

Optogenetische Stimulation
des
nativen Herzmuskels
durch
Adeno-assoziierte Virustransduktion
von
Channelrhodopsin-2

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Christoph Carsten Otto See Kee Vogt

aus Karlsruhe

Bonn, 2022

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Philipp Saße
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Jörg Höfeld

Tag der Promotion: 01.12.2022

Erscheinungsjahr: 2022

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2011 bis Juni 2016 am Institut für Physiologie I der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Leitung von Prof. Dr. Philipp Sasse erstellt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Vogt, Christoph C; Tobias Bruegmann; Daniela Malan; Annika Ottersbach; Wilhelm Roell; Bernd K Fleischmann; Philipp Sasse. (2015). „Systemic gene transfer enables optogenetic pacing of mouse hearts“. *Cardiovascular research* 106 (2): 338–343. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv004>

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Herz und seine Elektrophysiologie	1
1.2	Herzrhythmusstörungen	8
1.2.1	Herzschrittmacher zur Therapie von Bradykardien	8
1.2.2	Defibrillatoren zur Therapie von Tachykardien.....	12
1.2.3	Risiken der elektrischen Stimulation.....	14
1.3	Optogenetik – Channelrhodopsin-2 zur optischen Stimulation des Herzens	16
1.4	Vektoren für den Gentransfer.....	23
1.5	Adeno-assoziierte Viren (AAV) als Vektoren.....	26
2	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	34
3	Material und Methoden.....	35
3.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	35
3.2	Chemikalien und Medien	37
3.3	Antikörper für immunhistochemische Färbungen	38
3.4	Lösungen, Puffer und Medien.....	39
3.5	Der Adeno-assoziierte Virusvektor	40
3.5.1	Risikobewertung von Adeno-assoziierten Viren und AAV-abgeleiteten Virusvektoren	41
3.6	Mausmodel	42
3.7	Verwendete Programme.....	42
3.8	Tierexperimente und operative Techniken.....	43
3.8.1	Lokale AAV-Injektion in das Myokard am Apex des Herzens.....	43
3.8.2	Systemische Injektion von AAV in die <i>Vena jugularis</i>	44
3.8.3	<i>In vivo</i> Analyse zur lichtaktivierten Stimulation des Herzens durch Channelrhodopsin-2 (ChR2)	45
3.8.4	Organentnahme bei der adulten Maus.....	45
3.8.5	<i>Ex vivo</i> Analyse der Channelrhodopsin-2 (ChR2) Aktivität im „Langendorff-Herz“	46
3.8.6	Isolation adulter Kardiomyozyten durch Dissoziation von Herzen	46
3.9	Elektrophysiologische Untersuchungen adulter Kardiomyozyten und adulter Herzen.....	46
3.9.1	Patch Clamp Analyse isolierter Kardiomyozyten	46
3.9.2	Analyse der optogenetischen Stimulationsfähigkeit transduzierter Herzen	47
3.10	Histologische Analysen.....	48
3.10.1	Paraformaldehyd – Fixierung von explantierten Organen.....	48
3.10.2	Einfrieren von explantierten Organen und anfertigen histologischer Schnitte	48
3.10.3	Immunfluoreszenzfärbungen	49

3.10.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	49
3.10.5	Pikro-Siriusrot Färbung.....	50
3.11	Makroskopische und Mikroskopische Methoden	50
3.11.1	Analyse der mCherry Expression beim transduzierten Herz der Maus.....	50
3.11.2	Hochauflösende makroskopische und mikroskopische Aufnahmen.....	51
3.12	Statistik.....	51
3.13	Zusammenstellung der Diagramme, Abbildungen & Skizzen.....	51
4	Ergebnisse.....	53
4.1	Lokale Injektion von AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	53
4.1.1	Histologische Betrachtung der mCherry Expression in Mausherzen nach lokaler Injektion der rekombinanten Adeno-assoziierten Virusvektoren, AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	53
4.1.2	Lichtinduzierte Stimulation der Mausherzen nach lokaler Injektion von AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry.....	54
4.1.3	Analyse nach lokaler Injektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	56
4.1.4	Analyse nach lokaler Injektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	62
4.1.5	Analyse nach lokaler Injektion von 2×10^9 gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	67
4.1.6	Kontrollversuch durch lokale Injektion von 10 μ l PBS-Lösung	68
4.2	Systemische Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry.....	72
4.2.1	Histologische Betrachtung der mCherry Expression einen Monat nach systemischer Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry	72
4.2.2	Nachweis von lichtaktivierten Aktionspotentialen und des Photostroms bei isolierten Kardiomyozyten von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry transduzierten Mausherzen.....	73
4.2.3	Übersicht der optischen Stimulationsexperimente und der mCherry Expressionsanalyse nach systemischer Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry... ..	74
4.2.4	Optische Stimulation <i>in vivo</i> von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry Mausherzen.....	76
4.2.5	Optische Stimulation <i>ex vivo</i> von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry Mausherzen am Langendorff-Apparat durch Lichtstimulation.....	80
4.2.6	Vergleich der <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Lichtintensitätswerte	83
4.2.7	Die optische Stimulation durch Beleuchtung unterschiedlicher Herzbereiche	84
4.2.8	Optische Stimulation über eine längere Zeit, <i>in vivo</i>	86
4.2.9	Analyse der mCherry Expression in Nicht-Kardiomyozyten im Herz, sowie in weiteren Organen, zwei Monate nach systemischer AAV-Injektion, AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry	87
4.2.10	Analyse der Lichtdurchlässigkeit der Haut	90
5	Diskussion	91
5.1	Bradykarde Herzrhythmusstörungen	91

5.2	Präklinische Studien zur Herzinsuffizienz mit AAV-Vektoren	92
5.3	Lokaler Gentransfer von Channelrhodopsin-2 durch den Adeno-assoziierten Virus (AAV) Vektor, AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	94
5.4	Systemische Adeno-assoziierte Virus (AAV) Vektor Injektion	98
5.5	CUPID Phase 1 - Klinische Studien zur Therapie von Herzinsuffizienz mit AAV-Vektoren.	103
5.6	CUPID Phase 2 Studien.....	104
5.7	Maximale Obergrenze der AAV-Vektor Konzentration.....	107
5.8	Aussichten für eine mögliche klinische Anwendung.....	110
5.9	Fazit	112
6	Zusammenfassung.....	114
7	Abkürzungsverzeichnis.....	117
8	Abbildungsverzeichnis.....	121
9	Literaturverzeichnis.....	125
10	Anhang	141
10.1	Liste der Publikationen.....	141
10.1.1	Zeitschriften	141
10.1.2	Vorträge.....	141
10.1.3	Posterbeiträge	142
11	Danksagung	143

1 Einleitung

1.1 Das Herz und seine Elektrophysiologie

Das Herz ist ein Hohlmuskel (von Skramlik, 1954) mit der primären Aufgabe als Pumporgan den Transport von Sauerstoff, Nährstoffen und einer Vielzahl von Kommunikationsmolekülen voranzutreiben, um damit die Überbrückung räumlicher Distanzen im gesamten Körper zu ermöglichen. Durch das rhythmische Abwechseln von Systole (Kontraktionsphase) und Diastole (Erschlaffungsphase) hält das Herz den gerichteten Blutstrom sowohl im kleinen Lungenkreislauf als auch im großen Blutkreislauf (Organe und Körperperipherie) aufrecht. Diese schnelle, kontinuierliche mechanische Arbeit leistet das Myokard, das zum größten Teil aus quergestreiften, glykogen- und fibrillenreichen Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) besteht.

Das Myokard bezeichnet den muskulären Anteil des Herzens. Seine Kardiomyozyten ordnen sich in parallelen und sich verzweigenden Ketten an. Dabei verschmelzen die Muskelfasern im Gegensatz zu Skelettmuskelzellen nicht, sondern bleiben Einzelzellen mit einem zentralen Nucleus (Zellkern). Die charakteristischen Zellgrenzen der Kardiomyozyten, sind in histologischen Färbungen deutlich sichtbar. Insbesondere sind die Zellgrenzen der hintereinander liegenden Myozyten sichtbar, die auch als Glanzstreifen bezeichnet werden. In diesem Bereich verbinden *Zonulae adhaerentes* (Adhäsionsverbindungen) die Aktinfilamente benachbarter Kardiomyozyten und ermöglichen die Übertragung kontraktile Kräfte im Zellverband des Myokards. Im Glanzstreifen sorgen Gap junctions (Zell-Zell-Verbindung mit kleinem Abstand der Zellmembrane) für eine elektrochemische Verbindung benachbarter Kardiomyozyten. Ein Gap Junction wird durch zwei Connexone (Halbkanal) geformt, wobei jede benachbarte Zelle ein Connexon zur Bildung eines ganzen Kanals beiträgt. Durch Gap junctions verbinden sich die Zytoplasmen benachbarter Zellen, wodurch ein freier Transport von Ionen und damit ein Stromfluss von Zelle zu Zelle ermöglicht wird. Die zusammenhängenden Kardiomyozyten bilden in ihrer Gesamtheit ein funktionelles Synzytium mit einer optimalen Erregungsausbreitung (0,6 m/s – 1 m/s) im Myokard der Atrien (Vorhöfe) und Ventrikel (Herzkammern) (Pape et al., 2014).

Um einen effizienten Blutfluss im Körperkreislauf zu garantieren ist eine koordinierte Kontraktionsabfolge der Herzbereiche zwingend notwendig. Spezialisierte Zellen im Sinusknoten haben die Fähigkeit zur raschen periodischen Spontandepolarisation. Dort leiten sie den Herzzyklus ein, der mit der Depolarisation der Atrien beginnt, und in Folge erst zur rechten und mit einer Verzögerung von 20 ms – 40 ms zur linken Vorhofkontraktion führt. Eine elektrisch isolierende Bindegewebsschicht verhindert die Übertragung der Erregung von den Atrien direkt auf die Muskelzellen der Ventrikel. Somit bildet der am Vorhofseptum liegende Atrioventrikularknoten (AV-

Knoten) die einzige elektrische Verbindung zwischen Atrien und Ventrikel. Der AV-Knoten leitet die Erregung mit einer sehr langsamen Geschwindigkeit (0,05 m/s – 0,1 m/s) weiter und wirkt damit verzögernd. Dadurch wird sichergestellt, dass die mechanischen Pumparbeiten der Vorhöfe vor den Kammerkontraktionen abschließen und sich die Herzkammern vollständig füllen können. Vom AV-Knoten aus leiten die schnellen Leitungsbahnen (1 m/s – 4 m/s) His-Bündel, Tawara-Schenkel und Purkinje-Fasern die Erregung in die Peripherie des Kammermyokards und regen die Kontraktion der linken und der rechten Herzkammer an. Nach der Systole schließt der Herzzyklus mit der Diastole ab, in der sich das Herz entspannt und sich wieder mit Blut füllt (Pape et al., 2014; Renz-Polster et al., 2013).

Das Erregungsleitungssystem, bestehend aus Sinus-, AV-Knoten, His-Bündel, Tawara-Schenkel und Purkinje-Fasern (Abbildung 1), besteht im Gegensatz zu den Muskelzellen aus besonders glykogenreichen und fibrillenarmen Zellen. Deren besondere Eigenschaften sind das autonome Erzeugen der rhythmischen Erregungen und die besonders hohe Weiterleitungsgeschwindigkeit des Signals, wodurch periphere Bereiche des Myokards schnell stimuliert werden können (Copenhaver and Truex, 1952; Jedeikin, 1962).

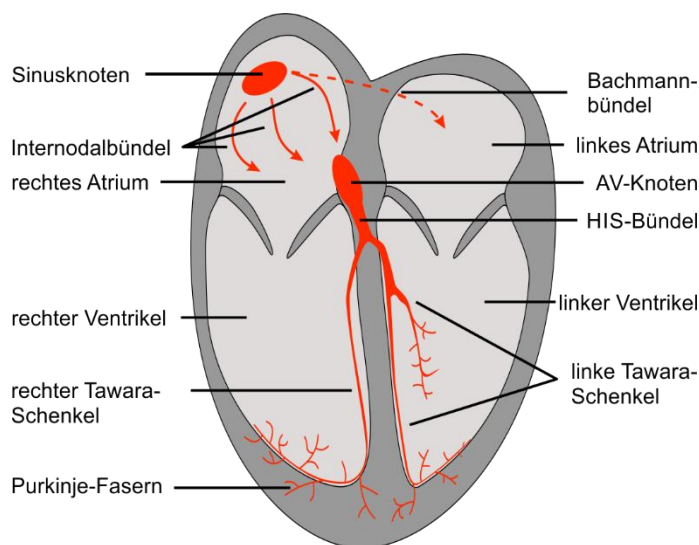


Abbildung 1: Herz, Erregungsleitungssystem

Schematische Darstellung des vertikal aufgeschnittenen Herzens. In Rot sind die verschiedenen Abschnitte des Erregungsleitungssystems abgebildet: Sinusknoten, drei Internodalbündel, Bachmannbündel, Atrioventrikularknoten (AV-Knoten), HIS-Bündel, rechter und zwei linke Tawara-Schenkel, sowie die Purkinje-Fasern.

Bereits 1907 wurde der Sinusknoten von Keith und Flack als das Zentrum der Erregungsbildung im gesunden Herzen identifiziert (Keith and Flack, 1907). Entgegen der Annahmen, dass der Sinusknoten ein homogenes Schrittmacherzentrum sei, zeigten Arbeiten an Hunden- und Menschenherzen, dass er eine komplexe und heterogene Struktur mit unterschiedlich aktiven Bereichen ist (Boineau et al., 1980;

Boyett et al., 2000; Bromberg et al., 1995). Eine Gewebsschicht aus Fett, Bindegewebe und Arteriolen umgibt den Sinusknoten und grenzt ihn vom Muskelgewebe des rechten Atriums ab. Dabei dient das Bindegewebe als Barriere für elektrische Impulse und schützt den Sinusknoten vor den hyperpolarisierenden Einflüssen des Atriums (Boyett et al., 2000; Fedorov et al., 2012). Lediglich über sogenannte „*exit pathways*“ (Weiterleitungsbahnen), welche auch als Internodalbündel (Abbildung 1) bezeichnet werden, gelangen somit die im Sinusknoten erzeugten Erregungen in das Myokard der Atrien und den AV-Knoten (Boyett et al., 2000; Fedorov et al., 2009, 2010, 2012; James, 1963).

Im Grunde sind alle Zellen des Reizleitungssystems zur spontanen Depolarisation befähigt, jedoch beginnt der Herzschlag bei einem gesunden Herz immer am Sinusknoten. In Ruhe depolarisieren dessen Zellen mit einer Frequenz von 60 – 80 Schläge/min am schnellsten und werden daher als primärer Schrittmacher bezeichnet. Ohne das Signal vom Sinusknoten depolarisieren die Zellen des AV-Knotens mit einer Frequenz von 30 – 50 Schläge/min (sekundäre Schrittmacher), bzw. die des ventrikulären Reizleitungssystems mit 20 – 40 Schläge/min (tertiärer Schrittmacher) in ihrem jeweiligen spontanen Rhythmus. Die Aktivierungen des sekundären und tertiären Schrittmachers werden durch die schnell erzeugten Erregungen des Sinusknotens überlagert, was Interferenzen zwischen den verschiedenen Schrittmachern verhindert. Bei einem vollständigen Ausfall des Sinusknotens entsteht eine sogenannte präautomatische Pause von wenigen Sekunden, bis der sekundäre Schrittmacher, bzw. wenn dieser ebenfalls ausfällt, der tertiäre Schrittmacher die Herzaktion wieder in Gang setzt (Pape et al., 2014; Renz-Polster et al., 2013).

Schrittmacherzellen besitzen kein stabiles Membranpotential und generieren dadurch spontane und rhythmische Aktionspotentiale. Die Grundlage für diese Autorhythmie liegt in den elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen, welche durch die entsprechend exprimierenden Ionenkanäle definiert sind. Abbildung 2A zeigt das Aktionspotential von Schrittmacherzellen des Sinusknotens, sowie die dafür verantwortlichen Ionenströme. Nach einer Erregung erfolgt bei Schrittmacherzellen direkt die Repolarisation, wobei sie dabei ein maximal diastolisches Potential (MDP) von nur -60 mV erreichen. Besondere Kationenkanäle, die *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels* (hyperpolarisationsaktivierter und zyklische Nukleotid-bindender Kanäle), HCN-Kanäle sind spannungsgesteuert und aktivieren sich bei dieser Hyperpolarisation. Dies führt zum Einstrom von Kationen (I_f), vorwiegend Na^+ Ionen und leitet langsam die diastolische Depolarisation ein. Sobald das Membranpotential einen Schwellenwert von -40 mV erreicht, öffnen spannungsgesteuerte L-Typ Ca^{2+} Kanäle. Der Ca^{2+} Einstrom (ICa^{2+}_L) führt zum Aktionspotential mit langsamer Aufstrichgeschwindigkeit. Die anschließende Repolarisation wird durch spannungsgesteuerte K^+ Kanäle eingeleitet. Der auswärts gerichtete K^+ Ausstrom ($\text{IK}^+_{R,S}$) führt wieder zum maximal diastolischen Potential (Pape et al., 2014).

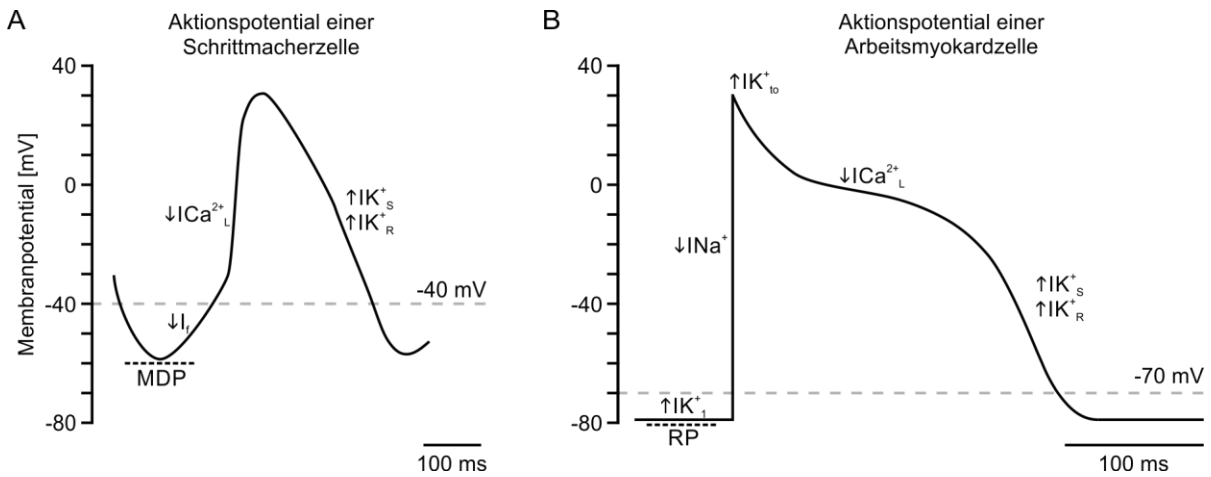


Abbildung 2: Aktionspotentiale einer Schrittmacherzelle und einer Arbeitsmyokardzelle

Schematische Darstellung der Aktionspotentiale und der dafür verantwortlichen Ionenströmen (↓: Einstrom, ↑: Ausstrom). **(A)** Das Aktionspotential einer Schrittmacherzelle hat ein maximales diastolisches Potential (MDP) bei -60 mV. Die beteiligten Ionenströme sind I_f , ICa^{2+}_L , IK^+_S und IK^+_R . Beim Erreichen des Schwellenwerts von -40 mV öffnen spannungsgesteuerte Ca^{2+}_L -Kanäle. **(B)** Das Aktionspotential einer Arbeitsmyokardzelle hat durch K^+ Ausstrom durch IK^+_1 -Kanäle ein stabiles Ruhemembranpotential (RP) bei rund -80 mV. Die beteiligten Ionenströme sind IK^+_1 , INa^+ , ICa^{2+}_L , IK^+_S und IK^+_R . Beim Erreichen des Schwellenpotentials von -70 mV öffnen spannungsgesteuerte Na^+ Kanäle. Graue gestrichelte Linie: die jeweiligen Schwellenwerte.

Im Gegensatz zu den Schrittmacherzellen erreichen die Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards ein Ruhemembranpotential, das bei rund -80 mV liegt (Abbildung 2B). Dieses wird durch einen steten Auswärtsstrom von K^+ Ionen durch K^+_1 -Kanäle erzeugt. Sobald das Membranpotential durch einen Reiz, wie z.B. einer Erregung vom Sinusknoten oder über Gap junctions von einer Nachbarzelle, den Schwellenwert von -70 mV überschreitet führt ein Sperminblock zum Verschluss der K^+_1 -Kanäle. Gleichzeitig werden spannungsabhängige Na^+ Kanäle aktiviert, welche zu einem schnellen, starken aber nur kurzen Na^+ Einstrom (INa^+) führen. Die Zellmembran der Kardiomyozyten depolarisiert, wobei das Aktionspotential einen steilen Aufstrich beschreibt und in einem *Overshoot* („Überschreiten des notwendigen Grenzwertes“) endet. Bei Erreichen des Schwellenpotentials von -40 mV öffnen sogenannte L-Typ- Ca^{2+} Kanäle und ermöglichen einen Ca^{2+} Einstrom in das Zytoplasma, der zu einer langen Plateauphase (200-300 ms) führt. Gleichzeitig öffnen sich kurzzeitig spannungsgesteuerte Kaliumionenkanäle (IK^+_{to} , *to*: transiently open), wodurch K^+ Ionen aus der Zelle ausströmen. Mit dem K^+ Ausstrom beginnt die erste Stufe der Repolarisation. Die einströmenden Ca^{2+} Ionen aktivieren die kardialen Ryanodinrezeptoren (Subtyp 2, RyR2, Kalziumkanal) in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), dessen terminale Zisterne ein Ca^{2+} Ionenspeicher ist. Diese transiente Ca^{2+} induzierte Ca^{2+} Freisetzung durch die RyR2 bewirkt den größeren Anteil des Ca^{2+} Ionenanstiegs im Zytoplasma im Vergleich zu dem Ca^{2+} Einstrom durch die L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle. Im Zytosol binden die Ca^{2+} Ionen an kardiales Troponin, wodurch der Querbrückenzyklus initiiert wird, der die Verkürzung der kontraktile Elemente beschreibt. Über das ventrikuläre Myokard hinweg resultiert dies in der Kontraktion des gesamten Ventrikels. Der Zusammenhang der ansteigenden Ca^{2+} Ionen Konzentration im Zytosol der

Kardiomyozyten und der Umsetzung in mechanische Bewegung (Kontraktion) wird als elektromechanische Kopplung bezeichnet. Die vollständige Repolarisation erfolgt durch Aktivierung spannungsgesteuerter K^+ Kanäle, die einen schnellen (IK^+_R , *R, rapid*) und einen stabilen, langsamen (IK^+_S , *S, slow*) K^+ Ausstrom erzeugen. Durch Lösen des Sperminblocks der K^+_{-1} -Kanäle führt der stete K^+ Ausstrom wieder zum Ruhemembranpotential. Für die Relaxation des Herzmuskels muss die zytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration auf unter $10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ absinken. Dies wird durch die sogenannte SERCA (*Sarcoplasmatic endoplasmatic reticulum calcium-transporting ATPase*), eine Ca^{2+} ATPase und dem in der Zellmembran sitzenden $3Na^+/1Ca^{2+}$ Austauschcarrier bewirkt. Durch das Absinken der zytoplasmatischen Ca^{2+} Konzentration dissoziieren gebundene Ca^{2+} Ionen vom kardialen Troponin C ab. Durch die darauf folgende Umlagerung der Tropomyosinmoleküle werden die hochaffinen Bindungsstellen der Myosinköpfe am Aktinfilament wieder unzugänglich, wodurch der Querbrückenzyklus blockiert ist (Pape et al., 2014).

