* 1997).

Die Vermutung, dass die mit der Geburt einsetzenden anatomischen und physiologischen Veränderungen Auswirkungen auf die CAR-Expression haben könnten, wie es für anderen Proteinen, z.B. Surfactant-Protein B und C in der Lunge (Zhou *et al.* 1996) oder dem Tocopherol-Transfer-Protein in der Leber (Tamai *et al.* 1998) zutrifft, konnte nicht bestätigt werden.

Die Ergebnisse lassen in der Leber und der Lunge eine von der Entwicklung unabhängige Empfänglichkeit für den adenoviralen Gentransfer vermuten. Inwiefern CAR eine Bedeutung bei der Organentwicklung zukommt, lässt sich anhand der vorhandenen Erkenntnisse nicht einschätzen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass vor allem im Gehirn und in der Skelettmuskulatur, aber auch im Herzen und möglicherweise in der Niere insbesondere rCAR1 eine Bedeutung bei der Organentwicklung zukommen könnte, während sich in der Leber und der Lunge keine derartigen Zusammenhänge herstellen lassen. Dahingegen scheint rCAR2 aufgrund der gegenüber rCAR1 vergleichsweise geringen Expression von eher untergeordneter Funktion zu sein. Eine Ausnahme stellt die rCAR2-mRNA-Expression im Gehirn dar, wo es gegenüber rCAR1 zu einer deutlichen Abweichung im Kurvenverlauf kam und rCAR2 möglicherweise eine Bedeutung in der frühen Embryonalentwicklung zukommt.

CAR scheint als homophiles Adhäsionsmolekül am Aufbau von gerichteten Kontakten zwischen Zellen beteiligt zu sein, möglicherweise vorrangig zwischen Zellen, die im Rahmen der Organfunktion auf die Informationsweiterleitung angewiesen sind (Skelettmuskel- bzw. Herzmuskelkontraktion, Weiterleitung von Impulsen innerhalb des Nervensystems).

Da die vorliegenden Untersuchungen auf der Basis der mRNA-Expression im Gesamtorgan erfolgten, konnte eine mögliche Beschränkung der CAR-Expression auf bestimmte Zelltypen innerhalb eines Organs [immunhistochemische Untersuchungen von Tomko *et al.* (2000)] nicht berücksichtigt werden. Weiterführende Untersuchungen mit immunhistochemischen Methoden könnten die hier erhaltenen Ergebnisse konkretisieren.

5.3. Einfluß von Zelldichte und Kulturdauer auf die rCAR-mRNA-Expression in Rattenkardiomyozytenkulturen

CAR verfügt über ähnliche Eigenschaften wie Moleküle, die in zellkontaktabhängige Prozesse involviert sind. So konnte in Kristallisationsstudien gezeigt werden, dass die extrazelluläre D1-Domäne des Rezeptors, die auch für die Ad-Bindung verantwortlich ist, Homodimere bildet, die zudem eine ähnliche Dissoziationskonstante wie bereits bekannte Zelladhäsionsmoleküle besitzen und eine hohe Ähnlichkeit zum CD2-CD58-Heterodimer aufweisen (van Raaij *et al.* 2000). Daneben wurde demonstriert, dass CAR homophile Zelladhäsionen *in vitro* vermitteln kann (Honda *et al.* 2000) und subzellulär im Bereich von Zell-Zell-Kontakten lokalisiert ist, so z.B. an der basolateralen, nicht jedoch an der apikalen Oberfläche polarisierter Epithelzellen (differenziertes Atemwegsepithel, MDCK-Zellen) (Pickles *et al.* 1998; Walters *et al.* 1999; Pickles *et al.* 2000), in den Filopodia der Wachstumspapfen und Neuriten primärer Neuronen (Honda *et al.* 2000) sowie im Bereich der Disci intercalares und des Sarkolemms von neonatalen Rattenkardiomyozyten und Herzmuskelzellen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (Noutsias *et al.* 2001). Im

Zusammenhang mit der hohen aber transienten Expression von CAR im Gehirn von Mäusen während der Embryonalentwicklung konnte gezeigt werden, dass CAR eine Bedeutung bei der Neuronenorganisation im sich entwickelnden Gehirn zukommt (Honda *et al.* 2000).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten dazu beitragen, weitere Informationen über die Regulation von CAR im kardialen System und seiner möglichen Beteiligung am Aufbau von Zellkontakten zu erhalten. Basierend auf den Ergebnissen von Carson *et al.* (1999), die die Zelldichte als einen Faktor der CAR-Regulation in Endothelzellen ermittelten, wurden Untersuchungen an neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt, um zu klären ob hier ähnliche Zusammenhänge zu finden sind.