Sympathikus und Parasympathikus sind die beiden wichtigen Teile des autonomen Nervensystems. Sie regulieren Frequenz und Stärke des Herzschlags für die Bedürfnisse des Blutkreislaufs. Dabei wirkt der Sympathikus auf die Muskelzellen und das gesamte Reizleitungssystem und hat somit direkten Einfluss auf Atrien und Ventrikel. Bei niedrigem Blutdruck wirkt der Sympathikus durch Adrenalin und Noradrenalin im gesamten Herzmuskel positiv chronotrop (frequenzsteigernd), positiv dromotrop (Beschleunigung der Erregungsleitungsgeschwindigkeit), positiv inotrop (Steigerung des Kontraktionsvermögens) und positiv lusitrop (Steigerung der Relaxationsfähigkeit). Das Herzminutenvolumen kann dadurch von 5 auf 25 Liter pro Minute gesteigert werden. Der Parasympathikus reguliert hingegen fast ausschließlich über den Sinus- und den AV- Knoten. Dabei wird bei hohem Blutdruck durch Acetylcholin eine negativ chronotrope (hemmende Wirkung auf die Erregungsbildung im Sinusknoten) und negativ dromotrope (verlangsamende Wirkung auf die Erregungsleitungsgeschwindigkeit im AV-Knoten) bewirkt (Renz-Polster et al., 2013).

In einem Elektrokardiogramm (EKG) (Abbildung 3) kann das Ausbreiten einer Erregung im Herzen graphisch dargestellt werden. 1906 leitet Willem Einthoven das erste EKG bei einem Menschen ab. Ihn zu Ehren bezeichnet man die noch heute gängige Konvention mit den Ableitpunkten rechter und linker Arm, sowie linker Fuß als Einthoven-Dreieck. Die drei Verbindungen, die aus diesem Dreieck entstehen werden als die Standardableitungen I, II und III nach Einthoven bezeichnet. Sie beschreiben die Verbindung rechten zu linken Arm (Ableitung I), rechten Arm zu linken Fuß (Ableitung II) und linken Arm zu linken Fuß (Ableitung III). In einem EKG werden Potentialdifferenzen zwischen zwei abgeleiteten Punkten gegen die Zeit aufgetragen. Weitergeleitete Erregungen führen innerhalb einzelnen Kardiomyozyten zu Potentialdifferenzen während der Depolarisation und Repolarisation. Dabei wirken die Einzelzellen wie Dipole, wobei die Polarisierung bei Depolarisation und Repolarisation

entgegengesetzt ist. Der Vektorpfeil eines EKGs zeigt hierbei immer von Minus nach Plus, d.h. vom erregten zum unerregten Gewebe. Über das gesamte Myokard hinweg addieren sich die einzelnen Vektoren zu einem Summen- bzw. Integralvektor. Demnach vergrößert sich die Potentialdifferenz mit steigender Zahl an polarisierten Kardiomyozyten, was sich in einem größeren Ausschlag von der Nulllinie im EKG widerspiegelt. Die Lage der Ableitelektroden ist bei der Messung entscheidend. Ist der Dipol des Summenvektors parallel zur Linie zwischen den beiden Ableitungselektroden ausgerichtet, so ist die gemessene Potentialdifferenz am größten. Ist der Summenvektor senkrecht zur Verbindungslinie der beiden Ableitungselektroden ausgerichtet, geht die gemessene Potentialdifferenz gegen Null. Gleichzeitig spiegelt sich die Entfernung der Ableitungselektroden in Bezug zum Dipol in der Größe der gemessenen Werte wider. Je näher der Dipol den Ableitungselektroden ist desto größer, je weiter weg, desto kleiner sind die resultierenden Vektorwerte (Pape et al., 2014).

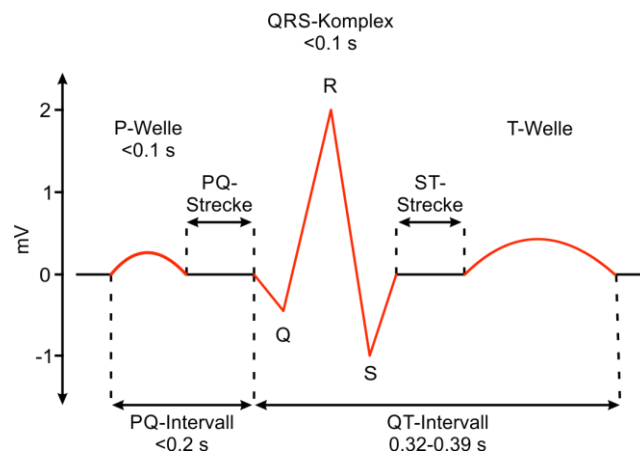


Abbildung 3: Elektrokardiogramm (EKG)

Schematische Darstellung einer EKG-Ableitung nach Einthoven Ableitung II (rechter Arm, linkes Bein), mit den definierten Abschnitten: P- und T- Wellen, PQ- und ST- Strecken, QRS-Komplex, PQ- und QT- Intervalle.

Sobald eine Sinuserregung das Vorhofmyokard über die Internodalbündel zur Depolarisation erregt, entsteht ein zur Herzspitze gerichteter Vektor, der einen positiven Ausschlag (nach oben) im EKG (nach Einthoven, Ableitung II) ergibt, die P-Welle (Abbildung 3). Diese sinkt zur isoelektrischen Nulllinie ab, da bei den vollständig erregten Vorhöfen kein Potential messbar ist. Die Zeit, in der die Erregung über AV-Knoten, His-Bündel und Tawara-Schenkel auf die Ventrikel übertragen wird, entspricht im EKG dem PQ-Intervall, welche von Beginn der P-Vorhoferregung bis zum Beginn der Ventrikelregung dauert. Die Q-Zacke im EKG stellt den Beginn der Kammererregung dar. Sie beginnt auf der linken Seite des Septums und breitet sich in Richtung der Herzbasis aus, wodurch ein negativer Vektor (nach unten) zustande kommt. Nachdem die Herzbasis erregt ist, dreht die Erregung in Richtung der Herzspitze und breitet sich über eine große Muskelmasse hinweg aus, wodurch sich ein großer positiver Vektor, die

R-Zacke, im EKG abzeichnet. Anschließend setzt sich die Erregung von der Herzspitze posterior im linken Ventrikel fort, was in der negativen S-Zacke im EKG wiedergegeben wird. Die S-Zacke endet wieder auf der isoelektrischen Nulllinie, da mit Ende der S-Zacke das Ventrikelmyokard vollständig erregt ist. Die positive T-Welle im EKG gibt die Repolarisation des Ventrikels wieder, welche an der Herzspitze beginnt und an der Herzbasis endet. In der Regel fällt die Repolarisation der Vorhöfe zeitlich in den QRS-Komplex (Ventrikeldepolarisation) und ist somit nicht sichtbar. Die Darstellung des EKGs in Abbildung 3 entspricht der 2. Ableitung nach Einthoven, in der vom rechten Arm zum linken Bein abgeleitet wird. Die weiteren bipolaren Extremitätenableitungen I und III nach Einthoven ergeben sich durch das EKG-Dreieck. Für die 1. Ableitung nach Einthoven wird vom rechten zum linken Arm abgeleitet. Bei der 3. Ableitung nach Einthoven wird vom linken Arm zum linken Bein abgeleitet (Pape et al., 2014).

1.2 Herzrhythmusstörungen

Bei Herzrhythmusstörungen weicht die Frequenz des Herzschlags im ruhenden Zustand von der physiologischen Frequenz ab. Herzrhythmusstörungen können in Bradykardie (zu langsame Herzfrequenz) und Tachykardie (zu schnelle Herzaktivität) unterteilt werden (Kammerfrequenzen < 50 Herzschläge pro Minute oder > 100 – 150 Herzschläge pro Minute, bzw. Vorhoffrequenzen > 220 – 600 Herzschläge pro Minute) (Pape et al., 2014). Die Symptome reichen von Schwindel, Bewusstseinsstörungen, Synkopen bzw. Bewusstseinsverlust (Adams-Stokes-Anfall) bis hin zu lebensbedrohlichen Ischämien oder Infarkten (Trappe, 2019). In Deutschland erleiden jährlich 70.000 - 100.000 Menschen, in den USA bis zu 450.000 Menschen die älter als 35 Jahre sind, einen plötzlichen Herztod als Folge eines irreversiblen Herz-Kreislauf-Stillstands, der in 5 – 20 % der Fälle durch Bradykardien und in 65 – 90 % der Fälle durch Tachykardien hervorgerufen wurde (Trappe and Gummert, 2011).

1.2.1 Herzschrittmacher zur Therapie von Bradykardien

Mit der Ausnahme eines gut trainierten Sportlers, dessen Ruhfrequenz sehr niedrig sein kann, ist eine Herzschlagfrequenz unter 40 – 60 Herzschläge pro Minute pathologisch, da der Körper nicht mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird (Ufberg and Clark, 2006). Bradykardien sind therapiebedürftig, wenn die Eigenfrequenz der Herzkammern zu niedrig ist und klinisch relevante Symptome wie Schwindel, Synkopen, eine sich entwickelnde Herzinsuffizienz oder eine persistierende myokardiale Ischämie vorliegen (Trappe and Gummert, 2011). In der Regel werden Bradykardien durch Störungen der Reizbildung oder der Reizweiterleitung verursacht. Unter dem Begriff *Sick-Sinus-Syndrome* versteht man alle abnormen Rhythmen des Sinusknotens, sowie dessen vollständiges Aussetzen, dem Sinusarrest. Dabei wird der Herzschlag nicht in einer physiologisch notwendigen Frequenz durchgeführt (Adán and Crown, 2003). Der Grund für das Versagen des Sinusrhythmus ist zumeist idiopathischer Natur, wobei meistens eine degenerative Fibrose des Sinusknotens (am häufigsten) vorliegt. Oftmals ist die Bradykardie Folge einer Ischämie bzw. eines Infarkts (Adán and Crown, 2003; Wahls, 1985). Weitere Herzrhythmusstörungen entstehen, wenn die Reizweiterleitung nach dem Sinusknoten an einer Stelle im Weiterleitungssystem gestoppt und somit blockiert wird. Man unterscheidet zwischen dem sinuatrialen Block, bei dem die Signalübermittlung von Sinusknoten zu den Vorhöfen fehlt, dem atrioventrikulären Block (AV-Block), mit einer fehlenden Überleitung von den Vorhöfen zu den Herzkammern, und dem Rechts- bzw. Linksschenkelblock, was eine einseitige Signalstörung über einen der Tawara-Schenkel zur jeweiligen Herzkammer beschreibt (Pape et al., 2014). Die Ursachen hierfür reichen von Elektrolytveränderungen bis zu verschiedenen kardialen Vorerkrankungen wie z.B. koronaren Herzerkrankungen oder Kardiomyopathien (Pape et al., 2014).

Beim AV-Block unterscheidet man drei Grade. Bei einer Verlängerung des PQ-Intervalls von 200 ms spricht man von einem AV-Block 1. Grades. Hierbei ist lediglich eine Verlängerung der Überleitung zum Ventrikel gegeben. Sobald nicht mehr jede Vorhoferregung zu einer Kammererregung führt, spricht man von einem AV-Block 2. Grades. Man unterscheidet hier zwischen Typ Mobitz 1, auch Typ Wenckebach genannt, und Typ Mobitz 2. Beim Typ Mobitz 1 (Wenckebach) verlängert sich das PQ-Intervall von einem Herzschlag zum nächsten, bis es schlussendlich zu einem Ausfall der Kammererregung kommt und der Zyklus von Neuem beginnt. Der Typ Mobitz 2 beschreibt hingegen einen festgelegten Rhythmus. Wenn nur jede zweite Vorhoferregung zu den Ventrikeln übergeleitet wird, spricht man von einem 2:1 Block, wenn nur jede dritte, von einem 3:1 Block. Der AV-Block 3. Grades ist lebensgefährlich, da er den Komplettausfall der Erregungsüberleitung am AV-Knoten beschreibt. Bis zum Einsetzen des tertiären Schrittmachers, mit der Eigenfrequenz des Kammermyokards, kommt es zum Kreislaufstillstand und möglicherweise auch zum Bewusstseinsverlust. (Pape et al., 2014; Renz-Polster et al., 2013)

Der Rechts- bzw. Links-Schenkelblock ist eine Blockade der Erregungsweiterleitung, die unterhalb des His-Bündels, in den Tawara-Schenkeln, auftritt. Der rechte Tawara-Schenkel verästelt sich zur Herzspitze hin in die sogenannten Purkinje-Fasern. Der linke Tawara-Schenkel trennt sich nochmals in den sogenannten linken anterioren und posterioren Tawara-Schenkel auf, bevor auch diese sich in die Purkinje-Fasern verästelt. Man spricht hier somit von drei großen Erregungsleitungsschenkeln. Wenn der rechte Tawara-Schenkel keine Erregungen überleitet, bezeichnet man dies als einen Rechtsschenkelblock. Beim linken Tawara-Schenkel spricht man von einem linksanterioren oder linksposterioren Hemiblock, wenn entsprechend der anteriore oder der posteriore Schenkel keine Erregungen weiterleitet. Sofern die Blockierung oberhalb der Auftrennung oder beide linke Schenkel betrifft, spricht man von einem Linksschenkelblock (Trappe and Gummert, 2011).

Die Muskulatur der Herzkammern zieht sich normalerweise in einer fast konzentrischen Art zusammen, sodass das dem Blut nur einen Weg und eine Strömungsrichtung bleibt. Die eben genannten Blockaden der Erregungsweiterleitungen führen zu einer veränderten, desynchronisierten Abfolge der Vorhof- und Kammerkontraktionen. Der gerichtete und rhythmische Blutfluss kommt dadurch ins Stocken, da sich die Herzkammern nicht vollständig füllen und enthaltenes Blut nicht komplett auswerfen können. Der Blutfluss verlangsamt sich dadurch oder kommt zum vollständigen Erliegen. Die Folgen solcher Desynchronisationen bedeuten erhebliche Beeinträchtigungen der Auswurfleistung des Herzens. (Pape et al., 2014; Renz-Polster et al., 2013).

In den letzten 60 Jahren haben sich elektrische Therapieansätze mit jährlich rund 100.000 implantierten Schrittmachern, Defibrillatoren und kardialen Resynchronisationsmodulen zu den

erfolgreichsten Dauertherapieformen für Herzrhythmusstörungen etabliert (Nelson, 1993; Raatikainen et al., 2016). Die erste erfolgreiche Anwendung eines elektrischen Schrittmachers, dessen Elektroden an der Herzwand verankert und somit im Brustkorb implantiert waren zeigte Weirich et. al. im Jahr 1957 (Weirich et al., 1957). Die Einheit zur elektrischen Impulsgenerierung blieb extern und war aufgrund fehlender Batterien noch an eine feste Stromquelle gebunden. Getrieben durch einen wachsenden Bedarf, spezialisierter Therapieformen, Sicherheit der Patient*innen und Anwendungskomfort erfuhren die elektrischen Schrittmacher ab 1957 eine enorme Entwicklung (Trappe, 2014). Hinsichtlich der Sicherheit der erkrankten Personen wurde auf Grund instabiler Stromnetze im Jahr 1957 der batteriebetriebene Impulsgenerator entwickelt (Aquilina, 2006), was den Patient*innen gleichzeitig eine uneingeschränkte Bewegungsfreiheit ermöglichte. Bereits im darauf folgenden Jahr (1958) wurden die ersten Tierversuche mit implantierbaren Herzschrittmachern durchgeführt und ein Jahr später (1959) erhielt der erste Patient einen implantierten Herzschrittmacher (Chardack, 1981). In den folgenden Jahrzehnten folgten schnelle Entwicklungen hinsichtlich der Bedienfreundlichkeit und im Nutzungskomfort. Unter anderem konnte ab Mitte der 1970iger durch kabellose Datenübertragung fortan die Programmierung ohne risikobehaftete Operationen angepasst werden (Aquilina, 2006). Die ersten Gehäuse aus Epoxidharz und Silikonkautschuk wurden durch Titan ersetzt (Williams, 1977a, 1977b). Die Lebensdauer der Batterie wurde verbessert, sodass ein operationsbedingender Wechsel erst nach Jahren erfolgen musste (Kindermann et al., 2001; Rosen et al., 2008). Vielfältige diagnostische Messungen erlauben in Kombination mit der entsprechenden Software für unterschiedliche therapeutische Stimulationsmuster eine individuelle und situationsbedingte Stimulation des Herzens (Rosen et al., 2008). Mittlerweile sind die implantierten Herzschrittmacher Miniaturgeräte mit ausfahrbarer Schraubelektrode, die in das Lumen des Ventrikels endokardial eingesetzt werden können (Trappe, 2014).

Für die verschiedenen bradyarrhythmischen Herzinsuffizienzen haben sich unterschiedliche Stimulationssysteme entwickelt, bei denen Anzahl und Positionierung der Stimulationselektroden und Aktivitätssensoren variieren. Die Geräte werden mit dem sogenannten NBG-Code klassifiziert, der ihre Art und Funktion beschreibt. Dabei steht NBG für *NASPE/BPEG Generic Pacemaker Code* und ist die Vereinheitlichung der amerikanischen NASPE (*North American Society of Pacing and Electrophysiology*) und britischen BPEG (*British Pacing and Electrophysiology Group*). Durch einen fünfstelligen Code wird Stimulationsort, Ort der Detektion, Betriebsart, Programmierbarkeit und eventuelle multiple Stimulationsart angegeben (Bernstein et al., 2002). Tabelle 1 zeigt eine Zusammenfassung des NBG-Codes.

Tabelle 1: NBG-Code Tabelle zur Schrittmacherklassifizierung (Bernstein et al., 2002)

Position	I	II	III	IV	V
Bedeutung	Stimulationsort	Sensorort	Betriebsart	Frequenzadaption	Multifokale Stimulation
	0 (keiner)	0 (keiner)	0 (keine)	0 (keine)	0 (keine)
	A (Atrium)	A (Atrium)	T (getriggert)	R (adaptiv)	A (Atrium)
	V (Ventrikel)	V (Ventrikel)	I (inhibiert)		V (Ventrikel)
	D (Dual A+V)	D (Dual A+V)	Dual (T+I)		Dual (A+V)
Hersteller- angabe	S (Single A/V)	S (Single A/V)			

Ein Schrittmachersystem soll einen bradykarden Herzschlag beschleunigen. Die wesentliche Zielsetzung in der wissenschaftlichen und technischen Weiterentwicklung der Schrittmacher ist es, dass die künstliche Erregung die Kontraktion so physiologisch wie möglich ablaufen lässt. Bereits 1981 wurden die Schrittmacher hierfür mit Sensoren ausgestattet, die natürliche Erregungen bemerkten, wodurch die Steuerung des elektrischen Pulses angepasst wurde, damit ein solcher Impuls nicht in die Refraktärzeit der Herzmuskelzellen fiel (Donaldson et al., 1983; Rickards and Norman, 1981). Seit dieser Zeit wurden die Sensoren leistungsfähiger und kleiner und es etablierten sich unterschiedliche Kammerstimulationssysteme. Bei Sinusknotenkrankheiten werden Herzschrittmacher eingesetzt, die den Herzschlag vom rechten Vorhof aus stimulieren, indem die Erregung über die physiologischen Leitungsbahnen weitergeleitet wird (NBG-Code: AAI). Bei einem AV-Block werden die Herzschrittmacher apikal im rechten Ventrikel (NBC-Code: VVI) oder biventrikulär (NBC-Code: DVI) eingesetzt. Die biventrikuläre Stimulation über die Apizes der beiden Ventrikel wird momentan als die sogenannte kardiale Resynchronisationstherapie (CRT, *cardiac resynchronization therapy*) bezeichnet. Aktuell prüfen wissenschaftliche Untersuchungen ob eine Stimulationen über den His-Bündel der biventrikulären Stimulation (BVP, *biventricular Pacing*) überlegen ist (Vijayaraman et al., 2018). Bei Herzinsuffizienzpatient*innen mit Linksschenkelblock (LBBB, *left bundle branch block*) bewiesen die links- und biventrikuläre Stimulationen eine deutliche Verbesserung in der systolischen Aktivität und der linksventrikulären Synchronisation gegenüber der rechtsatrialen Stimulation. Die kombinierte Stimulation über His-Bündel und linkem Ventrikel zeigte zudem einen verbesserten Blutdruck und somit eine verbesserte Hämodynamik (Padeletti et al., 2016). Weiterhin zeigt die Stimulation über den His-Bündel auch bei nachfolgenden Blockierungen innerhalb der Leitungsschenkeln eine verbesserte Erregungsausbreitung und Kammerkontraktion im Vergleich zur biventrikulären Stimulation. Im EKG lässt sich dies durch schmalere QRS-Komplexe nachvollziehen (Sharma et al., 2017). Gleichzeitig zeigen Aktivierungsanalysen des Myokards, dass die Ventrikel im Vergleich zur BVP nicht zu früh aktiviert werden (Arnold et al., 2018). Dies führt zu einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks und damit zu

einer verbesserten Hämodynamik. Es gibt mehrere Erklärungen und Annahmen, wie trotz eines Schenkelblocks die Erregung an distale Myokardregionen weitergeleitet wird. Die wahrscheinlichste Annahme begründet sich in der longitudinalen Auftrennung des His-Bündels, wobei die Erregung in benachbarten Bereichen des Bündels an der Blockierung vorbei geführt wird (Narula, 1977). Durch die selektive Stimulation bestimmter Bündelfasern ergibt sich eine Art elektrischer Bypass (Ali et al., 2018). Eine andere Annahme bedient sich der Theorie der virtuellen Elektroden Polarisation, die durch eine unipolare extrazelluläre Elektrodenspannung entsteht. Die Theorie beschreibt, dass eine unter Spannung stehende Elektrode ihr umliegendes Gewebe de- oder hyperpolarisiert. Dadurch bildet sich an einer anderen Stelle des Gewebes eine virtuelle gegenpolarisierte Elektrode, in deren Umgebung das Gewebe entsprechend hyper- oder depolarisiert (Roth, 1995). Die dritte Annahme basiert auf der Theorie der Source – Sink Beziehung (Xie et al., 2010), laut welcher so viel Spannung angelegt wird, sodass der Block in der Leitungsbahn überwunden und in der dahinter liegenden Region der Grenzwert zur Depolarisation trotz abfließender Ladung erreicht wird. Eine vierte Annahme beschreibt die retrograde Aktivierung des His-Purkinje Systems. Dabei wird ein zur Basis liegender Ast des Leitungssystems durch umliegendes Gewebe stimuliert, der die Erregung retrograd bis an den Hauptstamm leitet. Anschließend wird das Signal anterograd in die zum Apex liegenden Bereiche transportiert (Ali et al., 2018; Vijayaraman et al., 2018).