Die Untersuchungen zeigten, dass neonatale Rattenkardiomyozyten, die nach der Präparation aus Herzen 4 Tage alter Ratten in einer geringen Dichte ausgesät wurden (0,1 bis $0,4 \times 10^6$ Zellen pro Well) nach 24 h eine höhere CAR-mRNA-Expression aufwiesen (CAR1 bis 9,1 mal höher, CAR2 bis 2,1 mal höher), als Zellen, die dichter ausgesät wurden ($0,8$ bis $3,2 \times 10^6$ Zellen pro Well), wobei die Expression mit zunehmender Zelldichte annähernd linear abnahm (Abb. 4.34. und 4.35.). Dies wurde für rCAR1 bereits bei einer geringeren Zelldichte, für rCAR2 erst bei einer höheren Zelldichte deutlich, was auf die vorrangige Bedeutung von rCAR1 hinweist und die Ergebnisse bestätigt, die beim Vergleich der mRNA-Expression beider Isoformen im Rahmen der Untersuchungen während der Organogenese ermittelt wurden (Abb. 4.30.). Daneben scheinen weitere Faktoren einen Einfluß auf die rCAR-mRNA-Expression zu haben. So war die rCAR1-mRNA-Expression *in vivo* und direkt nach der Isolierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten deutlich höher als nach *in vitro*-Kultivierung, während für die rCAR2-mRNA-Expression keine derartigen Unterschiede nachweisbar waren (Abb. 4.34., 4.35., 4.36.).

Die vorliegenden Ergebnisse, nach denen die rCAR-mRNA-Expression mit zunehmender Zelldichte abnimmt, scheinen im Widerspruch zu den von Carson *et al.* (1999) ermittelten Daten bei endothelialen HUVEC-Zellen zu stehen, die mit zunehmender Zelldichte eine erhöhte CAR-Expression zeigten, einem Phänom, dass paradox erscheint (Carson 2001), da die CAR-Expression bei adulten Individuen (reifes Gewebe mit hoher Zelldichte) eher gering ist. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass CAR in unterschiedlichen Zellsystemen unterschiedlich reguliert wird. So konnten neuere Untersuchungen zeigen, dass in Tumorzellen durch den CAR-vermittelten Zellkontakt eine negative Signalkaskade ausgelöst wurde, die zur Wachstumshemmung der Tumorzellen führte (Okegawa *et al.* 2001). Auch bei HUVEC-Zellen als permanenter Zelllinie mit hohem Zellteilungspotential könnten ähnliche Regulationsmechanismen zum Tragen kommen. Dagegen teilen sich neonatale

Rattenkardiomyozyten unter den für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Kulturbedingungen (Zusatz von mitosehemmenden Substanzen, um ein Überwachsen der Kultur mit Fibroblasten zu verhindern) nach ihrer Isolierung aus dem Herzen nicht mehr, sondern sind bestrebt, mit Hilfe von Zellausläufern Zellformationen zu bilden, die sich bei Kontakt im gleichen Rhythmus kontrahieren.

Die bei einer geringen Zelldichte und nur vereinzelt Kontakt der Zellen untereinander (gekennzeichnet durch voneinander unabhängige Kontraktion) beobachtete höhere rCAR-mRNA-Expression gegenüber der mit einer erhöhten Zelldichte und vorhandenen Zellkontakten einhergehenden geringeren rCAR-mRNA-Expression spricht dafür, dass CAR in der Phase des Suchens und des Aufbaus von Zellkontakten transient exprimiert wird.

Auch Noutsias *et al.* (2001) vermuten, dass CAR im Herzen als „Pfadfinder“ fungiert und damit für die Vermittlung von Zell-Zell-Kontakten, jedoch nicht unbedingt für deren Aufrechterhaltung notwendig ist. Da CAR ein homophiles Protein ist (Honda *et al.* 2000), könnte möglicherweise eine Signalkaskade über die intrazelluläre CAR-Domäne eine negative Autoregulation der CAR-Expression bedingen.