1.2.2 Defibrillatoren zur Therapie von Tachykardien

Bei einer Tachykardie liegt die Frequenz des Herzschlags in ruhender Position anhaltend bei über 100 – 150 Herzschlägen pro Minute. Faktoren wie Stress oder erhöhte Schilddrüsenfunktion können zu einer Sinustachykardie führen, in der der Herzschlag durch einen zu schnellen Sinusrhythmus bestimmt wird. Weitere Gründe für Tachykardien können Extrasystolen sein, deren Ursprung ektopisch sind. Es sind zusätzliche Herzschläge, deren Erregung nicht vom Sinusknoten ausgehen. Aufgrund des Ursprungs der Erregungsbildung wird zwischen supraventrikulären und ventrikulären Tachykardien unterschieden. Zudem können akzessorische („zusätzliche“) Leitungsbahnen, zwischen Atrien und Ventrikel, zu frühzeitigen Ventrikelstimulationen oder zu kreisenden Erregungen führen. (Ganz and Friedman, 1995; Pape et al., 2014).

Die häufigste und bedeutsame Herzrhythmusstörung ist das Vorhofflattern bzw. Vorhofflimmern (Bruegmann et al., 2018; Lip et al., 2012). Diese atriale Tachykardie kann einzeln, bzw. in kurzen Episoden auftreten und wird in solchen Fällen von Patient*innen nicht unbedingt wahrgenommen. Bei länger andauerndem Vorhofflimmern können Symptome wie Palpitationen, Kurzatmigkeit, Belastungsintoleranz, Brustschmerz, Unwohlsein und Schwindel vorkommen. Diese Arrhythmie zeichnet sich durch ein chaotisches Aktivitätsmuster aus, bei dem benachbarte Myokardbereiche nicht

mehr synchron, sondern unabhängig voneinander erregt werden, wodurch der reguläre Sinusrhythmus unterdrückt wird. Bei Frequenzen zwischen 220 bpm/min – 350 bpm/min (bpm/min, *beats per minute*) spricht man von atrialen Flattern, sobald die Frequenzen über 350 bpm/min steigt bezeichnet man es als Vorhofflimmern. Einzelne Erregungen können dabei über den AV-Knoten an das Kammermyokard weitergeleitet werden, wodurch sich ein unregelmäßiges Kontraktionsmuster bildet. Man bezeichnet dies als absolute Arrhythmie, die sich durch einen irregulären Pulsrhythmus mit unterschiedlichen Pulsamplituden feststellen lässt (Pape et al., 2014; Zimetbaum, 2017). Hämodynamisch zeichnet sich dies durch einen Blutflussstau aus. Ohne eine vollständige Kontraktion der Vorhöfe wird das Blut nur teilweise aus den Atrien in die Ventrikel gepumpt oder, durch Unterdruck in den Herzkammern, angesogen. Gleichzeitig verlangsamt sich der Blutfluss durch die irregulären Kammerkontraktionen auf lebensgefährliche Weise.

Die ventrikuläre Tachykardie zeichnet sich durch schnelle, unkoordinierte Erregungen im Kammermyokard aus, was im EKG als irreguläre Ausschläge ohne erkennbare EKG-typische Form wahrgenommen wird. Dadurch erzielen die Herzkammern weder eine wirksame Füllung noch Entleerung, was hämodynamisch in einem Kreislaufstillstand endet. Da dies eine körperweite Nährstoff- und vor Allem Sauerstoffunterversorgung bedeutet, die auch den Herzmuskel selbst betrifft, kann dies zum plötzlichen Herztod führen. Die elektrische Defibrillierung muss akut erfolgen, da das Kammermyokard nicht von selbst in den gesunden Sinusrhythmus zurückfindet (Bruegmann et al., 2016; Pape et al., 2014; Trappe, 2016).

Bei der elektrischen Defibrillierung wird über zwei Elektroden ein Stromstoß, mit bis zu 10 Millisekunden Dauer und mit 1000 oder mehr Volt Spannung appliziert, wodurch die gesamte Herzmuskulatur auf einmal depolarisiert wird. Durch die gleichzeitig beginnende Refraktärzeit der Muskelzellen und der schnellen Repolarisation des Sinusknotens, kann dieser wieder als primärer Schrittmacher die Erregungen des Sinusrhythmus übernehmen (Pape et al., 2014; Trappe, 2014).

Fundamentale Erkenntnisse für die Entwicklung der modernen Defibrillatoren, wie die Methode der Gleichstrom Defibrillation (Gurvich and Yuniev, 1939) und die biphasisch gepulste Defibrillation (Gurvich and Makarychev, 1967) gehen auf Naum Gurvich aus der UdSSR zurück. Seine Forschungen wurden mit einer gewissen Verzögerung durch den Eisernen Vorhang des kalten Krieges, in der Wissenschaft der westlichen Länder bekannt (Cakulev et al., 2009; Efimov, 2009).

Heutige externe Defibrillatoren sind mittlerweile mit Sensoren ausgestattet, wodurch sie halb- oder vollautomatisiert (AED, automatisierter externer Defibrillator) an vielen öffentlichen Notfallstationen vorhanden sind und von Laien zur Ersthilfe angewendet werden können (Rho and Page, 2007). Für Patient*innen mit wiederkehrenden ventrikulären Tachykardien begann 1969 die Entwicklung der

implantierbaren Defibrillatoren (Mirowski et al., 1990-07; Schuder, 1970), die heutzutage als sogenannte ICDs (*implantable cardioverter defibrillator*) einen plötzlichen Herztod effektiv verhindern können.

1.2.3 Risiken der elektrischen Stimulation

Trotz der weitreichenden Entwicklung der elektrischen Stimulationstherapien ist deren Einsatz immer mit Risiken verbunden. Auf der Zellebene betrachtet können starke elektrische Impulse vor Allem das an den Elektroden umliegende Gewebe schädigen und somit physiologische Eigenschaften beeinflussen. Unter anderem wurde bei *in vitro* Versuchen eine vorübergehende Schädigung der Zellmembranen durch Elektroporation festgestellt, wodurch die Zellen wegen der Zellwandschädigungen nicht oder nur mit wesentlich höherer angelegter Spannung depolarisiert werden konnten (Tovar and Tung, 1992). Zudem kann die Elektroporation der Sarkolemmen weitere Arrhythmien zur Folge haben, da die Poren eine ionenunspezifische Passage erlauben und der intrazelluläre Ca^{2+} Spiegel steigen kann bevor die Poren verschlossen werden (Kodama et al., 1994). Eine weitere zelluläre Veränderung durch starke elektrische Impulse ist die Entkoppelung der Zellen durch Verlust oder Degradation von Cx43 (Connexin43) (Sambelashvili et al., 2004). Cx43 formen zwischen Kardiomyozyten Gap junctions, die die elektrochemische Erregungsweiterleitung zwischen den Muskelzellen ermöglichen. Durch den Verlust der Gap junctions zwischen benachbarten Zellen, kann eine Erregung nicht mehr auf die jeweiligen Zellen übertragen werden. Die Erregungsverteilung muss demnach über andere Zellen erfolgen, wodurch die Kontraktionsabfolge im Myokard verändert bzw. gestört wird.

Betrachtet man die Risiken aus der Sicht von Patient*innen ist zu bedenken, dass mittlerweile über 50 % derjenigen, die einen implantierten Schrittmacher tragen, über die Batterielaufzeit von durchschnittlich 5 – 11 Jahren hinaus leben. Dies ist eine gute Entwicklung und sicherlich der verbesserten medizinischen Versorgung zu verdanken, hat aber für diese Patient*innen eine weitere risikobehaftete Operation im fortgeschrittenem Alter zur Folge (Borek and Wilkoff, 2008; Hauser, 2005; Kindermann et al., 2001; Markewitz, 2012). Das Risiko einer Folgeoperation wird gesteigert durch technisch bedingte Früh- und Spät komplikationen. Die schwerwiegendste Frühkomplikation ist die Ventrikelperforation (Häufigkeit 1 %) mit Perikardtamponade. Die Perforation des Myokards kann vorerst völlig unauffällig passieren und erst einige Tage später durch Zwerchfellzucken und einem Anstieg der Schrittmacherschwellung bemerkbar werden. Die Dislokation der Elektroden stellt eine häufige Komplikation dar (< 1 % bei erfahrenen Kliniken, 68,2 %; > 5 % Dislokation bei 9,4 %, mit steigender Tendenz). Weiterhin sind Infektionen der Schrittmachertasche oder des Elektrodensystems sehr gefürchtet (Häufigkeit 1 – 12 %) und führten bei 5,8 % zu einer Revisionsoperation (Markewitz,

2012). Als Spätkomplikation bezeichnet man Fehlfunktionen des Generators oder des Elektrodensystems, wie z.B. Isolationsdefekte bei den Elektroden, die zu fehlender Stimulation bei vorhandenem Stimulusartefakt, oder fehlerhafter Impulserkennung führen. Wie auch bei den Frühkomplikationen sind im Spätverlauf Infektionen gefürchtet, da sie oft mit einer erhöhten Morbidität einhergehen, oder tödlich enden (Trappe and Gummert, 2011).

Bei implantierten Defibrillatoren kommen neben den zellulären Effekten ebenfalls postoperative Komplikationen vor, wie Elektrodenprobleme (12 % Häufigkeit) mit Isolationsdefekten, Kabelbrüchen durch Materialermüdung (Trappe and Gummert, 2011). Sogenanntes *Oversensing*, die Wahrnehmung von Störimpulsen durch inadäquate Schockabgaben (12 % Häufigkeit), werden unter anderem durch tachykardes Vorhofflimmern und bakteriellen Befall der Elektroden hervorgerufen (Trappe and Gummert, 2011). Durch diese Fehlerbelastung ist auch eine nennenswerte psychische Beeinträchtigung oder Angststörung indiziert. Zu häufige oder inadäquate Schocks können zu einer angepassten, passiven Lebensweise und zu depressiven Zuständen oder zu Psychosen vor der nächsten elektrischen Entladung führen (Fricchione et al., 1989; Trappe and Gummert, 2011).

1.3 Optogenetik – Channelrhodopsin-2 zur optischen Stimulation des Herzens

Die Wortfindung Optogenetik wurde im Jahr 2006 in der Arbeit von Deisseroth et. al. zum ersten Mal definiert (Deisseroth et al., 2006). In seiner Arbeit bezog sich Deisseroth auf die genetische Modifikation von Neuronen mit einem lichtsensitiven Kanalprotein, um mit Hilfe von Lichtsignalen spezifisch Erregungen in unterschiedlichen Neuronen beobachten zu können und somit dem großen Ziel des *brain mappings* (Kartierung des Gehirns) näher zu kommen. Die lichtsensitiven Werkzeuge hierzu sind eine Gruppe von Opsinen, welche sich in der Natur in Algen, Archaeobakterien, Bakterien und Pilzen befinden (Nagel et al., 2003) und dort der Phototaxis bzw. Photophobie dienen (Foster et al., 1984; Hegemann, 1997). Die Gruppe um Peter Hegemann hat viele dieser Werkzeuge gefunden, beginnend 2002 mit dem Channelrhodopsin-1, einem lichtgesteuertem Protonenkanal aus der Blaualge *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel et al., 2002). Interessanter für die Aktivierung von Neuronen und anderen erregbaren Zellen wie z.B. Muskelzellen war die Entdeckung von Channelrhodopsin-2 (ChR2), einem lichtaktivierten, selektiven Kationenkanal, ebenfalls aus der Blaualge *Chlamydomonas reinhardtii* (Nagel et al., 2003). ChR2 öffnet sich unter Beleuchtung mit blauem Licht ($\lambda = 470 \text{ nm}$) und führt zu einem selektiven Kationen-Einwärtsstrom, der zu einer Depolarisation und schlussendlich in einem Aktionspotential der Zelle resultieren kann. Die Depolarisation führt zu einem Ca^{2+} Ionenanstieg innerhalb der Muskelzelle, wodurch eine Kontraktion ausgelöst wird.

Hinsichtlich der Physiologie des Herzens bietet dieses System eine neuartige Alternative zur Generierung eines künstlichen Schrittmachers, was 2010 im embryonalen Zebrafisch (Arrenberg et al., 2010) und in der Maus (Bruegmann et al., 2010) gezeigt wurde. In diesen Arbeiten wurden transgene Tiermodelle erzeugt, deren Muskelzellen entsprechende lichtsensitive Kanalrhodopsine exprimierten, wodurch Herzen durch Lichtimpulse stimuliert werden konnten.

Channelrhodopsin-2, ist das derzeit am häufigsten eingesetzte optogenetische Werkzeug (Entcheva, 2013; Pianca et al., 2017) und gehört wie Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin (BR, HR) (Matsuno-Yagi and Mukohata, 1977; Oesterhelt and Stoeckenius, 1971; Wagner et al., 1981) zu einer Opsinklasse, die 13-*cis*-Retinal oder all-*trans*-Retinal (Abbildung 4A) als Chromophor verwenden (Zhang et al., 2011). Ein Chromophor ist ein Photonen-absorbierender Co-Faktor. Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin sind aktive Protonenpumpen, wohingegen ChR2 ein klassischer Kationenkanal ist, der entlang eines elektrochemischen Gradienten Ionen transportiert (Nagel et al., 2003). Das Chromophor all-*trans*-Retinal ist kovalent an den Ionenkanal gebunden (Kato et al., 2012). Sobald das all-*trans*-Retinal mit einem Photon interagiert, wird es in die isomere 13-*cis*-Retinal Konfiguration überführt (Abbildung 4), wodurch der Ionenkanal geöffnet wird (Hegemann, 1997).

All-*trans*-Retinal (Abbildung 4) ist ein essenzieller Nährstoff, d.h. er kann nicht vom menschlichen Körper hergestellt werden, sondern wird über die Nahrung in ausreichendem Maße aufgenommen und den Zellen zur Verfügung gestellt (Ishizuka et al., 2006; Zhang et al., 2006). Die Kovalente Verbindung des all-*trans*-Retinal und dem Channelrhodopsin-2 entsteht durch eine Kondensationsreaktion, in der die Carboxylgruppe des Chromophors (Aldehyd) and die Aminogruppe eines konservierten Lysins des Kanalproteins bindet und somit die sogenannte protonierte Retinal Schiffische Base entsteht (RSBH) (Zhang et al., 2011).

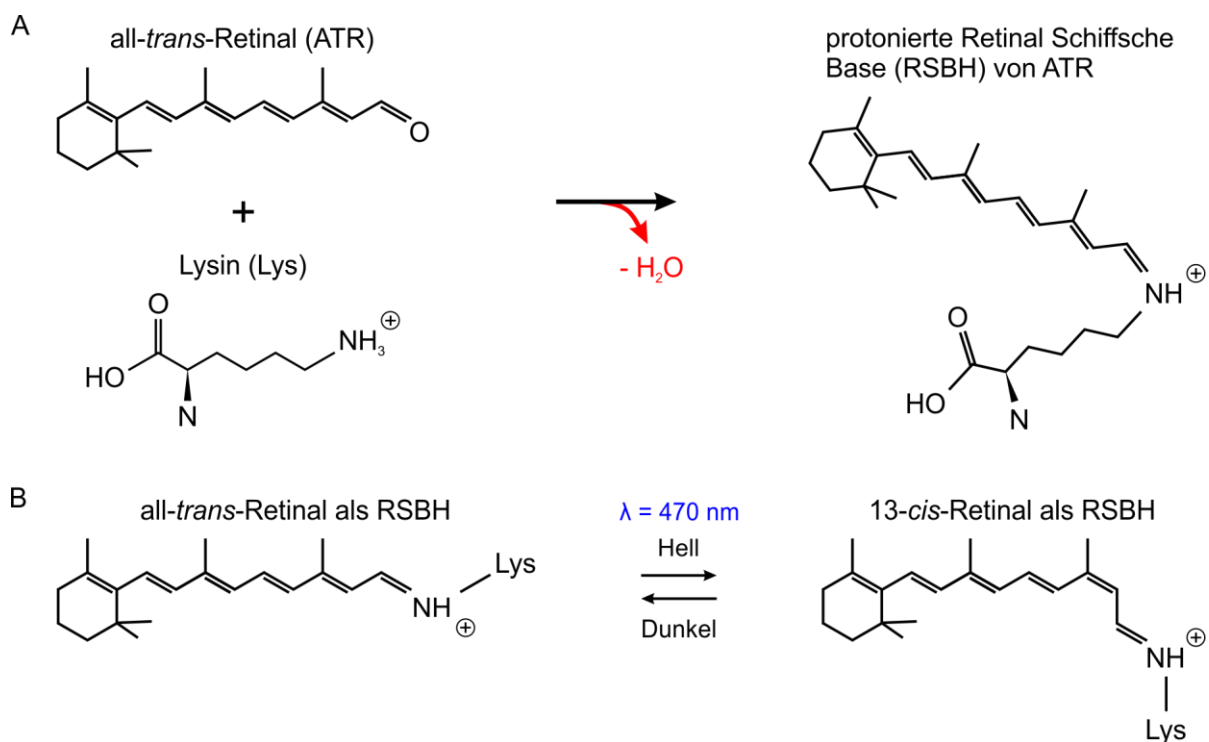


Abbildung 4: all-*trans*-Retinal, 13-*cis*-Retinal, sowie die jeweiligen Schiffischen Basen an Lysin gebunden

Mikrobielles Channelrhodopsin-2 hat bei geschlossener Kanalpore ein inaktives all-*trans*-Retinal. Durch Licht ($\lambda = 470 \text{ nm}$) wechselt es in die aktivierte 13-*cis*-Retinal Konfiguration, wodurch eine Konformationsänderung von Channelrhodopsin-2 bewirkt wird und sich die Kanalpore öffnet. **(A)** Kovalente Verbindung von all-*trans*-Retinal und Lysin (Verbindungspunkt an TM 7 von Channelrhodopsin-2) durch Kondensationsreaktion zur retinalen Schiffischen Base (RSBH). **(B)** Photoisomerisation: all-*trans*-Retinal, 13-*cis*-Retinal in Verbindung als retinale Schiffische Base an Lysin.

Die Kristallstruktur von ChR2 zeigte, dass das Protein aus sieben Transmembranhelices bzw. Transmembrandomänen (TM) besteht (Abbildung 5). Mit einer molekularen Masse von 77 kDa besteht ChR2 aus 737 Aminosäuren (AS), wovon die rund 315 AS am N-Terminus primär für die Generierung des Photostroms verantwortlich sind (Kateriya, 2005; Kato et al., 2012; Nagel et al., 2003). Daraus ergab sich, dass in der Optogenetik lediglich der verkürzte ChR2-Teil aus 1-315 AS verwendet wird. In der Kristallstruktur zeigte sich, dass der leitende Kern durch die TM 1, 2, 3 und 7 (auch mit Buchstaben A – G benannt) geformt wird. Insbesondere wurde deutlich, dass die TM 7 essentiell für die kovalente Bindung mit dem Retinal ist und die TM 2 die Ionenselektivität und Ionenleitfähigkeit bestimmt (Kato

et al., 2012; Müller et al., 2011). In ChR2 wurde die folgende selektive Ionenleitfähigkeit festgestellt: $H^+ > Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+} \gg Zn^{2+} > Mg^{2+}$ (≈ 0). Diese Ionen zeigten bis auf Mg^{2+} eine starke inverse Abhängigkeit zum Atomradius des Kations (Nagel et al., 2003). Im Fall vom Mg^{2+} verhindert wahrscheinlich die hohe Hydratation des Ions die Permeabilität (Nagel et al., 2003).

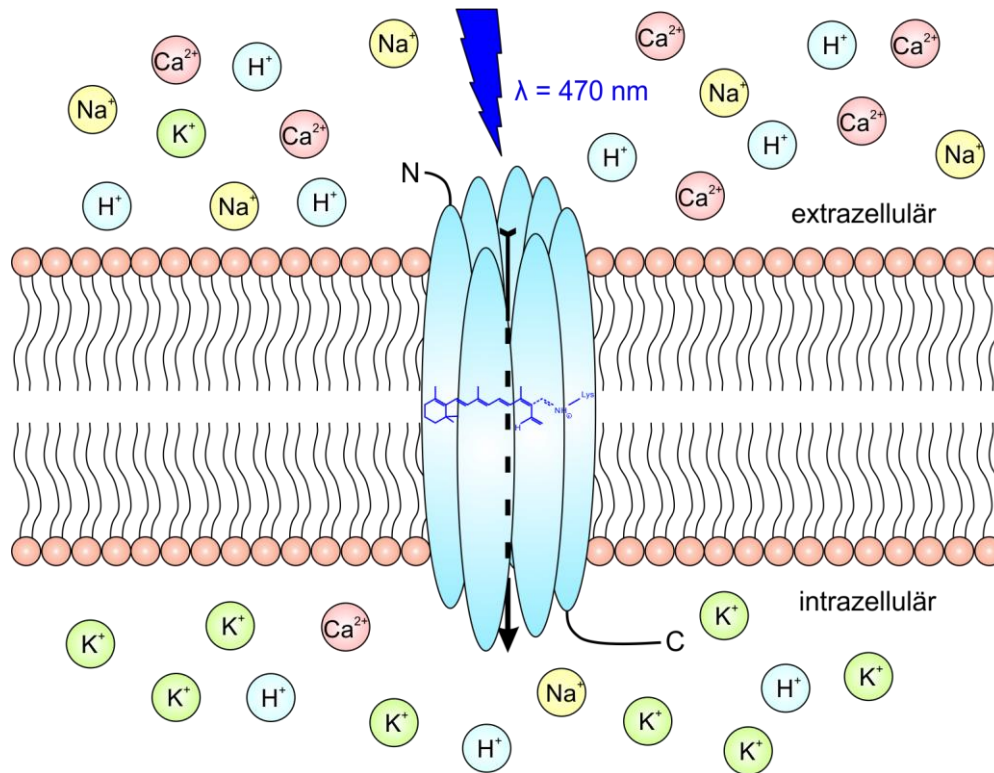


Abbildung 5: Channelrhodopsin-2, ein lichtsensitiver Kationenkanal

Channelrhodopsin-2 ist ein lichtsensitiver Kationenkanal, der selektiv H^+ , Na^+ , K^+ und Ca^{2+} Ionen entlang des elektrochemischen Membranpotential transportiert. Die Kanalpore öffnet sich aufgrund einer Konformationsänderung des Proteins, die durch die Photoisomerisation des all-*trans*-Retinals als RSB ausgelöst wird.

Alle Rhodopsine von mikrobieller Herkunft unterliegen einem sogenannten Photozyklus, einem zyklischen Reaktionsverlauf, der vom Grundzustand über Zwischenstufen in einen energetisch aktivierten Zustand und wieder zurückführt. Im Gegensatz zu den Opsinen der Säugetiere wird für die Rückführung in den Grundzustand kein weiteres Photon und keine enzymatische Reaktion benötigt, da sie thermisch erfolgt (Haupts et al., 1997; Hegemann et al., 2005). Trotz der intensiven Forschung an und mit ChR2 sind viele strukturelle Funktionen und Gründe für die Konformationsänderungen des Proteins noch unbeantwortet und bieten Grundlage für weitere Forschung. Verschiedene Modelle bieten Annäherungen zum Verständnis des Photozyklus und der damit einhergehenden Konformationsänderung des Kanals. Drei solcher Modelle werden in Abbildung 6 dargestellt. Der erste Photozyklus (3-stufig) entstand durch die Analysen der Photoströme (Abbildung 6A). Rhodopsine starten ihren Photozyklus in der Regel mit der Lichtabsorption, wodurch das retinale Chromophor (ATR) aus dem Grundzustand (C) heraus anregt wird. Die Reaktionen des Zyklus führen in den offenen

Zustand (O), gefolgt von dem geschlossenen desensibilisierten Zustand (D) zurück zum geschlossenen Grundzustand (C) (Nagel et al., 2005a). Für den Wechsel aus dem Grundzustand (C) in den geöffneten Zustand (O) wurde ein Zeitintervall von 0,2 ms festgestellt, wobei die Lichtaktivierung in den energetisch erregten Zustand sehr schnell (< 1 ns) erreicht wird und in dem vereinfachten Modell nicht extra berücksichtigt wurde. Für die Reaktion vom offenen Zustand (O) in den geschlossenen desensibilisierten Zustand (D) wurden 20 ms (pH = 7,3) gemessen, wobei die Dauer hierfür pH-abhängig ist. Die Wiederherstellung aus dem desensibilisierten Zustand (D) in den Grundzustand (C) dauerte 2 s.

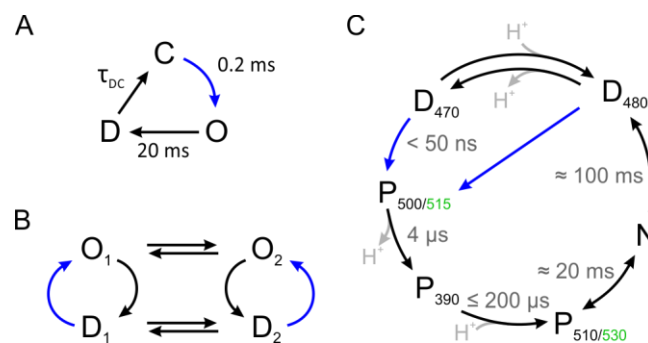


Abbildung 6: Photozyklusmodell

Unterschiedliche Photozyklusmodelle. Blaue Pfeile zeigen lichtaktivierte und schwarze Pfeile im Dunklen stattfindende Reaktionen bzw. Zustandsveränderungen an. **(A)** Nach Nagel et al., 2005b, das erste Modell mit drei Zuständen. Grundzustand (C) wird durch Lichtaktivierung in den offenen Zustand (O) versetzt. Die Reaktionen in den geschlossenen desensibilisierten Zustand (D) und weiter zurück in den Grundzustand (C) erfolgen ohne Lichteinfluss. **(B)** 4-stufiges Zustandsmodell nach Hegemann et al. 2005 mit zwei offenen Zuständen O_1 und O_2 , sowie zwei dunklen Zuständen D_1 und D_2 , welche durch Thermik gesteuert in Gleichgewichtszuständen vorliegen. **(C)** 6-stufiges Zustandsmodell nach Ernst et al. 2008. Die dunklen Zustände D_{470} und D_{480} liegen in einem pH-abhängigen Gleichgewichtszustand vor. Zwei spektroskopisch nachgewiesene Zwischenzustände, die auf das Absorptionsmaximum hinweisen sind in diesem Modell vorhanden. Die azidischen (sauren) Formen der Zwischenzustände sind in grün hervorgehoben. Es wird angenommen, dass $P_{510/530}$ weiterleitende Zustände sind. Ungefähre Zeitintervalle (τ) in grau angegeben. N ist ein Zwischenprodukt mit ähnlichen spektralen Eigenschaften.

Dies führte zum 4-stufigen Modell (Abbildung 6B), welches die Autoren Nagel et al. für ChR2 in Grundzügen bereits beschrieben, jedoch erst von Hegemann et al. 2005 für Messungen an ChR1 schematisch dargestellt wurde. Es besteht aus zwei dunklen Stadien D_1 und D_2 und zwei lichtaktivierten und weiterleitenden Zuständen O_1 und O_2 (Hegemann et al., 2005). Laut Messungen an VChR2 (ChR2 von *Volvox carter*) liegen die dunklen Stadien in einem pH-abhängigen Gleichgewichtszustand vor (Ernst et al., 2008). Dem 4-stufigen Modell zur Folge wandeln sich die dunklen Zustände durch Lichtaktivierung in entsprechend unterschiedliche energetisch-erregte Zustände O_1 und O_2 um, die ebenfalls in einem pH-abhängigen Gleichgewichtszustand vorliegen, wobei bei neutralem pH-Wert ein größerer Anteil an O_2/O_1 vorliegt (Ernst et al., 2008; Hegemann et al., 2005). Ergebnisse aus spektroskopischen Untersuchungen von VChR und elektrophysiologische Daten führten zum 6-stufigen Modell (Ernst et al., 2008), welches in Abbildung 6C dargestellt ist. Dieses Modell enthält wie zuvor das 4-stufige Modell zwei dunkle Konformationszustände (Hegemann et al., 2005) hier als D_{470}

und D_{480} bezeichnet, die im pH-abhängigen Gleichgewichtszustand vorliegen, sowie deren korrespondierenden lichtaktivierten Zuständen P_{500} und P_{515} . Es wird angenommen, dass das Photoprodukt P_{510} der dominante offene und Ionen-leitende Zustand bei neutralem pH-Wert ist. Es entsteht schrittweise aus den Photon-erregten Zuständen $P_{500/515}$ und dem folgenden P_{390} . Die Autoren Ernst et al. stellten fest, dass der Zustand P_{390} eine starke Blau-gerichtete Absorption hat, wodurch sie davon ausgehen, dass es der einzige Zustand mit einer deprotonierten retinalen Schiffischen Base (RSB) ist. Der Zerfall der Hauptzwischenprodukte $P_{510/530}$ ist laut Ernst et al. biphasisch ($\tau = 20 \mu\text{s}$ und $\tau = 100 \mu\text{s}$) und deutet auf ein weiteres Zwischenprodukt N mit ähnlichen spektralen Eigenschaften hin. Mit den hier genannten Modellen beschreiben die Autoren viele messbaren Eigenschaften, welche ChR2 und seine verwandten Kanäle von Lichtaktivierung bis zur Kanalöffnung und der Wiederherstellung der Licht-sensitiven Konfiguration haben. ChR2 bietet somit noch viel Grundlage für weitere Forschung.

Channelrhodopsine sind die einzigen bekannten Ionenkanäle, die sich direkt durch Licht aktivieren lassen. Demnach besteht ein großes Interesse diese Proteine in vielen Feldern wissenschaftlich und möglichst auch klinisch einzusetzen. Die jeweiligen Anwendungsgebiete stellen spezifische Anforderungen an die Proteine, welche die bisher bekannten Kanalrhodopsine, so auch ChR2, unzureichend erfüllen. Mutagenese und Chimäragenese ermöglichen rekombinante Variationen und Neukonstruktionen von Channelrhodopsinen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Eine der ersten Mutationen war die ChR2(H134R) Variation von ChR2 (Nagel et al., 2005b). Die Autoren tauschten Histidin-134 durch Arginin aus und erhielten eine *gain of function* (gof, Funktionsgewinn) Mutation mit einer besseren Expression und einem größeren stationären Photostrom gegenüber dem ChR2-Wildtyp (ChR2-WT). Vor Allem in der neurologischen Forschung, waren ChR2 mit schnelleren Aktivierungs- und Deaktivierungsfrequenzen erwünscht, da viele Nervenzelltypen mit einer höheren Frequenz Informationen austauschen, als der ChR2-WT Signale stimulieren kann (Mager et al., 2018). Daher kombinierten Lin et al. in 2009 Teile von ChR1 und ChR2, um die bekannten Vorteile beider Kanalproteine zu bündeln: Die niedrigere Plateauphase und die schnellere Off-Kinetik von ChR1 mit der Kationenpermeabilität und dem stärkeren Photostrom von ChR2. Die Autoren nutzten homologe Genbereiche von ChR1 und ChR2 und konstruierten hierdurch die Chimären ChD, ChEF und ChIEF (Lin et al., 2009) mit einem N-Terminus ChR1 und einem C-Terminus von ChR2. Je nach Größe des jeweiligen Anteils zeigten die Chimären entsprechend unterschiedliche physiologische Eigenschaften. Dabei tat sich ChIEF mit einer sehr niedrigen Plateauphase und einer sehr schnellen Erholungszeit nach Inaktivierung hervor und konnte somit Lichtstimulationen mit Frequenzen von 50 Hz und 100 Hz folgen (Lin et al., 2009). Noch schnellere Frequenzen mit bis zu 200 Hz wurden 2010 mit ChETA erreicht, einer E123X Punktmutationsvariante von ChR2, dessen Schließungszeit $\tau_{\text{off}} = 4 - 5 \text{ ms}$ beträgt und wesentlich

kürzer ist als die von ChR2 ($\tau_{\text{off}} = 13,5$ ms) und ChR2(H134R) ($\tau_{\text{off}} = 17,9$ ms) (Gunaydin et al., 2010; Lin, 2011).

Im Jahr 2008 beschrieben Zhang et al. das Kationen-leitende VChR1, ein Channelrhodopsin der Grünalge *Volvox carteri*, dass sie durch Genomanalysen mittels Homologievergleiche von ChR1 und ChR2 in Gendatenbanken fanden. VChR1 ist genetisch näher verwandt mit ChR1 und zeigt auch ähnliche Photoströme. Im Vergleich zu ChR1 hat es eine rotwärts gerichtete Lichtsensitivität mit einer entsprechend hohen *Peak response* (Spitzenempfindlichkeit) bei ≈ 540 nm. Mit dieser Eigenschaft verbanden Forschende die Hoffnung unterschiedliche Zellpopulationen mit verschiedenen Lichtimpulsen anzuregen, um Interaktionen verschiedener Zellverbände zu untersuchen oder variierende Beeinflussungen anderer Systeme in Organismen zu testen. Zudem ermöglicht rotes Licht Zellen aus tiefer liegenden Gewebeschichten zu erreichen, da es im Vergleich zu blauem Licht eine niedrigerer Streuungsrate und eine geringere Absorption hat. Weitere genetische Arbeiten führten Lin et al. im Jahr 2013 zu ReaChR. Dieses rekombinante ChR2 besteht aus einem N-Terminus von ChEF/ChIEF (TM A-E), der TM F aus VChR2 mit Leu171Ile Punktmutation und der TM G von VChR1. Es vereint einen verbesserten Membrantransfer und eine erhöhte Expression in Säugetierzellen mit einer sehr guten Signalantwort und Steady-state Phase bei Lichtsignalen mit Wellenlängen über $\lambda = 600$ nm (Lin et al., 2013).

Anstatt ChRs mit spezifischen Eigenschaften genetisch zu konstruieren nutzte die Gruppe um Klapoetke, et al. den Weg der *de novo Sequenzierung*. Die Autoren nahmen an, dass sich in der Natur bereits ChR2 mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften entwickelt hatten, die sich für den parallelen Einsatz durch unterschiedliche Wellenlängen-Sensitivität eignen und ausreichend Photostrom bereitstellen würden. Sie untersuchten die Transkriptome von 127 Algenarten und fanden die ChRs Vorstufen von Chronos und Chrimson. Chronos stammt von der Grünalge *Stigeoclonium helveticum* und wurde demnach ShChR benannt. ShChR ist ein Kanalrhodopsin mit einer Sensitivität bei 500 nm (hellblau – grün) und mit sehr schnellen kinetischen Eigenschaften. Chrimson ist eines der Channelrhodopsine der Alge *Chlamydomonas noctigama* und wird als CnChR1 bezeichnet. CnChR1 hat bemerkenswerterweise eine Sensitivität bei 625 nm (orange – rot) und zeigte zudem, dass es sogar durch Lichtimpulse im Infrarotlicht Bereich bei einer Wellenlänge von $\lambda = 735$ nm aktiviert werden konnte (Klapoetke et al., 2014).

Tabelle 2: Channelrhodopsin-2 -Varianten bzw. -Chimären und VChR1

ChR2 Varianten bzw. Chimären und VChR1	Veröffentlichung	Maximale Empfindlichkeit [nm]
ChR2	Nagel, et al. 2003	≈ 470
ChR2(H134R)	Nagel, et al. 2005	≈ 450
VChR1	Zhang, et al. 2008	≈ 540
ChD	Lin, et al. 2009	≈ 450
ChEF	Lin, et al. 2009	≈ 470
ChIEF	Lin, et al. 2009	≈ 450
ChETA	Gunaydin, et al. 2010	≈ 490
ReaChR	Lin, et al. 2013	≈ 545
Chronos (ShChR)	Klapoetke, et al. 2014	≈ 530
Chrimson (CnChR1)	Klapoetke, et al. 2014	≈ 625

1.4 Vektoren für den Gentransfer

Nachdem bereits erfolgreich die Funktionalität von ChR2 in Herzmuskelzellen gezeigt wurde (Arrenberg et al., 2010; Bruegmann et al., 2010), stellt sich in Hinblick auf eine mögliche medizinische Anwendung der optischen Stimulationsmethode die Frage: Wie könnte ein Gentransfer von ChR2 in die Muskelzellen eines nativen, zuvor genetisch nicht veränderten Herzens durchgeführt werden? Dabei stehen zwei grundlegende Prämissen im Vordergrund: 1. Sicherheit – der Vektor muss die genetische Information von ChR2 unbeschädigt zum Ziel bringen, ohne dabei die Patient*innen zu beeinträchtigen oder langfristig zu schädigen; 2. Spezifität – der Vektor sollte möglichst ausnahmslos zu den Herzmuskelzellen führen.

Herzkrankheiten gelten weltweit als Herausforderung für die moderne Medizin. Seit den 90iger Jahren gewinnen genetische Therapieansätze immer mehr an Bedeutung neben den traditionellen Therapien wie Pharmakologie, elektrische Implantate und Operationen. Vektoren für den Gentransfer werden in zwei Kategorien eingeteilt: nicht-viral und viral.

Der nicht-virale Gentransfer, die direkte Injektion der nativen DNA als Plasmid in das gewünschte Gewebe, wurden als erstes etabliert. Im Jahr 1990 wurde dies mit dem *LacZ* Gen, welches das Enzym β -Galactosidase codiert, zum ersten Mal im Myokard einer Ratte durchgeführt (Lin et al., 1990). Lin et al. erreichten in der direkten Umgebung der Injektionsstelle eine niedrige Genexpression des *LacZ* Gens. Das Ergebnis war zu schwach für eine wirkliche Gentherapie, weckte aber das Bestreben die Methode zu verbessern oder weitere Vektoren zu finden bzw. zu entwickeln. Zur Expression des gewünschten Gens muss das Trägerplasmid zunächst die Plasmamembran durchdringen und dem zytosolischen Abbau widerstehen. Entweder findet die Transkription des Gens bereits hier statt, oder es besitzt ein sogenanntes NLS, das Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*) und wird zur Transkription in den Nucleus transportiert. Zur Verbesserung der Passage durch die Plasmamembran wurde in den späten 1980igern die Lipofektion, die Transfektion durch Plasmid DNA gebunden an kationischen Lipiden, mit positiven Expressionssteigerungen bei Zellkulturen gezeigt (Felgner et al., 1987; Wang and Huang, 1989). Diese Methode wurde genutzt, um bei Mäusen systemisch über die Schwanzvene Plasmid-Liposom-Komplexe zu injizieren (Hofland et al., 1997; Stewart et al., 1992). Lin et al. erreichten eine positive Expression der eingebrachten Gene nicht nur im Herzen, sondern auch in Lunge, Milz, Leber und in Skelettmuskelzellen (Hofland et al., 1997).

Um Verbesserungsansätze in den Bereichen Expressionsselektivität und systemischer Administration zu liefern werden seit rund 10 Jahren Oligonukleotide zur Modulation oder Expressionssteuerung funktionaler Gene eingesetzt. Zudem bieten sogenannte Antisense-Oligonukleotide das Potential defekte Gene zu reparieren anstatt sie durch neue zu ersetzen (Dominski and Kole, 1993). Viele

vererbte Gendefekte sind Punktmutationen oder Frameshift-Mutationen, und Oligonukleotide ermöglichen durch Basenpaartausch oder hinzufügen bzw. entfernen einzelner Basen ein alternatives Splicing, sodass die Transkription des veränderten oder neuen offenen Leserasters (ORF, *open reading frame*) in einem funktionalen Protein resultiert. Da die Oligonukleotide nach Bedarf konstruiert und synthetisiert werden können ist ihre Genspezifität steuerbar. Dadurch können systemisch in die Blutbahn injizierte Antisense-Oligonukleotide defekte Gene, über mehrere Organe hinweg, reparieren und deren Genexpression beeinflussen (Alter et al., 2006; Wu et al., 2008). Dieser Ansatz erlaubt jedoch nicht neue, artfremde und vor Allem lange Gensequenzen spezifisch in gewünschten Gewebezellen einzuführen, geschweige denn ausschließlich in Kardiomyozyten.

Ein weiterer Blick in die Natur zeigt, dass die Evolution mit den Viren, eine sehr erfolgreiche Gruppe an Mikroorganismen entwickelt hat, die andere Zellen infiltrieren und für ihre Vermehrung nutzen. Interessanterweise klassifizieren nicht einmal Virenforscher sie als richtige Lebewesen, sondern beschreiben sie als „dem Leben nahestehend“ (Mölling, 2015). Der Grund für diese Beschreibung liegt darin begründet, dass sich Viren ohne eine Wirtszelle nicht reproduzieren können, womit sich der virale Lebenszyklus in zwei Abschnitte unterteilt: Infektion und Replikation (Kay et al., 2001). Viren bestehen im Grunde aus ihrem genetischen Material, der RNA oder DNA, und einer sehr resistenten Proteinhülle, dem Kapsid (Lyon et al., 2008). In der Infektionsphase interagiert die Proteinhülle spezifisch mit Liganden der Zielzelle und eröffnet dem viralen Genom eine sichere Passage in die Wirtszelle. Bei einem eukaryotischen Wirt führen Teile des Kapsids das eingeschleuste Genom an den degradierenden Lysozymen vorbei, direkt zum Nucleus (Lyon et al., 2008). In der anschließenden Replikationsphase werden die Polymerasen der Wirtszelle verwendet, um virale regulatorische Gene zu transkribieren, deren Genprodukte zu einer funktionellen Umprogrammierung der Wirtszelle und Vervielfältigung des viralen Genoms führt. Im Anschluss erfolgt die Expression der viralen strukturellen Gene, deren Produkte die neuen viralen Genomsequenzen umschließen und sich zu neuen Viruspartikeln zusammensetzen (Kay et al., 2001).

Die virale Gentransfer-Technologie nutzt die Vorteile des gerichteten und DNA schützenden Transports und der Transkription. Durch Herausschneiden von Genen, die essenziell zur Replikation und für die Pathogenität sind, wird das Potential weitere infektiöse Viren zu produzieren eliminiert, wodurch die Transduktion in diesem Kontext als nicht-replikative bzw. als *dead-end* (Sackgasse) Infektion definiert wird. In den Zielzellen kann dieser Virus weder eine Viruspartikelproduktion bewirken noch andere benachbarte Zellen infizieren, sodass der Tod der befallenen Wirtszelle auch den Verlust des Virus bedeutet. Der ursprüngliche Virus wird durch den genetischen Austausch von viralen zu gewünschten Genen zu einem Träger genetischer Information, einem sogenannten Virusvektor (Vannucci et al., 2013).

Viren als Vektoren für den Gentransfer zu verwenden, wurde das erste Mal 1990 bei einem 4-jährigen Mädchen mit einem hereditären Adenosin-Desaminase-Mangel (ADA, *adenosine deaminase deficiency*) erfolgreich gezeigt. Bei dieser Krankheit entwickeln die Betroffenen indirekt einen schweren Immundefekt (SCID, *severe combined immunodeficiency*). Mittels Apherese wurden von dem Mädchen T-Lymphozyten isoliert, die durch retrovirale Vektoren mit einer funktionalen Kopie des ADA Enzyms transduziert wurden. 9 – 12 Tage später folgte die Reinfusion der manipulierten T-Lymphozyten und innerhalb von 5 – 6 Monaten konnte ein Anstieg bis hin zur Normalisierung der peripheren T-Zellzahl nachgewiesen werden (Blaese et al., 1995).

Nach diesem Therapieerfolg nahm die Forschung trotz vieler Bedenken wie z.B. rückkehrender Pathogenität, unzureichender Selektivität und Transduktionseffizienz, an Fahrt auf und untersuchte das Potential verschiedener Viren für den Gentransfer in den unterschiedlichsten Therapiebereichen. Für die klinische Anwendung wurden die Vektoren abstammend von folgenden Viren am bedeutendsten: Adenoviren (AdV), Adeno-assoziierte Viren (AAV), Herpes simplex Viren (HSV), Retroviren, Lentiviren und Pockenviren. Jede Art zeigte bestimmte Vorteile welche sich für die unterschiedlichsten Therapiegebiete als sinnvoll erwiesen (Vannucci et al., 2013). Im Folgenden wird intensiver auf die Adeno-assoziierten Viren eingegangen, da in dieser Arbeit mit Vektoren zweier AAV-Serotypen gearbeitet wurde.