Im Gegensatz zum Einfluß der Zelldichte, führte eine Veränderung der Kulturdauer von 24 h bis zu 72 h zu keiner weiteren Beeinflussung der rCAR1-mRNA-Expression (Abb. 4.36.) und bestätigte die nach 48 h ermittelten Ergebnisse (Abb. 4.35.). Demgegenüber fanden andere Untersucher einen Anstieg der CAR-Protein-Expression in neonatalen Rattenkardiomyozyten 72 Stunden nach der Isolierung (Ito *et al.* 2000). Dies könnte auf eine Diskrepanz zwischen mRNA- und Protein-Expression hinweisen. Eine andere mögliche Erklärung liefern Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die Trypsinbehandlung von HeLa-Zellen zu einer partiellen und reversiblen Proteolyse des CAR auf der Zelloberfläche führte. HeLa-Zellen entfernten proteolytischen CAR innerhalb von 15 h und benötigten über 24 h, um intaktes CAR zu restaurieren (Carson *et al.* 2000), so dass der von Ito *et al.* (2000) ermittelte Anstieg der CAR-Protein-Expression 72 h nach der Isolierung mit dieser Restauration von CAR zusammenfallen könnte und nicht primär auf einem transkriptionalen oder translationalen Anstieg der CAR-Expression beruht.

Zusammenfassend und unter Berücksichtigung der Ergebnisse, die im Rahmen der Untersuchung des Herzen während der Organogenese erzielt wurden sowie bereits vorhandener Erkenntnisse zur Funktion von CAR, lässt sich schlussfolgern, dass CAR als Adhäsionsmolekül, wahrscheinlich in Form eines „Pfadfinder“-Proteins am Aufbau von

Zellkontakten zwischen Herzmuskelzellen beteiligt ist und eine CAR-Regulation in Abhängigkeit von der Zelldichte erfolgt.

Auch Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie zeigten im Rahmen der Erkrankung, die mit einem Auseinanderweichen der Zellformation einhergeht, eine CAR-Expression, die gegenüber der im normalen menschlichen Myokard vorhandenen geringen Expression signifikant erhöht war (Noutsias *et al.* 2001). Dies könnte eine Folge des Verlustes von Zell-Zell-Kontakten sein und somit betätigen, dass die im Rahmen der vorliegenden Studie *in vitro* nachgewiesene CAR-Regulation auch *in vivo* zutrifft.

5.4. Bedeutung des CAR für den adenoviralen Gentransfer in Rattenkardiomyozytenkulturen

In einer Vielzahl von Studien konnte übereinstimmend nachgewiesen werden, dass die CAR-Expression die Effizienz der AdV-Aufnahme bestimmt und somit die AdV-Gentransfereffizienz entscheidend beeinflusst (Hautala *et al.* 1998; Hidaka *et al.* 1999; Kaner *et al.* 1999; Li, Y. *et al.* 1999; Pearson *et al.* 1999; Walters *et al.* 1999; Fechner *et al.* 2000; Cao *et al.* 2001).

Das Herz stellt ein wichtiges Zielorgan im Rahmen gentherapeutischer Anwendungen dar (Hajjar *et al.* 1998; Eizema *et al.* 2000), weshalb Kenntnissen über CAR im Herzen eine besondere Bedeutung zukommt. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit *in vitro*-Untersuchungen an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt, die Aussagen über die Bedeutung des CAR für das AdV-Attachment, die AdV-Aufnahme und die AdV-vermittelte Transgenexpression liefern sollten.