1.5 Adeno-assoziierte Viren (AAV) als Vektoren

Im Jahr 1965 wurde in einer für Forschungszwecke eingefrorenen Probe von Affen-Adenoviren Typ 15 (SV15, *simian adenovirus 15*) kleine, DNA-enhaltende Partikel als Verunreinigung nachgewiesen (Atchison et al., 1965). Eine andere Forschungsgruppe fand zur selben Zeit ebenfalls solche kleinen Partikel in humanen Adenovirus Proben, glaubte jedoch, dass es sich um Untereinheiten des Adenovirus handelte (Atchison et al., 1966; Hoggan, 1965). Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde ein Durchmesser von 220 – 240 Å (22 – 24 nm) festgestellt und es zeigte sich eine raue Oberfläche, die den Kapsomeren von Viren ähnelte (Atchison et al., 1965; Hoggan et al., 1966). Durch Kultivierungsversuche wurde herausgefunden, dass sich diese kleinen, virusähnlichen Partikel nur in Anwesenheit von SV15 vermehren konnten, und somit entschieden sich Atchison et al. kurzerhand die kleinen Partikel als Adeno-assoziierte Viren (AAV) zu bezeichnen (Atchison et al., 1965). AAVs sind mit ihren 4,7 kb (Kilobasen) langen, einzelsträngigen DNA Genom und dem unbehüllten Kapsid eine der kleinsten, bekannten Viren und gehören somit in die Familie der Parvoviren (Gonçalves, 2005), deren Name sich vom lateinischen *parvus* (klein) ableitet. Sie werden häufig auch als Dependoviren (biologischer Gattungsname) bezeichnet, da sie zur Replikation auf die sogenannten Helferviren angewiesen sind, wofür sie in der Regel Adenoviren oder wie man später feststellte, auch *Herpes simplex* Viren (HSV) verwenden (Daya and Berns, 2008).

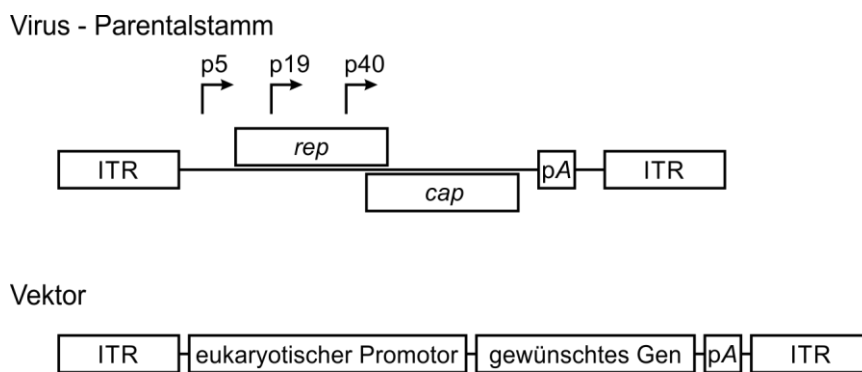


Abbildung 7: Anordnung der Gene im Adeno-assoziierten Virus (AAV) und im AAV-Vektor

Das Genom des parentalen Adeno-assoziierten Virus besteht hauptsächlich aus den *rep* und *cap* Genen, die für Replikations- und Strukturproteine codieren. Die Expression der Gene wird durch die Promotoren p5, p19 und p40 gesteuert und alle RNA-Transkripte haben am 3'-Ende die gleiche Polyadenylierung (pA). Sowohl die pA Sequenz als auch die ITR (*inverted terminal repeat*) Abschnitte werden in den AAV-Vektoren beibehalten. Die Gene *rep* und *cap* hingegen werden durch das gewünschte Gen und einen entsprechenden eukaryotischen Promotor ersetzt.

Das 4,7 kb (Kilobasen) große Genom der AAV hat eine einfache Struktur mit zwei offenen Leserastern (ORF, *open reading frame*), die von 145 bp (*base pairs*, Basenpaare) langen *inverted terminal repeats* (ITR) flankiert werden (Hermonat and Muzyczka, 1984; Kay et al., 2001) (Abbildung 7). Bei den ORFs handelt es sich um die zwei viralen Gene *rep* (Replikation) und *cap* (Kapsid). Die Transkription des 4,2 kb großen *rep* Gens wird von zwei Promotoren p5 und p19 gesteuert, und aufgrund der internen

Spleißdonor- und Spleißakzeptor-stellen codiert es für vier verschiedene Regulatorproteine Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40 (Mendelson et al., 1986).

Das 2,6 kb große *cap* Gen wird durch den P40 Promotor gesteuert und enthält zwei Spleißstellen, wodurch drei Virionproteine VP1, VP2 und VP3 entstehen (Becerra et al., 1985). Zusammen bilden die *cap* Genprodukte eine fast sphärische Proteinhülle aus 60 Untereinheiten mit einer ikosaedrischen Struktur (Gonçalves, 2005). Die ersten 125 bp der ITR sind palindromische Sequenzen, die zueinander komplementär sind und doppelsträngige, T-förmige Sekundärstrukturen bilden (Kay et al., 2001). Laut dem bestehenden Replikationsmodell von Kenneth I. Berns beinhalten die ITR die Startsequenz der viralen Replikation und dienen als Primer für die Zweitstrang-Synthese (Berns, 1990). Zudem enthalten sie mit den *Rep binding elements* (RBE und RBE') und den *terminal resolution sites* (TRS) Sequenzabschnitte, die von den viralen Regulationsproteinen Rep zur Kontrolle des Transkriptionsprozesses der DNA genutzt werden. Hinzu kommt, dass die ITR auch essenziell für das Packaging des Virengensoms, der negativen Regulation der Wirtszellenabwehr und der sequenzspezifischen Integration sind. Sofern keine Co-Infektion mit einem Helfervirus erfolgt, haben AAV die besondere Fähigkeit bei der Infektion eines menschlichen Wirts in eine latente Infektion überzugehen. Sie integrieren dabei ihr Genom in einen spezifischen Locus im humanen Chromosom 19 und warten dort auf die Co-Infektion von Adenoviren oder Herpesviren (Daya and Berns, 2008; Gonçalves, 2005; Vannucci et al., 2013).

Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1965 wurden 13 verschiedene AAV Serotypen entdeckt und charakterisiert (Tabelle 3). Die ersten neun Serotypen wurden teilweise zufällig als Verunreinigungen in Adenovirus oder Herpesvirus Proben gefunden, oder neben jenen Viren aus Human- oder Primatengewebe isoliert.

Tabelle 3: AAV Serotypen

AAV Serotyp Entdeckung	Gewebespezifität	Rezeptoraffinität für Ligand	Veröffentlichung zur Bindungsaffinität
AAV1 Atchison, et al. 1965	Skelettmuskeln, Augen, Nieren	ZNS, $\alpha 2.3$ - und $\alpha 2.6$ - N-gebundene Sialinsäure Co-Rezeptoren: $\alpha_5\beta_1$ Integrin	Zhijian Wu, et al. 2006; Asokan, et al. 2006
AAV2 Hoggan, et al. 1966	Leber Milz, Muskeln, Lunge, Augen, ZNS, Nieren	HSPG Co-Rezeptoren: $\alpha_v\beta_5$ Integrin, FGFR1, c-Met (HGFR), LamR, $\alpha_5\beta_1$ Integrin	Summerford, et al. 1998, 1999; Qing, et al. 1999; Kashiwakura, et al. 2005; Akache, et al. 2006; Asokan, et al. 2006
AAV3 Hoggan, et al. 1966	Augen	HSPG Co-Rezeptoren: LamR, $\alpha_5\beta_1$ Integrin, FGFR1, c-Met (HGFR)	Handa, et al. 2000; Akache, et al. 2006; Asokan, et al. 2006; Blackburn, et al. 2006; Ling, et al. 2010

AAV4 Melnick, et al. 1965	ZNS, (Photorezeptorzellen, Pigmentepithel)	Auge	α 2.3- O-gebundene Sialinsäure	Kaludov, et al. 2001
AAV5 Bantel-Schaal, et al. 1984	Menschliches Atemwegsepithel (luminal), ZNS, Auge (Photorezeptorzellen), Nieren		α 2.3- N-gebundene Sialinsäure Co-Rezeptor: PDGFR- α & - β	Walters, et al. 2001; Di Pasquale, et al. 2003
AAV6 Rutledge, et al. 1998	Skelettmuskeln, Leber, Lungenepithel		α 2.3- und α 2.6- N-gebundene Sialin- säure; HSPG Co-Rezeptoren: $\alpha_5\beta_1$ Integrin, EGFR	Zhijian Wu, et al. 2006; Asokan, et al. 2006; Weller, et al. 2010
AAV7 Gao, et al. 2002	Skelettmuskeln, Leber		<i>Primärer Rezeptor nicht bekannt</i> Co-Rezeptoren: $\alpha_5\beta_1$ Integrin	(Asokan et al., 2006)
AAV8 Gao, et al. 2002	Leber, Skelettmuskeln, Herzmuskelzellen, Bauchspeicheldrüse		<i>Primärer Rezeptor nicht bekannt</i> Co-Rezeptoren: FGFR1, LamR, $\alpha_5\beta_1$ Integrin	Akache, et al. 2006; Asokan, et al. 2006
AAV9 Gao, et al. 2004	Leber, Skelettmuskeln, Lunge, ZNS, Herz,		terminale N-gebundene Galaktose Co-Rezeptoren: FGFR1, LamR, $\alpha_5\beta_1$ Integrin	Shen, et al. 2011; Akache, et al. 2006; Asokan, et al. 2006
AAV10 Mori, et al. 2004	Leber, Herz, Lunge, Skelettmuskel, Uterus	Niere,	<i>Primärer Rezeptor nicht bekannt</i> Co-Rezeptoren: $\alpha_5\beta_1$ Integrin	(Asokan et al., 2006)
AAV11 Mori, et al. 2004	Skelettmuskel, Niere, Milz, Lunge, Herz, Bauch		<i>Primärer Rezeptor nicht bekannt</i>	-
AAV12 Schmidt, Voutetakis, et al. 2008	Speicheldrüse, Skelettmuskel, Nasenepithel	Leber,	membranständige Oberflächenproteine	Schmidt, Voutetakis, et al. 2008
AAV13 Schmidt, Govindasamy, et al. 2008	<i>Noch nachgewiesen</i>	<i>nicht</i>	HSPG	Schmidt, Govindasamy, et al. 2008

Auf der Suche nach weiteren AAV Serotypen nutzte eine Forschungsgruppe ein PCR basiertes Testverfahren, um die Virusproben der *American Type Culture Collection* (ATCC) nach AAV-DNA zu durchsuchen (Schmidt et al., 2006). Die ATCC ist eine nonprofit Organisation, die von Mikroorganismen und Zelllinien Proben sammelt, verwaltet und zu Forschungszwecken zur Verfügung stellt. Mit Hilfe dieses PCR basierten Testverfahrens wurden die Serotypen AAV10 - 13, sowie weitere 100 AAV Varianten gefunden, die noch nicht weiter analysiert wurden (Gao et al., 2004; Schmidt et al., 2006, 2008a). Um einen neuen Serotyp zu klassifizieren, sollte dieser nicht mit dem neutralisierenden Serum eines anderen Serotyps kreuzreagieren (Wu et al., 2006b), da er ansonsten eine zu ähnliche Struktur und somit Bindungsaffinität aufweisen würde. Diese Definition trifft jedoch nicht auf AAV6 zu, da dessen Serologie fast identisch zu der von AAV1 ist (Gao et al., 2002).

Im Jahr 1996 stellte sich heraus, dass der seit 30 Jahren verwendete AAV2 Virus bzw. Virusvektor megakaryotische Leukämiezellen nicht zu infizieren vermochte (Ponnazhagan et al., 1996). Die bis dahin gültige Hypothese, dass AAV sämtliche humane Zelllinien unterschiedlicher Zelltypen transduzieren könne wurde dadurch negiert und es stellte sich die Frage ob AAV Transduktionen durch Rezeptorbindungen vermittelt werden (Ponnazhagan et al., 1996). In Tabelle 3 sind wissenschaftliche Arbeiten aufgelistet, in denen die Bindungsaffinitäten der einzelnen AAVs zu unterschiedlichen Rezeptoren untersucht wurden. Der sich aus den Rezeptoraffinitäten ergebende Gewebetropismus wurde bereits für alle AAVs bis auf den Serotyp 13 *in vitro* bzw. *in vivo* nachgewiesen (Tabelle 3). Die Viruskapsid-Oberflächenstrukturen bilden die Bindungsstellen für die membranständigen Rezeptoren von Zielzellen, wie erstmals 1998 für AAV2 mit Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) gezeigt wurde (Summerford and Samulski, 1998). Es stellte sich heraus, dass die anderen AAVs ebenso Glykane zur Identifikation ihrer Zielzellen nutzen. HSPG wird neben AAV2 auch von AAV3, AAV6 und AAV13 als Rezeptor erkannt (Mietzsch et al., 2014). AAV6 bindet zusätzlich wie auch AAV1 an α 2.3- und α 2.6- N-gebundene Sialinsäure (Wu et al., 2006a). AAV4 und AAV5 binden beide an α 2.3-gebundene Sialinsäure, wobei AAV4 die O-gebundene (Kaludov et al., 2001) und AAV5 die N-gebundene Sialinsäure (Walters et al., 2001) benötigt. AAV9 bindet an die terminale N-gebundene Galaktose als primäre Bindestelle (Shen et al., 2011). Bei AAV12 wurde beobachtet, dass sich der Virus anhand gewisser membranständiger Oberflächenproteinen orientiert, welche noch nicht genauer definiert wurden (Schmidt et al., 2008a). Neben den primären Bindestellen nutzen Adeno-assoziierte Viren zur Identifikation ihrer Zielzellen und zur Endozytose ihrer viralen DNA noch weitere sogenannte Co-Rezeptoren. Im Jahr 1999 wurde α v β 5-Integrin als erster Co-Rezeptor beim AAV2 entdeckt (Summerford et al., 1999). Als zweites wurde der Fibroblasten-Wachstumsfaktorrezeptor (FGFR1) für die Serotypen AAV2 und AAV3 identifiziert (Qing et al., 1999). Ebenso dient der Hepatozyten Wachstumsfaktorrezeptor c-Met diesen beiden Serotypen als Co-Rezeptor (Kashiwakura et al., 2005). Für die Serotypen AAV2, AAV3 und AAV8, AAV9 zeigte sich der Lamininrezeptor LamR als weiterer Zellindikator (Akache et al., 2006). Das α 5 β 1-Integrin unterstützt die Serotypen AAV1 - AAV3 und AAV6 - AAV10 (Asokan et al., 2006) bei der Infektion der Zielzelle. Die Rezeptoren *platelet derived growth factor receptor* - α und - β (PDGFR- α und - β) dienen dem AAV5 bei der Transduktion seiner Zielzellen (Di Pasquale et al., 2003). Und AAV6 wird zusätzlich vom Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) geleitet (Weller et al., 2010). Die bisherigen Arbeiten im Bereich des Tropismus der AAV zeigten einige Punkte der Zellerkennung, der anschließenden Endozytose und Transport zum Nucleus auf, jedoch sind die genauen Vorgänge noch ungeklärt. Im Jahr 2016 fanden Forschende ein weiteres Puzzlestück, ein bisher nicht charakterisiertes Transmembranprotein des Typs 1, welches sie *AAV receptor* (AAVR) nannten. Durch AAVR -Knock-Out und -Rescue Versuche wurden in dieser Studie zunächst anhand von AAV2, anschließend auch durch Analysen mit AAV1, 3, 4, 5, 6, 8 und 9 gezeigt, dass AAVR unabdingbar

für die Transduktion vieler, wenn nicht sogar aller AAVs ist. Pillay et al. postulieren, dass er als direkter Rezeptor fungiert und an der Endozytose und am Transport zum Golgi-Apparat mitwirkt (Pillay et al., 2016, 2017).

Das Potential der Adeno-assoziierten Viren als Vektoren für den Gentransfer für medizinische Therapien beim Menschen wurde bereits Ende der 1980iger Jahre erkannt. Der einfache genetische Aufbau der AAVs aus zwei Genen, *Rep* und *Cap*, sowie den flankierenden ITR Sequenzen ermöglichte es die infektiösen Gensequenzen (96 % des Genoms) durch gewünschte Gene auszutauschen (Samulski et al., 1987, 1989). Dabei wurden die ersten Protokolle zum Erstellen von AAV-Vektoren entwickelt, die später rekombinante AAV (rAAV) genannt werden (Kessler et al., 1996). Zur Erstellung der Virusvektoren wurden zwei Helferplasmide konstruiert, pAAV/no-tr mit Teilen des AAV2-Genoms und pAAV/Ad mit Bestandteilen des Adenovirus, die zur Replikation benötigt wurden (Samulski et al., 1989). Durch eine gemeinsame Infektion von HeLa-Zellen mit den zusätzlichen Plasmiden, die die zum Transport gewünschten Gene enthielten, fanden Rekombinationen statt, welche in rekombinanten Adeno-assoziierten Virusvektoren (rAAV) ohne infektiöse Gene resultierten. Im Anschluss wurden durch Resistenzselektion und Aufreinigung Virusvektoren gewonnen, welche eine episomale Expression in ihren Zielzellen ermöglichten, ohne dass sie sich selbst replizierten oder in die Wirts-DNA integrierten (Samulski et al., 1989). Auf Grundlage dieser Helferplasmide wurden viele Generationen von rAAV erzeugt, wodurch das Genom von AAV2 das am besten erforschte aller AAVs wurde.

Im Jahr 1999 fand erstmals eine sogenannte Transkapsidierung statt, welche die bekannten Eigenschaften des AAV2 Vektors mit dem Kapsid von AAV1 kombinierte (Wu et al., 2006b; Xiao et al., 1999). Dabei blieb die effiziente und stabile episomale Expression der AAV2 transduzierten Gene erhalten und wurde mit dem Tropismus des AAV1 und dessen humoralen Immunantwort kombiniert. In der Nomenklatur wird der Bezeichnung AAV das Präfix „r“ zur Kennzeichnung des rekombinanten Virusvektors vorangestellt. In der Serotyp-Bezifferung wird an erster Stelle der Serotyp genannt, dessen Gene die Expression steuern und an zweiter Stelle, wessen Kapsidproteine verwendet werden. Der rekombinante Virusvektor rAAV2/1 rief bei Untersuchungen an Mäusen nach einer Erstinfektion NABs (*neutralizing antibodies*) hervor, die lediglich eine weitere rAAV2/1 Infektion verhinderten, jedoch eine erfolgreiche Genexpression nach einer Zweitinfektion durch rAAV2/2 nicht unterbanden. Der Umkehrschluss traf nicht zu. Eine Erstinjektion durch rAAV2/2 erzeugte neutralisierende Antikörper (NABs), die eine weitere Injektion von rAAV2/2 und aufgrund von Kreuzreaktionen auch rAAV2/1 verhinderten (Xiao et al., 1999). Mit den Entdeckungen weiterer Serotypen des Adeno-assoziierten Virus und deren unterschiedlicher Tropismen (Tabelle 3) wurden auch deren Nutzung als Vektoren erforscht. Dafür wurde weiterhin AAV2 als Grundgerüst für den Gentransfer verwendet. Die Virushülle setzte sich aus den jeweiligen Kapsidproteinen der anderen AAV Serotypen zusammen (Mori

et al., 2004; Rabinowitz et al., 2002; Schmidt et al., 2008a, 2008b; Zincarelli et al., 2008). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das Präfix „r“ nicht genutzt, da dies auch in der heutigen Fachliteratur kaum Verwendung findet.

Mit der wachsenden Zahl an gentherapeutischen Einsatzgebieten und zunehmenden Ansprüchen entwickelten sich weitere Rekombinationsvariationen, um die Gewebe- bzw. Organspezifität der AAV-Vektoren zu präzisieren. Durch gleichzeitige Modifikation der Bindungsaffinitäten wurde die Effizienz der Aufreinigung verbessert, um höhere Vektortiter zu generieren (Wu et al., 2006b). Mit Hilfe von 3D-Modellen der verschiedenen AAV-Vektoren und dem stetig wachsenden Wissen über deren unterschiedlichen Bindungsstellen, tauschten Forschende gezielte einzelne genetische Sequenzen aus und kreierten dadurch Chimären (Asokan et al., 2010; Kern et al., 2003; Madigan and Asokan, 2016), deren Spezifität durch neue Bindungsstellenkombinationen noch präziser für die gewünschten Zielorgane waren. Ein Beispiel hierfür ist die Chimäre AAV2i8, bei der die Biodistribution für Kardiomyozyten und Skelettmuskelzellen weiterhin dem vom Serotyp AAV8 ähnelt, deren Affinität für Leberzellen hingegen reduziert ist. Dadurch wird der Abbau der direkt an Leberzellen gebundenen AAVs aus, was bei gleichbleibender Menge von injizierten Virusvektoren zur Stärkung der gewünschten Transduktion der Muskelzellen führte (Asokan et al., 2010).

In Zusammenhang mit den unterschiedlichen Rezeptoren und Bindeaffinitäten (Tabelle 3) wird deutlich, dass die bisher bekannten Serotypen jeweils eine gewisse Bandbreite von unterschiedlichen Geweben und Organen transduzieren, wenn auch in unterschiedlicher Intensität (Rapti et al., 2012). Für medizinische Anwendungen ist es oftmals vorzuziehen einen bestimmten Gewebetyp transduzieren zu können. Wie bereits die Vergleichsstudie zur unterschiedlichen Transduktionseffizienz von AAV8 und AAV9 deutlich zeigte (Inagaki et al., 2006), können neu gefundene AAV eine differenziertere und somit verbesserte Transduktion in bestimmten Geweben bzw. Organen, wie Skelettmuskelzellen oder Kardiomyozyten, erzielen als die bereits bekannten Serotypen.

Die unterschiedliche Intensität der AAV-Transduktionen weist auf eine weitere Hürde hin, die sowohl bei der klinischen Anwendung als auch bei vorklinischen Versuchen mit Modelltieren Beachtung benötigt. AAVs sind natürlich vorkommende Viren, die in Geweben von Menschen und Primaten gefunden wurden (siehe Veröffentlichungen der jeweiligen AAVs in Tabelle 3), ohne dass sie jemals als Krankheitserreger identifiziert werden konnten (Berns and Linden, 1995; Friedman-Einat et al., 1997). Nichts desto trotz wurde in Menschen, nicht-humanen Primaten und Modelltieren NABs gegenüber AAV1 und AAV2 nachgewiesen (Louis Jeune et al., 2013; Xiao et al., 1999). Die erste Reihe klinischer Studien in der AAVs zur Behandlung von Herzversagen angewendet wurden war CUPID, *Calcium Up-*

Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (Hajjar et al., 2008; Jaski et al., 2009; Jessup et al., 2011; Zsebo et al., 2014). Das Therapieziel war die Genexpression von *SERCA2a* in Kardiomyozyten durch AVV Transduktion positiv zu beeinflussen. Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, ist das Enzym SERCA die sarkoplasmatische/endoplasmatische Ca^{2+} ATPase, die bei Säugetieren in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) ist und maßgeblich für den Transport von Ca^{2+} in das SR verantwortlich ist. Dieser aktive Transport schafft ein Kalziumionenreservoir in den Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulums, welches durch Ca^{2+} sensitive Ryanodinrezeptoren schlagartig wieder in das Zytoplasma entleert wird und dadurch die Kontraktion der Herzmuskelzelle ermöglicht. Studien bei Herzinsuffizienzpatienten*innen zeigten, dass das Krankheitsbild von einer niedrigen SERCA Konzentration begleitet wird (Meyer et al., 1995; Schmidt et al., 1998). In Präklinischen Versuchsreihen mit Schweinen und Schafen ermöglichte die AAV Transduktion des *SERCA2a* Gens eine erhöhte Expression des Ca^{2+} Transporters. In den behandelten Versuchstieren zeigte sich zudem eine Verbesserung der Herzaktivität, der Ejektionsfraktion und beim enddiastolischen Volumen, wodurch die klinischen Studien eingeleitet wurden (Hajjar et al., 2008). In den Phase 2 Studien zeichnete sich ab, dass sich die Anzahl der *SERCA2a* Proteine bei den *SERCA2a*-behandelten und den Placebo-Patient*innen nicht signifikant unterschieden (Greenberg et al., 2015). Dass der Grund für den Misserfolg der Therapie eine Immunität gegenüber AAVs war, nahmen die Autoren nicht an. Dennoch zeigte sich in der Folgestudie (Greenberg et al., 2016), dass eine hohe Prävalenz von neutralisierenden Antikörpern (NABs) gegen AAV2 bei den Patient*innen vorhanden war, mit einer variierenden Verteilung zwischen verschiedenen Ländern von 42 % in Ohio bis 79 % in Polen und Ungarn. Bereits in einer früheren Arbeit wurde die Prävalenz von NABs gegenüber AAV1, 2, 7 und 8 in 888 Menschen aus 10 Ländern von insgesamt 4 Kontinenten untersucht, da man davon ausging, dass neutralisierende Antikörper (NABs) eine erfolgreiche Expression von transportierten Genen verhindern würde (Calcedo et al., 2009). In beiden Studien zeigte sich, dass gerade die bei Menschen nachgewiesenen AAV Serotypen 1 und dem vorangehend AAV2 eine hohe Prävalenz an Antikörpern hervorrufen, die mit zunehmendem Alter der Bevölkerung ansteigt.

In dieser Arbeit wurden für den Gentransfer von Channelrhodopsin-2 die rekombinanten Vektoren AAV2/1 und AAV2/9 verwendet, die die *Vector Core Facility* der *University of Pennsylvania* herstellt und zum Kauf anbietet (Kapitel 3.5, Vogt, et al. 2015, Bruegmann, et al. 2016, 2018). Beide AAV-Vektoren bewiesen sich bereits in früheren Arbeiten als potente myokardiale Vektoren bei murinen Tiermodellen, die entweder lokal am Apex des Herzens ins Myokard oder systemisch über eine Vene in die Blutbahn injiziert wurden (Pacak et al., 2006; Palomeque et al., 2007). Palomeque et al. verglich die Transduktionseffizienz der AAV Serotypen 1 – 8 durch lokale Injektionen ins Myokard, am Apex von Rattenherzen. Innerhalb des 24 Wochen langen Messzeitraums zeigte sich, dass sowohl die Anzahl der

LacZ Genkopien als auch die β -Galactosidase Aktivität durch die AAV8 Transduktion mit Abstand am höchsten war und über den gesamten Zeitraum kontinuierlich anstieg (Palomeque et al., 2007). Pacak et al. verglich hingegen die Transduktionseffizienz der Serotypen AAV1, 8 und 9 nach systemischer Injektion über die Jugularvene bei Mäusen und zeigte, dass AAV9 eine höhere Expression des Testgens *LacZ* in den Kardiomyozyten der Mäuse ermöglichte als AAV8, geschweige denn AAV1 (Pacak et al., 2006).

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, dass Membranprotein Channelrhodopsin-2 (ChR2) (Nagel et al., 2003) durch Adeno-assoziierte Virusvektoren *in vivo* in nativen Kardiomyozyten der CD-1 WT Maus zu exprimieren, um das Herz optisch zu stimulieren.

Channelrhodopsin-2 wurde bereits als lichtaktivierter Kationenkanal in der Membran von transgenen Kardiomyozyten *in vitro* und in einer transgenen Mauslinie *in vivo* untersucht (Bruegmann et al., 2010). Durch optische Stimulation mit einer Wellenlänge von $\lambda = 470$ nm öffnet sich ChR2 und ist für Kationen permeabel (Arrenberg et al., 2010). Die dadurch ausgelöste Depolarisation der Kardiomyozyten kann ein Aktionspotential auslösen, wodurch eine Kontraktion initiiert wird (Arrenberg et al., 2010; Bruegmann et al., 2010). Somit kann ein Lichtstimulus zu einer Kontraktion des Herzens führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht ob Adeno-assoziierte Virusvektoren den Gentransfer von Channelrhodopsin-2 in native Kardiomyozyten *in vivo* ermöglichen. Dafür wurden zwei Injektionswege, die lokale und systemische Injektion verglichen. Bei erfolgreicher Expression von Channelrhodopsin-2 in Kardiomyozyten sollte die minimale Lichtintensität ermittelt werden, mit der die optische Stimulation ventrikuläre Kontraktionen auslösten. Die Stimulation des Herzens erfolgte *in vitro* im Langendorff-Apparat und *in vivo* an der anästhesierten Maus. Nach der Dissoziation von transgenen Herzen wurden Patch-Clamp Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten durchgeführt. Hierbei sollte die optisch stimulierte Öffnung des Kationenkanals und der Verlauf der Ionenströme nachgewiesen werden.

Zur Überprüfung der Expressionsstärke von Channelrhodopsin-2 diente der an ChR2 fusionierte Fluoreszenzmarker mCherry. Makroskopische Untersuchungen sollten die Expression des Fusionsproteins nachweisen. Anhand von Gewebeschnitten wurden histologische und mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei sollte die Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle bestimmt, sowie die membranständige Position entlang der Zellgrenzen und der T-Tubuli bestätigt werden.

Weiterhin sollte die Expression von ChR2 *in vivo* im Herzen über einen längeren Zeitraum untersucht werden. Wie lange hält die ChR2 Expression an und ist das Herz so lange optisch zu Extrasystolen stimulierbar?

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, ob die optische Stimulation das Potential hat, eine Alternative zur konventionellen elektrischen Stimulation des Herzens zu sein, die der Goldstandard in der Therapie bei bradykarden Herzrhythmusstörungen ist.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Mettler Toledo, (Gießen, Deutschland)
Animal Bio Amp ML 136	ADInstruments, Ltd. (Oxford, Großbritannien)
Beatmungsgerät MiniVent Type 845	Hugo Sache Elektronik, Harvard Apparatus (March, Deutschland)
CCD Kamera Basler piA640-210gm	Basler AG, (Ahrensburg, Deutschland)
Cryostat CM3050 S	Leica Biosystems GmbH (Nußloch, Deutschland)
EMCCD Kamera iXon 885+	Andor Technology (Belfast, Großbritannien)
EPC10 amplifier	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH (Lambrecht (Pfalz), Deutschland)
Fluoreszenzlampe X-Cite 120 PC,	Lumen Dynamics (Mississauga, Kanada)
Gefrierschränke (-20 °C, -80 °C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Glasperlensterilisator Ster250	Simon Keller (Burgdorf, Schweiz)
Hamilton Spritze 10µl	Hamilton Messtechnik GmbH (Höchst, Deutschland)
Heizplatte für Mäuse	Eigene Herstellung
Heizplatte mit Magnetrührfunktion	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Heracell 240i CO2 Inkubator	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Laboklav 55-195	SHP Steriltechnik AG (Detzel, Deutschland)
LED (LEDC5 470 nm, mit Steuerungsmodul LEDD1) für Makroskop Olympus MVX10	Thorlabs (Newton, USA)
LED (LEDMOD LAB 470 nm / 300 mW) für Mikroskop Axiovert 200M	Omicron Laserage, Laserprodukte GmbH (Rodgau-Dudenhofen, Deutschland)
LED-Lichtquelle für Stereolupe Leica LED3000SLI	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Magnetrührer MR 3001 / MR 2002	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach, Deutschland)
Magnetspitze (1 mm), Magnetständer	eigene Herstellung
Makroskop AxioZoom.V16	Carl Zeiss, (Jena, Deutschland)
Makroskop Olympus MVX10	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
Makroskop Leica M651	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 200M mit Apotome.1	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskop Observer Z1 mit Apotome.2	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mikroskopkamera ProgRes C10+	Jenoptik (Jena, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik (Friedrichsdorf, Deutschland)
Peristaltische Pumpe Minipuls 3	Gilson, Inc. (Middleton, USA)
pH-Meter 765	Knick (Berlin, Deutschland)

Material und Methoden

Pipettierhilfe	Eppendorf (Hamburg, Deutschland) Gilson, Inc. (Middleton, USA)
Polychrome V Monochromator	TILL Photonics GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
PowerLab 8/30 Datenerfassungssystem	ADInstruments, Ltd. (Oxford, Großbritannien)
Powermeter PM100 mit S130A Sensor	Thorlabs, (München, Deutschland)
Präparationsbesteck für OPs	F.S.T. (Heidelberg, Deutschland) Plano (Wetzlar, Deutschland) World Precision Instruments (Inc. Sarasota, USA)
Reinluftwerkbank HERAguard HPH4	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Sterilbank HERAsafe	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Stereolupe M8	Wild Heerbrugg (Heerbrugg, Schweiz)
Stickstofftank LABS-20K	Taylor Wharton Germany GmbH (Mildstedt, Deutschland)
TC02 2-channel temperature controller	Multi Channel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Deutschland)
Ultraschallbad	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Vakuumpumpe mit Filter, BVC professional	Vacuubrand GmbH (Wertheim, Deutschland)
Vapor für Isofluran	Drägerwerk AG (Lübeck, Deutschland)
Wasserbad Typ WB 10	P-D Industriegesellschaft mbH (Dresden, Deutschland)
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich (Stuttgart, Deutschland)

Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
BD Microlance 3, Aufziehkanüle 18 G 1/2"	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Deckgläser 12x12 mm	Menzel Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Deckgläser 24x50 mm	Marienfeld, (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Einfrierröhrchen Cryo Tube Vial 1.8 ml	Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Einmalrasierer	Roeser Medical GmbH (Bochum, Deutschland)
Entsorgungsbeutel	Brand (Wertheim, Deutschland)
Einwegspritzen (steril) 10 ml	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Färbeküvetten	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Fettstift ImmEdge PEN	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Insulinspritze U-40 Insulin 1ml	BD Plastipak (Heidelberg, Deutschland)
Leukofix 2.5 cm x 9.2 m	BSN medical GmbH (Hamburg, Deutschland)
Nahtmaterial Prolene C-1 13 mm, 3/8c	Ethicon, Johnson-Johnson (Norderstedt, Deutschland)
Nanopass® 29G, 33G, Ø 200 µm	Terumo Deutschland GmbH Eschborn, Deutschland)
Objektträger Histobond 76x26 mm	Marienfeld, (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Parafilm	Brand (Wertheim, Deutschland)
Pasteurpipetten, Glass, 150 mm	Brand (Wertheim, Deutschland)

Plastikware für die Molekularbiologie, Zellkultur und Histologie	Falcon (Gräfeling-Lochnam, Deutschland), Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland) Eppendorf (Hamburg, Deutschland) Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) Qiagen (Hilden, Deutschland) Axygen (Corning, USA)
Polyurethanschlauch (0,28 mm ID, 0,61 mm OD)	
Sterilfilter: 0,2 µm	Whatman GmbH (Maidstone, Großbritannien)

3.2 Chemikalien und Medien

Tabelle 6 Chemikalien und Medien für Elektrophysiologie, Zellkultur, sowie Isolation primärer Zellen

Bezeichnung	Hersteller
2,3-Butandionmonoxim	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
DPBS (1x) Lösung	Gibco Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
EGTA	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Fibronektin (0,1 %)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Fötale Kälberserum (FKS) FCS-500	PromoCell, Heidelberg
Gelatine	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Heparin	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)
Hepes (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Kollagenase B	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Mitomycin C	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Natriumpyruvat	Invitrogen Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Nicht essentielle Aminosäuren, MEM	Gibco Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Nifedipin	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Gibco Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
Taurin	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Trypsin / EDTA 0,05 % (w/v)	Invitrogen Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)

Tabelle 7 Chemikalien und Medien für die lokale und systemische Injektion

Bezeichnung	Hersteller
Anästhetikum, Isofluran	Abbvie GmbH (Ludwigshafen, Deutschland)
Antibiotikum, Cefuroxim	Hikma Pharma GmbH (Gräfelfing, Deutschland)
Ethanol (EtOH)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Isotone Kochsatz-Lösung (NaCl)	Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Schmerzmittel, Novaminsulfon	Ratiopharm GmbH (Ulm, Deutschland)

Tabelle 8 Chemikalien und Medien für die Histologie

Bezeichnung	Hersteller
Eindeckmedium, Entellan	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Eindeckmedium, FLUKA	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Einfriermedium, Tissue-Tek	Sakura Finetek Europe B.V. (Alphen aan den Rijn, Niederlande)
Eosin G Lösung	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eserserum	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, Großbritannien)
Hämalaunlösung	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Hoechst 33342	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Isopropanol	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Paraformaldehyd ($[\text{CH}_2\text{O}]_{8-100}$)	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Direct Red 80	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
PBS Tablette	Gibco Life Technologies (Carlsbad, USA)
Triton-X 100	Sigma Aldrich (Seelze, Deutschland)
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

3.3 Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Tabelle 9 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung (PBS)	Hersteller
α -Actinin	Maus IgG1	1:400	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
CD45	Maus IgG	1:400	Millipore, Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Vimentin	Huhn, polyklonale IgY	1:1000	Millipore, Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Tabelle 10 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Fluorochrom	Isotyp	Verdünnung (0,1 % Hoechst-Lsg.)	Hersteller
Maus IgG	Cy2	Esel	1:100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Maus IgG1	Cy5	Esel	1:400	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Huhn IgY	Cy5	Esel	1:200	Jackson ImmunoResearch (Suffolk, Großbritannien)

3.4 Lösungen, Puffer und Medien

Tabelle 11 Allgemeine Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
DPBS (1x)	Ohne Kalzium, Magnesium und Phenolrot	Gibco Life Technologies (Carlsbad, USA)
EtOH 70 % (V/V)	EtOH 70 % vergällt mit 1 % MEK	Otto Fischer GmbH & Co. KG (Saarbrücken, Deutschland)

Tabelle 12 Lösungen für die Elektrophysiologie

Bezeichnung	Zusammensetzung
Externe Perfusionslösung (Tyrode Lösung)	142 mM Natriumchlorid
	10 mM Glukose
	10 mM HEPES
	5.4 mM Kaliumchlorid
	2 mM Magnesiumchlorid
	1.8 mM Kalziumchlorid
	pH 7,4 Natriumhydroxid
Kardioplegie Lösung	222.5 mM Natriumchlorid
	50 mM Kaliumchlorid
	29.7 mM 2,3-Butandionmonoxim
	11.9 mM Natriumhydrogencarbonat
	11.1 mM Glukose
	10 mM EGTA
	0.6 nM Nifedipin
	20 U Heparin
pH 7,2 – 7,5 Natriumhydroxid	

Tabelle 13 Lösung für die direkte und systemische Injektion von AAV

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anästhetikum & Schmerzmittel	14 mM Cefuroxim
	18 mM Novaminsulfon
	0,9 % Natriumchlorid Lösung

Tabelle 14 Lösungen für die Histologie

Bezeichnung	Zusammensetzung	
0.1 % Hoechst Lösung	1 ml	Hoechst 33342
	999 ml	PBS
0.2 % TritonX-100 Lösung	2 ml	Triton X-100
	999 ml	PBS

Tabelle 15 Lösungen und Medien für die Dissoziation embryonaler Herzen und Zellkultur embryonaler Kardiomyozyten

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Kollagenase B	10 mg ml ⁻¹	Kollagenase B
	10 mM	Kalziumchlorid in Niedrig-Kalzium-Lösung
Niedrig-Kalzium-Lösung	120 mM	Natriumchlorid
	5.4 mM	Kaliumchlorid
	5 mM	Magnesiumsulfat
	5 mM	Natriumpyruvat
	20 mM	Taurin
	10 mM	Hepes
	20 mM	Glucose
	pH 6,9	Natriumhydroxid
20 % IMDM (Differenzierungsmedium)	20 % v/v	FKS
	100 U ml ⁻¹	Penicillin
	100 mg ml ⁻¹	Streptomycin
	0,1 mM	MEM
	0,1 mM	β-Mercaptoethanol

3.5 Der Adeno-assoziierte Virusvektor

In dieser Arbeit wurden zwei Adeno-assoziierte Virusvektoren (AAV-Vektoren) verwendet (AAV2/1 und AAV2/9). Sie transportieren das Gen Channelrhodopsin-2 mit der H134R Mutation in Fusion mit dem Markergen mCherry. Als Promotor dient der CAG Promotor (Hitoshi et al., 1991). Die Virusvektoren zur Transduktion von eukaryotischen Zellen wurden von Zhang et al. entwickelt (Zhang et al., 2007). Die AAV-Vektoren für die vorliegende Arbeit erwarben wir von der *Vector Core Facility* der *University of Pennsylvania* hergestellt (Lock et al., 2010). Die *Vector Core Facility* stellte lediglich die Genkarten der Vorgängerplasmide zur Verfügung, deren Skizzen in Abbildung 8 dargestellt sind. Die Originalvektorkarten sind unter den Nummern #112862, #112865 und #20938 in der Addgene Datenbank einzusehen. Die Plasmide pAAV2/1 und pAAV2/9 (Abbildung 8A) verfügen neben dem Replikationsursprung (ORI, *origin of replication*) ein Ampicillin Resistenzgen, wodurch Bakterien nach Transformation mit diesem Plasmid selektioniert werden können. Beide Plasmide enthalten *rep* AAV2 Gene, die für die Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle spielen (Berns, 1990). Ihrer

Bezeichnung entsprechend enthalten die Plasmide entweder die *cap* Gene vom Serotyp AAV1 oder AAV9, welche den Gewebetropismus definieren (Tabelle 3).

Der AAV2/1-CAG-ChR2(H134R)-mCherry Vektor wurde für die intramyokardiale Injektion verwendet. Für die systemische Injektion über die *Vena jugularis* wurde der AAV2/9-CAG-ChR2(H134R)-mCherry Vektor eingesetzt.

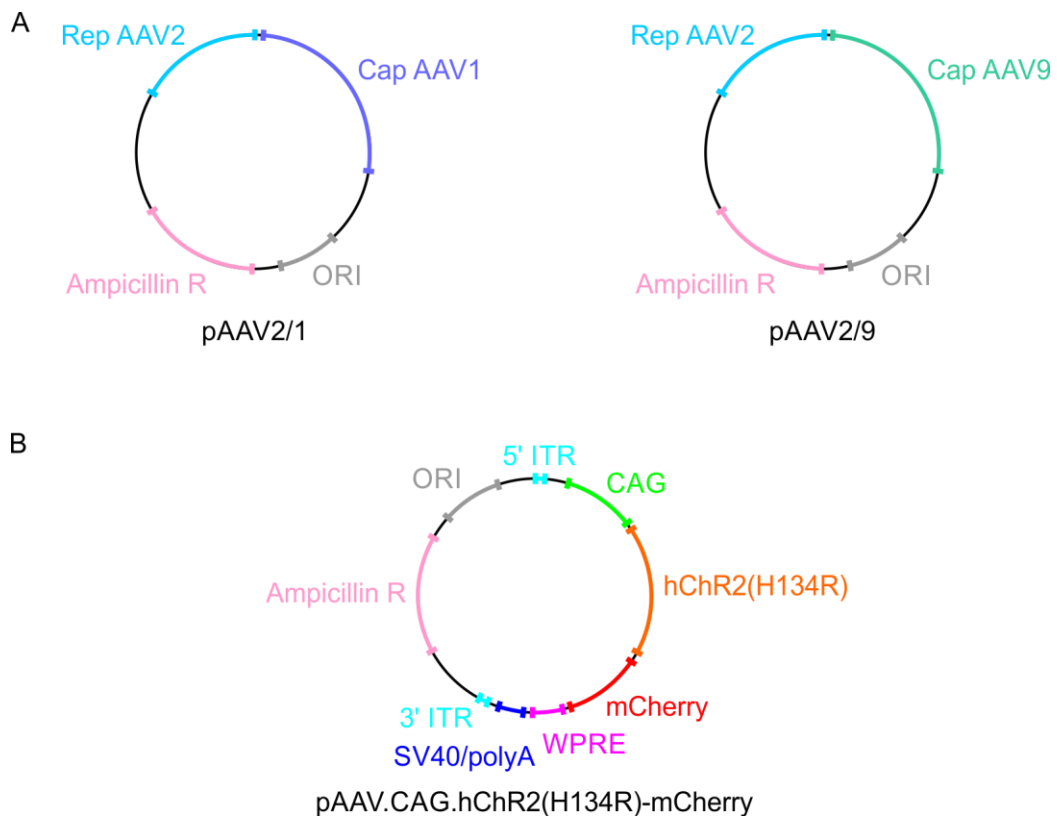


Abbildung 8: AAV Plasmide 2/1, 2/9 und hChR2-mCherry

(A) Skizzen von pAAV2/1 Plasmid (links, 7409 bp, Addgene #112862) und pAAV2/9 Plasmid (rechts, 7330 bp, Addgene #112865). (B) Skizze von pAAV.CAG.hChR2(H134R)-mCherry (6531 bp, Addgene #20938)

3.5.1 Risikobewertung von Adeno-assoziierten Viren und AAV-abgeleiteten Virusvektoren

Zur Risikobewertung der AAV und den AAV-abgeleiteten Virusvektoren veröffentlichte die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit im Auftrag des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit im Jahr 2005 eine Stellungnahme (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2005). Darin wurden die humanen AAV Serotypen 2, 3 und 5 in die Risikogruppe 1 eingestuft. Dagegen wurden die aus Affen isolierten Serotypen 1, 4 und 6 in die Risikogruppe 2 eingestuft.

Die AAV-abgeleiteten Virusvektoren und die pseudotypisierten AAV-Vektoren, die vom original AAV Genom nur die ITR und keine AAV Nukleinsäuresequenzen mit Gefährdungspotential enthalten, werden in die Risikogruppe 1 eingestuft. Dies ist unabhängig von welchem AAV die verwendeten ITR stammen. Sie sind replikationsdefekt, werden nicht in die Keimbahn übertragen und die Vektorsequenz ist nach 48 Stunden nicht mehr in Blut und Urin nachweisbar. Dadurch ist die Verbreitung von infektiösen AAV-Vektorpartikeln eingeschränkt (Kay et al., 2000). Entsprechend werden gentechnische Arbeiten mit Organismen, die durch AAV-abgeleitete Vektoren (rekombinante Adeno-assoziierte Virusvektoren, rAAV) gentechnisch verändert wurden, der Sicherheitsstufe 1 zugeordnet (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2005).

3.6 Mausmodell

Für diese Arbeit wurden 10 Wochen alte, weibliche Mäuse des Auszuchtstamms CD-1 Wildtyp (CD-1 WT) von Charles River Laboratories International verwendet. Die Tiere wurden in gemieteten Tierställen, im „Haus für experimentelle Therapie“ der Uniklinik Bonn, in steriler Umgebung untergebracht und gepflegt. Die Tierhaltung und die Tierversuche erfolgten streng unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen, gemäß den Richtlinien, die in der für diese Versuche genehmigter Tierversuchsanzeige mit der Nummer 84-02.04.2011.A292 festgelegt wurden.