Da im Vergleich zu herkömmlichen DNA-Transfektionstechniken, bei denen oft nur eine Transfektionseffizienz von unter 10 % erreicht wird, mit AdV nahezu 100 % der Zellen transduzierbar sind und gleichzeitig eine wesentlich höhere Transgenexpression pro Zelle möglich ist (Brenner 1999), wurden für die Untersuchungen ein, den rekombinanten hCAR exprimierender AdV sowie verschiedene Kontroll- und Indikator-AdV verwendet. Sowohl die drei verwendeten Kontroll- bzw. Indikator-AdV, als auch der hCAR exprimierende AdV waren RCA-frei (Abb. 4.37.). Dies ist von Bedeutung, da bei der Konstruktion, vor allem von AdV-Konstrukten der 1. Generation, wie sie in dieser Studie verwendet wurden, durch Rekombination von AdV-Sequenzen mit stabil in die Helfer-Zelllinie HEK293 integrierten Adenovirussequenzen replikationskompetente Adenoviren (RCAs) entstehen können, die

aufgrund ihrer Replikationsfähigkeit zytopathogene Effekte induzieren und somit Ergebnisse verfälschen können (Lochmuller *et al.* 1994; Fallaux *et al.* 1998; Fechner *et al.* 2000).

In initialen Untersuchungen wurde an drei unterschiedlichen Zelllinien die vektorvermittelte Expression von rekombinanten hCAR untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass mit dem verwendeten AdV Ad5CMVhCARs eine deutliche Zunahme der CAR-Expression in der humanen Zelllinie EA.hy926 und eine geringere Zunahme in der humanen Zelllinie HT-29 erzielbar war (Abb. 4.38.). Die Ursache für diese unterschiedlich starke Expression des rekombinanten hCAR könnte in einer, im Vergleich zu EA.hy.926-Zellen, geringeren AdV-Aufnahme aufgrund der geringeren endogenen CAR-Expression in HT-29 Zellen liegen (Abb. 4.38.). So konnte die unterschiedliche Expression von CAR als eine der Hauptursachen für die unterschiedliche Transduzierbarkeit verschiedener Zelllinien ermittelt werden (Hidaka *et al.* 1999; Kaner *et al.* 1999; Fechner *et al.* 2000).

Die Untersuchungen an den nicht humanen CHO-K1-Zellen, bei denen mit dem anti-hCAR-Ak Rmcb endogener CAR nicht nachweisbar ist (Bergelson *et al.* 1997), zeigten, dass auch in dieser, eher schlecht mit AdV transduzierbaren Zelllinie (Fechner *et al.* 2000), bei einem hohen Prozentsatz der Zellen eine Expression des rekombinanten CAR erreicht werden kann [62,5 % der Zellen exprimierten den rekombinanten hCAR (Abb. 4.38.)].

Die neonatalen Rattenkardiomyozytenkulturen waren gut mit AdV zu transduzieren. So zeigten nach der Transfektion mit dem Indikatorvektor Ad5CMVGFP mehr als 90% der Zellen eine GFP-Expression (Abb. 4.39.), was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersucher steht (Eizema *et al.* 2000; Noutsias *et al.* 2001). Auch wiesen 74 % der Zellen nach der Transduktion mit dem Ad5CMVhCARs eine Expression des rekombinanten hCAR auf (Abb. 4.40.).

Es konnte gezeigt werden, dass infolge dieser Expression des rekombinanten hCAR mehr AdV an der Zelloberfläche gebunden wurden und auch die Aufnahme der AdV in die Zelle und v.a. die AdV-vermittelte Transgenexpression deutlich erhöht waren (Abb. 4.41.).

Diese Ergebnisse belegen, dass der rekombinante hCAR funktionell wirksam ist und durch eine Steigerung der CAR-Expression auf der Kardiomyozytenoberfläche, über eine erhöhte AdV-Bindung an die Zelloberfläche, eine erhöhte Gentransfereffizienz erzielt werden kann.

CAR stellt somit auch in Kardiomyozyten einen entscheidenden Faktor für die Adenovirus- bzw. AdV-Bindung an die Zelloberfläche dar.

Diese Ergebnisse könnten für die kardiale *in vivo*-Gentherapie mittels AdV von Bedeutung sein, beispielsweise bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, die über eine erhöhte CAR-Expression im Herzen verfügen (Noutsias *et al.* 2001) und dadurch der adenoviralen

Geneherapie einen Angriffspunkt bieten. Andererseits könnten Patienten mit erhöhter kardialer CAR-Expression ein erhöhtes Risiko für eine Coxsackie- bzw. Adenovirus-Infektion des Myokards besitzen, so dass hier eine Blockade des CAR das Risiko einer Infektion mindern könnte.