3.7 Verwendete Programme

Tabelle 16 Verwendete Programme

Bezeichnung	Hersteller
AxioVision Release 4.7, 4.8	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
ZEN 2011, ZEN 2012, Zen 2	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Capture Pro Image Acquisition Software	JenOptik AG (Jena, Deutschland)
LabChart 7	ADInstruments, Ltd. (Oxford, Großbritannien)
Origin Pro 8	Origin Lab Corporation (Northampton, USA)
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
CorelDraw Graphics Suite X5, X6	Corel Corporation (München, Deutschland)
ImageJ	Wayne Rasband, Nation Institutes of Health (Bethesda, USA)
WCIF ImageJ	Wright Cell Imaging Facility (Toronto, Canada)
MC-Rack	Multi Channel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Deutschland)
Microsoft Office 2010, 2013, 365	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
4D Tierbase v12, v14	4D SAS (Eching, Deutschland)

3.8 Tierexperimente und operative Techniken

3.8.1 Lokale AAV-Injektion in das Myokard am Apex des Herzens

Für die lokale Injektion der AAVs in das Myokard wurde zunächst die Narkose für die Maus vorbereitet. Zur Einleitung der Inhalationsnarkose wurde mit einem Verdampfer für Anästhesiegase (Isofluran-Vapor) ein Gasgemisch bestehend aus 0,6 l/min Sauerstoff (O_2), 0,4 l/min Lachgas (N_2O) und 4 Vol.-% Isofluran ($C_3H_2ClF_5O$), in der sogenannten Einleitungsbox vorgelegt. Die Maus verblieb in dieser Box bis die Narkose tief genug war, um sie endotracheal zu intubieren. Hierfür wurde eine weiche 27 G Venenverweilkanüle verwendet, die an ein Beatmungsgerät (Typ Minivent) angeschlossen war und Narkosegas vom Isofluran-Vapor bezog. Die Beatmungsfrequenz wurde auf 150 – 180 Züge pro Minute bei einem Atemzugvolumen von 200 – 300 μ l eingestellt und die Isoflurankonzentration auf 1,0 – 2,0 Vol.-% reduziert. Die Maus wurden zur Operation in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert und der Brustkorb mit 70 % Ethanol zur Desinfektion abgetupft. Der Thorax wurde mit einem Einmalrasierers enthaart und erneut desinfiziert. Unter einem Stereomakroskop (Leica) wurde die anterolaterale Thorakotomie durch einen 1,5 cm langen Hautschnitt am Übergang vom mittleren bis zum distalen Thoraxdrittel eingeleitet und beide darunterliegenden Brustmuskelschichten mit einer Schere durchtrennt. Nach Eröffnung des Thorax wurde die N_2O Begasung gestoppt. Ohne die *Arteria thoracica interna* zu verletzen, wurde die linke Thoraxhöhle im drittletzten Interkostalraum (ICR) eröffnet. Ein kleiner Rippenspreizer wurde zur Sicherung der Öffnung verwendet, womit ein direkter Zugang zum linken Ventrikel geschaffen wurde. Mit einer stumpfen Pinzette wurde nun das Perikard vom Herz abgehoben und längs angeschnitten. Zur präzisen Injektion der Viren wurde eine Hamilton Spritze mit 10 μ l Fassungsvermögen verwendet, die über einen Polyurethanschlauch mit einer 29 G Nadel verbunden war. Die Wanddicke des murinen Herzens beträgt am linken Ventrikel rund 1 mm, womit nur eine begrenzte Volumenaufnahme von 5 μ l für eine intramyokardiale Injektion möglich war. Für das Gesamtvolumen von 10 μ l wurden zwei Injektionen nah beieinander gesetzt und dabei 2×10^9 – 2×10^{11} gc (*genome copies*) der Virusvektoren injiziert. Zunächst wurde das Injektionssystem mit 70 % Ethanol desinfiziert und mit sterilem PBS befüllt. Um eine Verdünnung der Suspension durch das PBS zu verhindern wurde ca. 1 μ l Raumluft in die Hamilton Spritze eingesogen, bevor die Virussuspension aufgenommen wurde. Anschließend wurde das Herz durch Auflage auf einen kleinen, antimagnetischen Löffel (\varnothing : 5 mm) zur Öffnung der Brust hin angehoben, sodass die Herzspitze (*Apex cordis*) gut sichtbar wurde. Die Hamilton Spritze wurde in einem flachen Winkel in die Herzwand am Apex eingeführt und 1 – 2 mm vorgeschoben, um das Myokard zu erreichen. Dort wurden 5 μ l der Virussuspension in das Gewebe injiziert, wobei sich eine sichtbare, kleine Flüssigkeitstasche bildete. Dies wurde ein zweites Mal in direkter Nähe zur ersten Injektionsstelle wiederholt, um das Gesamtvolumen von 10 μ l zu injizieren. Zwischen direkt aufeinander folgenden Mausoperationen

wurde die Injektionsnadel mit 70 % EtOH gespült und in einer mit PBS gefüllten Petrischale aufbewahrt.

Der Thorax wurde anschließend in 3 Schritten geschlossen: Eine Thoraxdrainage (27 G Venenverweilkanüle) wurde eingelegt und die Rippen readaptiert. Die tieferliegenden und oberflächlichen Brustmuskelschichten, sowie die Haut wurden luftdicht durch eine fortlaufende Naht verschlossen. Während der letzten Nahtreihe konnte die Isoflurankonzentration bereits reduziert werden, wodurch die Mäuse mehrere Minuten zur Narkoseausleitung mit reinem Sauerstoff beatmet wurden. Nachdem die Naht vollendet war, wurde ein Sog an die Thoraxdrainage angelegt. Dadurch wurde der physiologische Unterdruck in der Pleurahöhle wiederhergestellt. Während die Maus noch in der Narkoseausleitung lag, erhielt sie eine subkutane Injektion von 100 mg/kg Cefuroxim und 100 mg/kg Metamizol (Novaminsulfon) in Lösung zur antibiotischen und analgetischen Nachsorge. Sobald die Spontanatmung bei der Maus einsetzte, wurde sie extubiert. Zeitgleich wurde die Thoraxdrainage luftdicht entfernt. Die Maus wurde danach in einem Käfig unter einer Wärmelampe 2 Stunden zur Kontrolle beobachtet und abschließend in den Tierstall zurückgebracht.

3.8.2 Systemische Injektion von AAV in die *Vena jugularis*

Bei der systemischen Injektion der AAVs in die *Vena jugularis* wurde wie unter Kapitel 3.8.1 beschrieben zunächst die Narkose für die Maus eingeleitet. Da keine Öffnung des Thoraxes notwendig war, konnte zur Erhaltung der Narkose während der Operation eine kleine Inhalationsmaske verwendet werden. Diese bestand aus einer abgeschnittenen 5 ml Spritze, wovon der Abschnitt mit der konusförmigen Düse verwendet wurde. Die Düse wurde durch einen Polyurethanschlauch an das Beatmungsgerät und den Isofluran-Vapor angeschlossen. Der abgeschnittene Kolben der Spritze diente als Maske und wurde der Maus über Maul und Nase gestülpt, während sie zur Operation in Rückenlage auf einer Wärmeplatte und unter einem Makroskop fixiert lag. Der linke Halsbereich wurde mit einem Einmalrasierer enthaart und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Nach einem cervicalen Hautschnitt wurde die darunterliegende *Vena jugularis* freipräpariert. Für die Injektion wurde eine 33 G Nadel verwendet, die über einen Polyurethanschlauch an eine 1 ml, U-40 Insulinspritze verbunden war. Das Injektionssystem wurde zunächst mit 70 % Ethanol desinfiziert und mit PBS-Lösung nachgespült. Die Spritze wurde anschließend mit der Virussuspension beladen. Zur Injektion wurde die *Vena jugularis* vorsichtig in cranialer Richtung gespannt. Gleichzeitig wurde die Nadel im flachen Winkel in medialer Richtung in die Vene eingeführt und 1 – 2 mm hineingeschoben. Nun wurden 2 x 10^{11} gc AAV2/9, die in einem Gesamtvolumen von 100 μ l in PBS gelöst waren, in die Halsvene injiziert. Dabei bildeten sich durchsichtige Flüssigkeitsbläschen im roten Blutfluss, die damit die sichere Injektion in die Vene bestätigten. Abschließend wurde die Nadel entfernt und gleichzeitig die Öffnung

mit einer feinen Pinzette für 30 – 60 s zugehalten, bis das Verkleben der Gefäßwand oder die Blutgerinnung ein Verbluten verhinderte. Die Operation wurde durch Verschließen des Hautschnitts mit einer durchgehenden Naht beendet. Die Narkoseausleitung sowie die antibiotische und analgetische Nachsorge erfolgten wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben. Sobald die Spontanatmung wieder einsetzte wurde die Maske vom Kopf abgenommen. Die Maus wurde für zwei Stunden in einen Käfig unter einer Wärmelampe beobachtet und abschließend in den Tierstall zurückgebracht.

3.8.3 *In vivo* Analyse zur lichtaktivierten Stimulation des Herzens durch Channelrhodopsin-2 (ChR2)

Nach Injektion der Adeno-assoziierten Virus (AAV) Vektoren wurden die Versuchstiere zu bestimmten Zeitpunkten unter Narkose am offenen Thorax elektrophysiologisch analysiert. Wie in Kapitel 3.8.1 handelte es sich hierbei um einen tiefen operativen Eingriff und wurde in Zusammenarbeit mit Professor Saße durchgeführt. Narkose und Intubation wurden wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben eingeleitet und die Maus in Rückenlage auf eine Wärmeplatte fixiert. Zur Kontrolle der Narkosetiefe wurde die Herzfrequenz über zwei Nadelelektroden an gegenüberliegenden Extremitäten abgeleitet. Über die Tiefe der Anästhesie wurde ein Sinusrhythmus von 350 – 450 bpm (*beats per minute*, Herzschläge pro Minute) eingestellt. Der Brustkorb wurde vorsichtig geöffnet und auftretende Blutungen durch Verödung der Blutgefäße direkt gestoppt. Das freigelegte, schlagende Herz wurde vorsichtig mit einem Metalllöffel angehoben, der als (neue) Ableitungselektrode diente. Die zweite Elektrode verblieb am rechten Vorderlauf. Die Mäuse wurden unter einem Makroskop (Olympus) mit Fokussierung auf das Herz platziert. Die elektrophysiologische Analyse der ChR2 Aktivität wird in Kapitel 3.9.2 und die makroskopische Analyse der mCherry Expressionsstärke wird in Kapitel 3.11.1 beschrieben. Am Ende der Versuche wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Herzen zur *ex vivo* Analyse verwendet (Kapitel 3.8.5).

3.8.4 Organentnahme bei der adulten Maus

20 Minuten vor Präparationsbeginn wurde den Mäusen 150 µl Heparin intraperitoneal gespritzt, um die Blutgerinnung während der Präparation zu inhibieren. Nach Tötung durch zervikale Dislokation wurden die Mäuse in Rückenlage fixiert und mit 70 % Ethanol desinfiziert. Bauchraum bzw. Schädel wurden geöffnet und die entnommenen Organe direkt in eisgekühltes PBS überführt. Neben den Herzen wurden folgende Organe zur Kontrolle auf eine mögliche CAG-hChR2-mCherry Expression entnommen: Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Milz und Diaphragma.

3.8.5 Ex vivo Analyse der Channelrhodopsin-2 (ChR2) Aktivität im „Langendorff-Herz“

Das Herz der adulten Maus wurde wie im vorherigen Kapitel 3.8.4 beschrieben explantiert und über die Aorta auf eine mit PBS entlüfteten Aufziehkanüle gezogen. Die Kanüle wurde bis zu den Aortenklappen vorgeschoben und die Aorta mit einem Baumwollfaden an der Kanüle befestigt. Anschließend wurde die mit PBS gefüllte und entlüftete Spritze luftblasenfrei an die Kanüle angeschlossen und das Herz mit 5 ml PBS retrograd durchgespült, damit das im Herz verbliebene Blutvolumen ausgespült wurde. Die bisherigen Schritte wurden innerhalb weniger Minuten durchgeführt, um einer Blutgerinnung und Verstopfen der Herzgefäße zu vermeiden. Im Anschluss wurde das Herz über die Kanüle an einen Langendorff-Apparat angeschlossen, der einen gleichmäßigen Fluss von 2 ml/min, 37 °C temperierte und oxygenierte externe Perfusionslösung (Tyrode Lösung) bereitstellte. Die Aktivität des Herzens wurde elektrisch gemessen, indem die elektrischen Erregungen über zwei Punkte abgeleitet wurden. Eine Elektrode bildete ein Metalllöffel, auf dem das Herz auflag, die andere Elektrode wurde als Draht direkt an die kanülierte Aorta angelegt. Das ganze System wurde unter einem Makroskop (Olympus) mit Fokussierung auf das Herz platziert. Die elektrophysiologische Analyse der Funktion von ChR2 wird in Kapitel 3.9.2 und die makroskopische Analyse der mCherry Expressionsstärke wird in Kapitel 3.11.1 beschrieben.

3.8.6 Isolation adulter Kardiomyozyten durch Dissoziation von Herzen

Die Dissoziation der adulten Mäuseherzen war essentiell zur Analyse von isolierten, adulten Kardiomyozyten und erfolgte wie bereits veröffentlicht beschrieben (Bruegmann et al., 2010; Vogt et al., 2015). Die Herzen wurden über einen Langendorff-Apparat so lange mit Trypsin perfundiert, bis die Gewebestruktur des Herzens sich von innen heraus auflöste und sich vereinzelt Zellen ausspülen ließen. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 5 min mit 1000 rpm (*rounds per minute*, Runden pro Minute) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in externer Perfusionslösung resuspendiert. Die isolierten adulten Kardiomyozyten wurden direkt für elektrophysiologische Analysen weiterverwendet, wie unter Kapitel 3.9.1 beschrieben.

3.9 Elektrophysiologische Untersuchungen adulter Kardiomyozyten und adulter Herzen

3.9.1 Patch Clamp Analyse isolierter Kardiomyozyten

Zur elektrophysiologischen Analyse einzelner Kardiomyozyten nach AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry Transduktion, wurden adulte Mäuseherzen wie in Kapitel 3.8.6 beschrieben dissoziiert. Die isolierten ventrikulären Kardiomyozyten wurden auf 0,1 % Laminin eingedeckten Deckgläsern ausgesät und

externer Perfusionslösung hinzugegeben. Für die Patch Clamp Experimente wurde ein EPC-Verstärker (HEKA) in der *whole cell* Konfiguration verwendet. Aktionspotentiale wurden durch Lichtimpulse mit 1 ms Impulsdauer und 5 mW/mm² Lichtintensität in *current clamp* Modus (Stromklemmen Modus) mit berechneter *Liquid junction potential* (Flüssigkeitsübertragungspotential) Korrektur (JPCalc Funktion, pClamp 10,2, Axon Laboratory) angeregt. Zur Bestimmung des Ruhemembranpotentials wurden lediglich stimulierbare Kardiomyozyten in Betracht gezogen. Nach einem Vorpuls bis zu -47.1 mV, der aktive Na⁺ Kanäle inaktivierte, wurden lichtinduzierte Ionenströme im *voltage clamp* Modus (Spannungsklemmen Modus) bei konstantem Haltepotential von -52.1 mV und 1 s langem Lichtimpuls mit 5 mW/mm² Lichtintensität gemessen. Der *Peak* Ionenstrom wurde aus dem maximalen Einwärtsstrom des ersten Lichtimpulses bestimmt und der *Steady state* Ionenstrom wurde aus dem Durchschnitt der Amplituden zwischen 300 – 900 ms von fünf konsekutiven Lichtimpulsen analysiert. Die Einzelzellen wurden durch ein 20x Fluar Objektiv (NA 0,75, Zeiss) an einem Axiovert 200 Mikroskop (Zeiss) mit Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 470$ nm stimuliert. Die Analyse der Daten erfolgte getrennt von den Messungen (offline) mit Fitmaster (Heka), Excel (Microsoft Office) und Origin Pro 8 (Origin Lab).

3.9.2 Analyse der optogenetischen Stimulationsfähigkeit transduzierter Herzen

Adulte Mäuseherzen, die eine genetische Veränderung durch Adeno-assoziierte Viren erlebten, wurden wie in den Kapiteln 3.8.3 und 3.8.5 beschrieben vorbereitet, um ihre optogenetische Aktivität zu überprüfen. Hierfür wurde das EKG Signal mit einem Bioamplifier Aufnahmesystem, bestehend aus PowerLab 8/30, Animal Bio Amp ML 136 und LabChart 7.1 Software ausgelesen. Gleichzeitig steuerte das System über das Steuerungsmodul LEDD1 die im Makroskop (Olympus) eingekoppelte Stimulations-LED, LEDC5. Über die LabChart-Software wurden die Parameter Lichtimpulszeit (1 ms, 2 ms, 5 ms, 10 ms, 20 ms und 50 ms), Frequenz und angelegte Spannung der Lichtreize justiert, und die beleuchtete Fläche (10,2 mm², 25,3 mm² und 72,3 mm²) anhand des Zooms des Makroskops eingestellt. Die aus dem Makroskop austretende Lichtstärke wurde mit einem Powermeter gemessen und die Lichtintensitäten entsprechend der beleuchteten Flächengrößen berechnet.

Ziel dieser Versuche war es festzustellen, ob durch virale Manipulation der nativen Kardiomyozyten ventrikuläre Extrasystolen durch Lichtreize ausgelöst werden können. Wenn ja, wurden die niedrigsten Lichtintensitätswerte analysiert, die für eine fortlaufende Stimulation von Extrasystolen notwendig war. Hierfür wurden unterschiedliche Regionen des Herzens mit dem Makroskop fokussiert, linkes und rechtes Atrium bzw. linker und rechter Ventrikel. Es wurden 40 konsekutive Lichtimpulse mit konstanter Frequenz, 20 – 30 bpm über der basalen Herzfrequenz, mit gleichbleibender Lichtimpulszeit, Beleuchtungsfläche und Lichtintensität appliziert. Die niedrigste Lichtintensität, bei

der mindestens die letzten 20 Impulse ventrikulären Extrasystolen auslösten, wurden als der jeweilige Schwellenwert für eine 1:1 Ankopplung festgesetzt. Dies wurde für unterschiedlich große Beleuchtungsflächen (10,2 mm², 25,3 mm² und 72,3 mm²), sowie für unterschiedlich lange Lichtimpulszeiten (1 ms, 2 ms, 5 ms, 10 ms, 20 ms und 50 ms) wiederholt.

Aus den minimalen Lichtintensitätswerten der jeweiligen Lichtimpulszeiten wurden mit Origin Pro 8 (Origin Lab) entsprechende Reizzeit-Intensitäts-Kurven erstellt. Aus diesen Kurven lassen sich die Rheobase und die Chronaxie ablesen bzw. berechnen, die die Erregbarkeit von Muskel- und Nervenzellen beschreiben, in diesem Fall von murinen Herzmuskelzellen. Die Rheobase beschreibt die geringste elektrische Reizstärke, die bei einem unendlich langen Impuls zur Erregung benötigt wird. Die Chronaxie hingegen ist die minimale Zeit, die ein Reiz dauern muss, um bei doppelter Rheobase gerade noch erregend zu wirken. Um die Rheobase und die Chronaxie der einzelnen Herzen zu ermitteln, wurden die Reizzeit-Intensitäts-Kurven in Origin Pro 8 mit der mathematischen Lapicque-Hill Gleichung berechnet, die auf theoretische Annahmen für stimulierbare Membranen beruht (Tung et al., 1991):

$$I = \frac{Rh}{1 - e^{-\frac{d}{\tau}}}$$

I = Lichtintensität, Rh = Rheobase, d = Impulsdauer, τ = Reizzeitkonstante (0,6931).

Die Chronaxie wurde anschließend mit folgender Formel berechnet:

$$\ln(2) \times \tau$$

3.10 Histologische Analysen

3.10.1 Paraformaldehyd – Fixierung von explantierten Organen

Adulte Mauserherzen wurden wie in Kapitel 3.8.5 kanüliert und mit PBS durchgespült. Zur Fixation wurden weiterhin 10 ml einer 4 % Paraformaldehyd/Formalin-Lösung perfundiert mit anschließender Immersionsfixierung bei 4 °C über Nacht. Andere explantierte Organe wurden ausschließlich durch Immersionsfixierung in 4 % Paraformaldehyd/Formalin-Lösung bei 4 °C über Nacht fixiert.

3.10.2 Einfrieren von explantierten Organen und anfertigen histologischer Schnitte

Fixierte Organe wurden zunächst gründlich mit PBS gewaschen und anschließend zum Flüssigkeitsentzug in 20 % Saccharose-Lösung überführt und bei 4 °C gelagert. Der Prozess dauerte durchschnittlich 2 Tage und war mit dem Absenken der Organe auf den Boden des Gefäßes beendet. Das Einfrieren erfolgte in Probebehältern mit vorgelegtem Einfriermedium (Tissue-Tek). Die Organe

wurden vorsichtig und ohne Bläschenbildung mittig in das Einfriermedium platziert und die Probebehälter anschließend in durch Trockeneis gekühltes Isopentan gehalten. Das zunächst durchsichtige Tissue-Tek gefror und wurde dann weiß. Die eingefrorenen Organe wurden in den Probebehältern bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert.

Für histologische Analysen wurde von den eingefrorenen Organen am Kryotom 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf silanisierte Histobond Objektträger aufgenommen und einige Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte entweder gefärbt oder weiterhin bei -80 °C gelagert.

3.10.3 Immunfluoreszenzfärbungen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Zelltypen in Gewebeschnitten durch histologische Färbungen nachgewiesen, wofür mono- und polyklonale Primärantikörper verwendet wurden (verwendete Antikörper in Kapitel 3.3). Die Schnitte wurden jeweils mit einem Fettstift umrandet, der ein Ineinanderlaufen unterschiedlicher Färbelösungen verhinderte. Fünfminütiges Waschen mit PBS rehydrierte die Schnitte, die anschließend 10 Minuten in 0,2 % Triton-X 100 inkubierten. Das Einwirken des Detergens Triton-X 100 bewirkt die Permeabilisierung der Zellmembranen und ist essenziell zur Detektion intrazellulärer Proteine. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Organschnitte mit den jeweiligen Primärantikörpern in den jeweiligen Verdünnungen (Tabelle 9) mit 5 % Serum in PBS gelöst und bei Raumtemperatur zwei Stunden lang inkubiert. Das Serum stammte von der gleichen Spezies wie die in Folge verwendeten Sekundärantikörper und diente zum Blockieren unspezifischer Bindestellen. Die Schnitte wurden anschließend dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen, bevor die Inkubation mit den Zweitantikörpern folgte. Diese wurden in 0,1 % Hoechst Lösung verdünnt (Tabelle 10) und bei Raumtemperatur für eine Stunde in Dunkelheit auf die Gewebeschnitte gegeben. Die Zweitantikörper waren spezifisch gegen die Spezies gerichtet, in der der Primärantikörper produziert wurde, womit sie an dessen schwere Kette (F_C) (zuständige für Speziesspezifität) banden. Für die Zellkernfärbung wurde der Hoechst-Farbstoff eingesetzt, der an Bindestellen innerhalb der „kleinen Furche“ von DNA-Strängen bindet. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden Deckgläser mit dem Fluka Eindeckmedium blasenfrei auf die Objektträger aufgetragen. Abschließend mussten die Objektträger zum Trocknen für 24 – 36 Stunden trocken und dunkel gelagert werden.

3.10.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wird zur Unterscheidung verschiedener Zellstrukturen in Gewebeschnitten genutzt. Hierbei werden Zellkerne durch Hämatoxylin blauviolett und die Proteine

des Zellplasmas durch Eosin rosarot gefärbt. Für die Durchführung wurden Organschnitte auf Objektträgern vorbereitet, wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben. Die Schnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 %, 70 % und 0 % = Aqua dest.) jeweils für fünf Minuten inkubiert und dabei schrittweise mit Wasser angereichert. Danach wurden die Zellkerne durch eine vierminütige Inkubation in Hämatoxylin Lösung angefärbt und der Färbeschritt durch einminütiges Waschen mit warmem Leitungswasser beendet. Der zweite Färbeschritt wurde anschließend mit einer Inkubationszeit von zwei Minuten in 0,5 %iger Eosin Lösung durchgeführt. Durch kurzes Eintunken in Aqua dest. wurden die Schnitte von überstehender Färbelösung befreit und durch jeweils fünfminütigem inkubieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 % und 100 %) entwässert. Abschließend wurden die Schnitte in Xylol geklärt und mit Entellan eingedeckt. Jeder Schnitt wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.10.5 Pikro-Siriusrot Färbung

Zur Identifizierung von fibrotischem Gewebe wird eine Pikro-Siriusrot Färbung angewendet. Dabei färben sich Kollagene rot und Muskelfasern sowie Zytoplasma gelborange. Für die Durchführung wurden Organschnitte auf Objektträgern vorbereitet, wie in Kapitel 3.10.2 beschrieben. Die Schnitte wurden zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 90 % und 70 %) jeweils für fünf Minuten inkubiert und dabei schrittweise mit Wasser angereichert. Die Färbung wurde durch 30 Minuten inkubieren in Direct Red 80 Lösung bei Raumtemperatur vollführt und durch Waschen mit destilliertem Wasser abgestoppt. Durch jeweils fünfminütigem inkubieren in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 90 % und 100 %) wurden die Schnitte entwässert. Abschließend wurden die Gewebeschnitte in Xylol geklärt und mit Entellan eingedeckt. Jeder Schritt wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.11 Makroskopische und Mikroskopische Methoden

3.11.1 Analyse der mCherry Expression beim transduzierten Herz der Maus

Von den transduzierten Herzen aus den Kapiteln 3.8.3 und 3.8.5 wurden mit Hilfe des Stereomakroskops (Olympus) und einer angeschlossenen Andor iXon Kamera, Bilder der mCherry Expression aufgenommen. Mit einer kalibrierten X-Cite Lampe als Lichtquelle und dem F36-504 TxRed HC Filterset (AHF) als Fluoreszenzfilter wurden die Herzen mit grünem Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 587$ nm beleuchtet und die rote mCherry Fluoreszenz bei $\lambda = 610$ nm mit folgenden Kameraeinstellungen aufgenommen: 8.3 ms Belichtungszeit, 1004 x 1002 Pixel, 4 x 4 Binning. Die Quantifizierung der Pixelhelligkeit wurde mit ImageJ WCIF Software durchgeführt und die resultierenden Daten in arbiträren Fluoreszenz Einheiten (a.u., *arbitrary units*) angegeben.

3.11.2 Hochauflösende makroskopische und mikroskopische Aufnahmen

Hochauflösende makroskopische Bilder explantierter und mit PBS durchgespülte oder lediglich gewaschene Organe, sowie Übersichtsaufnahmen von Organschnitten, oder isolierter Kardiomyozyten wurden mit einem AxioZoom.V16 Makroskop aufgenommen, welches mit einem PlanApoZ 1.0x Objektiv, und einer AxioCam Mrm Kamera ausgestattet war und über die Zen 2012 Software, Carl Zeiss gesteuert wurde. Z-Stapel zweidimensionaler Aufnahmen mit dreidimensionaler Information wurden mit dem Modul „*extended depth of field*“ in einzelne zweidimensionale Bilder umgerechnet, wobei die Information aus den verschiedenen Bildebenen erhalten blieb.

Tabelle 17 Verwendete Fluoreszenzfilter am Makroskop AxioZoom.V16

Bezeichnung	Hersteller
Filterset 38 HE	Carl Zeiss
Filterset 43 HE	Carl Zeiss
DAPI BP F31-000	AHF Analysentechnik

Mikroskopische Aufnahmen wurden an Inversmikroskopen, des Models Axiovert 200M durchgeführt, die mit Apotom Modul 1 bzw. 2, 10x EC-Plan-Neofluar, 25x-, 40x- und 63x-Plan-Apochromat Objektiven und AxioCam Mrm bzw. MRc Kameras ausgestattet waren und über die AxioVision bzw. Zen 2012 Software (Carl Zeiss) gesteuert wurden.

Tabelle 18 Verwendete Fluoreszenzfilter an den Mikroskopen Axiovert 200M

Bezeichnung	Hersteller
TxRed ET Filterset (F46-008)	AHF Analysentechnik
Tritc HC Filterset (F36-503)	AHF Analysentechnik
Cy5 ET Filterset (F46-006)	AHF Analysentechnik
DAPI HC Filterset (F36-500)	AHF Analysentechnik
DAPI Filter Set 49	Zeiss

3.12 Statistik

Die statistischen Berechnungen und Auswertungen wurden mit Hilfe der Programme GraphPad Prism 5 und Origin Pro 8 durchgeführt. Die verwendeten statistischen Tests und die *P*-Werte sind in den Legenden angegeben. Ein *P*-Wert < 0,05 wurde als signifikant angesehen. Die *n* – Werte bezeichnen die Anzahl der untersuchten Herzen oder Einzelzellen.

3.13 Zusammenstellung der Diagramme, Abbildungen & Skizzen

Alle Abbildungen dieser Arbeit wurden in Corel Draw XI erstellt. Hierfür wurden Skizzen gezeichnet, die zur Verdeutlichung von Sachverhalten dienen, makroskopische und mikroskopische Aufnahmen

zusammengestellt, sowie Diagramme aus GraphPad Prism 5 und Origin Pro 8 zur vereinheitlichten Darstellung formatiert.

4 Ergebnisse

4.1 Lokale Injektion von AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

Für die lokale Injektion wurden 10 Wochen alte Maus Weibchen des CD-1 Wildtypstammes anästhesiert und der Zugang zum Herz durch eine Thorakotomie eröffnet. Anschließend wurden die AAVs am Apex der Mäuseherzen in das Myokard injiziert, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben. Die Versuchstiere wurden bis zu den Untersuchungen im Tierstall untergebracht. Die Expressionsanalyse des Fusionsproteins hChR2-mCherry erfolgte zu mehreren zeitlichen Abständen nach der Injektion. Hierfür wurden die Mäuse ein weiteres Mal anästhesiert und einer Thorakotomie unterzogen. *In vivo* wurden die Herzen erst makroskopisch auf mCherry Fluoreszenz geprüft (Kapitel 3.11.1) und anschließend die Funktion des ChR2 durch Lichtreizung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 470$ nm untersucht (Kapitel 3.8.3). Die Versuchstiere wurden euthanasiert und die Herzen für weitere histologische Untersuchungen explantiert, fixiert, eingefroren und geschnitten (Kapitel 3.10).

4.1.1 Histologische Betrachtung der mCherry Expression in Mauserzen nach lokaler Injektion der rekombinanten Adeno-assoziierten Virusvektoren, AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

In den makroskopischen und histologischen Aufnahmen von Abbildung 9 wird exemplarisch ein Mauserz gezeigt, dass eine Woche nach der lokalen Injektion mit AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry analysiert wurde. In allen Herzen in denen mCherry Fluoreszenz festgestellt wurde, waren die Signale lediglich am Apex lokalisiert, wie in Abbildung 9B deutlich zu sehen. Die Vergrößerung dieses Bereichs in Abbildung 9C macht deutlich, dass die Verteilung des Proteins im Gewebe nicht homogen ist. In den mikroskopischen Analysen der histologischen Herzschnitte bestätigte sich zum einen, die lokale Begrenzung der mCherry Signale auf einer Seite der Herzwand (Abbildung 9D), zum anderen, dass nicht alle Herzmuskelzellen im Infektionsbereich mCherry positiv waren (Abbildung 9E). Die transduzierten Zellen lagen in Clustern beieinander und in den einzelnen Zellen wirkte die Fluoreszenzintensität von mCherry unterschiedlich stark. Die α -Actinin Färbung belegte, dass es sich hierbei um Kardiomyozyten handelte (Abbildung 9D, weiß). ChR2 ist als Kanalprotein ein integrales Membranprotein, wodurch es durch einen hydrophoben Anteil in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran integriert ist (Skizze in Abbildung 5). Da das Expressionskonstrukt ein Fusionsprotein aus ChR2 und mCherry war, wurde das mCherry Signal lediglich entlang der Zellmembranen und Membraninvaginationen der T-Tubuli lokalisiert (Abbildung 9F, rot).

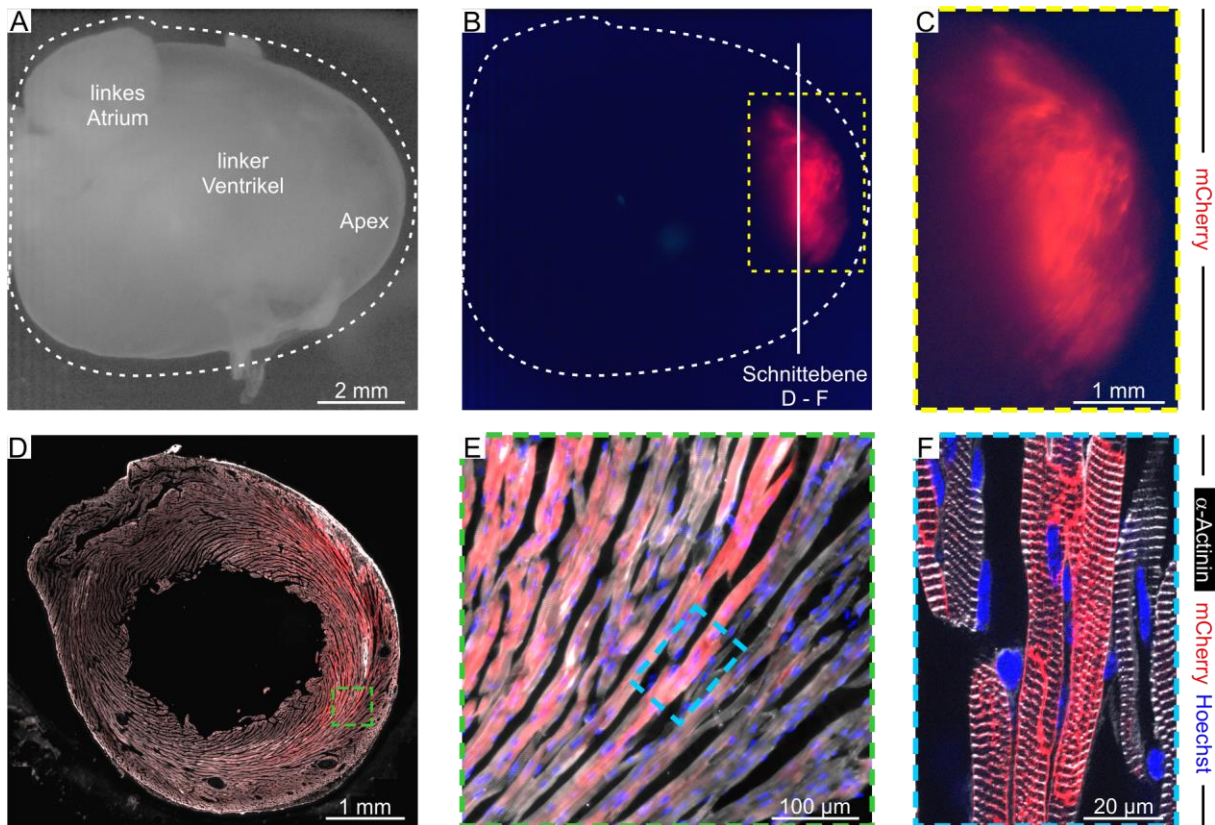


Abbildung 9: Expression des Fusionsproteins hChR2-mCherry nach lokaler Injektion des rekombinanten AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry Virusvektors in das Myokard des Mauserzes in der Nähe des Apex

(A) Durchlicht-, (B) Fluoreszenzaufnahme und (C) Vergrößerung des in (B) gelb markierten Bereich des Herzens. (D – F) Histologischer Herzschnitt vom in (A – C) abgebildeten Mauserz. α -Actinin in Weiß, mCherry Fluoreszenz in Rot, Hoechst Färbung in Blau. (D) Vollständiger Querschnitt. (E) Vergrößerung des grün markierten Bereichs in (D). (F) Vergrößerung des blau markierten Bereichs in (E).

4.1.2 Lichtinduzierte Stimulation der Mauserzen nach lokaler Injektion von AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

Die Aktivität des Channelrhodopsins-2 wurde geprüft, indem mit Lichtreizen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 470 \text{ nm}$ auf die mCherry exprimierende Stelle geleuchtet wurde. Bei korrekter Faltung des lichtsensitiven Kanalproteins und bei ausreichender Expressionsmenge wurde eine Herzkontraktion ausgelöst.

Wie in den Kapiteln 3.8.3 und 3.9.2 beschrieben wurde der Thorax der Mäuse unter Narkose geöffnet, sodass deren Herzen frei zugänglich waren. Ein kleiner Metalllöffel, der unter die Herzen geschoben wurde, diente als erste Ableitelektrode. Als zweite Elektrode wurde eine Nadel verwendet, die in einen Vorderlauf platziert wurde. Über diese beiden Elektroden wurden die Elektrokardiogramme (EKGs) der untersuchten Mäuse abgeleitet und mit der LabChart-Software aufgenommen.

In Abbildung 10 ist ein Ausschnitt eines Stimulationsexperimentes an einer Maus abgebildet, dessen Herz sechs Tage zuvor mit AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry lokal infiziert wurde. Die blaue Linie zeigt die

Lichtimpulse an. Jede Auslenkung nach oben aus der Nulllinie repräsentiert einen Lichtimpuls, dessen Dauer in der Breite des Signals wiedergegeben ist. Wie zuvor beschrieben, wurde parallel dazu das EKG der Maus über eine Elektrode am Vorderlauf und einer am freigelegten Herz aufgenommen. Mit den Stimulationsexperimenten wurden die minimalen Lichtintensitäten ermittelt, die benötigt wurden, um die Herzen konstant durch Lichtreize zu stimulieren. Hierfür wurden die Herzen mit 40 konsekutiven Lichtimpulsen beleuchtet. Dabei wurde analysiert, ob sich im EKG entsprechende durch Licht stimulierte Extrasystolen aufzeichnen ließen. Die Pulsfrequenz wurde dabei 20 – 30 bpm (*beats per minutes*) über der nativen Herzfrequenz eingestellt. Die erhöhte Pulsfrequenz wurde benötigt, da die Impulse der Lichtstimulation ansonsten in die von der Vorhofstimulation ausgelöste Refraktärzeit des Myokards angekommen wären und dadurch nichts bewirkt hätten. Für die Lichtimpulszeiten 1 ms, 2 ms, 5 ms, 10 ms, 20 ms und 50 ms wurde jeweils die minimale Spannung bestimmt, bei der jede der 40 Lichtreize eine Extrasystole auslöste, sofern dies möglich war. Über die angelegte Spannung wurde die Intensität des Lichtimpulses reguliert und wurde im Rahmen dieser Arbeit als Lichtintensität bezeichnet. Die Experimente wurden mit zwei beleuchteten Flächengrößen auf dem Epikard des Ventrikels durchgeführt, 10,2 mm² und 25,3 mm². Hierbei wurde überprüft, ob die Fläche des stimulierten Gewebes ebenfalls ein Faktor war, der es erlaubt die Lichtintensität zu verringern. Mit der kleinen Stimulationsfläche 10,2 mm² wurde eine Fläche stimuliert, die innerhalb der infizierten Bereiche lag. Mit der 25,3 mm² großen Stimulationsfläche wurde dagegen ein Bereich beleuchtet, der größer als die mCherry positive Fläche war. Dabei war zu beachten, dass die Vergrößerung der beleuchteten Flächen bei gleichbleibender Spannung zu einer Verringerung der Lichtstärke pro mm² führte.

Bei dem in Abbildung 10 exemplarisch gezeigten Experiment wurde ein Herz mit 25,3 mm² großen Lichtimpulsen beleuchtet, die eine Dauer von 20 ms und eine Lichtintensität von 0,3 mW/mm² hatten. Die beiden Boxen (rot und grün) in Abbildung 10B sind Vergrößerungen aus Abbildung 10A. Die rote Vergrößerungsbox zeigt die EKG Aufnahme der letzten fünf Herzschläge vor und der ersten fünf Herzschläge während der Lichtstimulation. Als erstes Signal ist die P-Welle zu sehen, die von den nativen pulsgebenden Zellen des Sinusknotens stammte. Dem folgte das Signal des QRS-Komplexes, welches den Verlauf der Ausbreitung des elektrischen Signals während der Kontraktion der Herzkammern wiedergab. Nach jeweils 152,5 ms wiederholte sich das Signal der P-Welle und dem folgte das Signal des QRS-Komplexes. Mit Beginn des Lichtsignals auf dem infizierten Bereich des Herzens veränderte sich die Form des QRS-Komplex Signals. Die Amplitude verringerte sich und die Breite des Signals verlängerte sich in diesem Fall von 14,2 ms ± 0,3 ms auf 22 ms ± 0,7 ms. Die Veränderung des QRS-Komplex Signals deutete ganz klar auf eine veränderte Ausbreitung des elektrischen Signals zur Kontraktion der Ventrikel hin. Zudem folgte das veränderte QRS-Komplex

Signal den Lichtreizen, wie durch die gestrichelte, hellblaue Linie gekennzeichnet. Das Signal der P-Welle blieb von den Lichtreizen unbeeinflusst und lief in niedrigerer Frequenz weiter, wie die gestrichelte, hellgraue Linie indiziert. In der Vergrößerung ist deutlich zu sehen, dass das Signal der P-Welle mit dem des QRS-Komplexes verschmolz, sobald es von diesem eingeholt wurde. In der grünen Box wird der Bereich am Ende der 40 Lichtreize vergrößert. Durch die hellblauen Markierungen verdeutlicht, führte jeder Lichtimpuls zu einer Extrasystole. Das Herz wurde erfolgreich durch Lichtimpulse gepaced. Sobald die Lichtreize endeten, folgte das QRS Komplex Signal wieder dem Signal der P-Welle. Die Form der QRS-Komplexe glich nach dem Experiment denen vor der Lichtreizung.

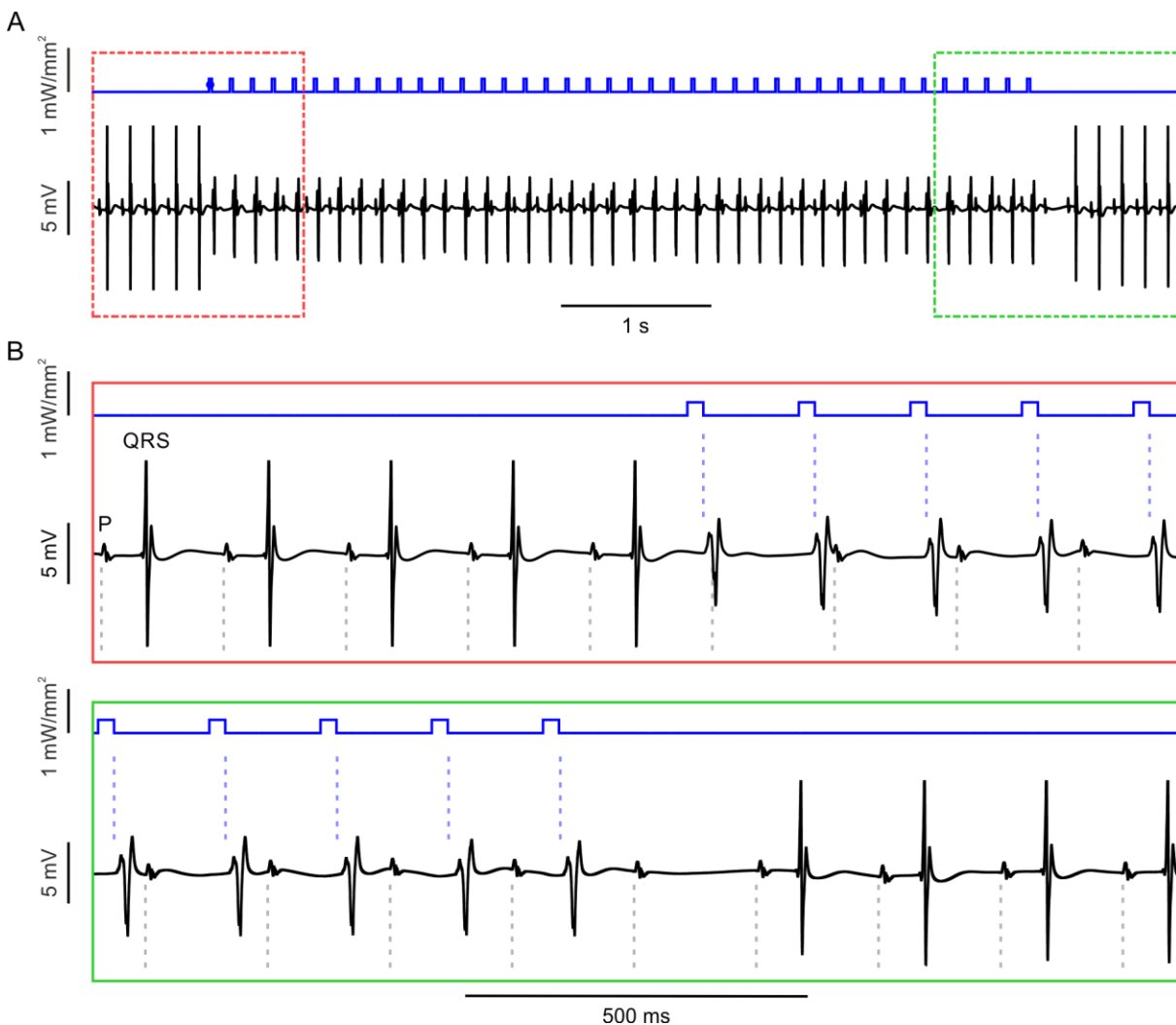


Abbildung 10: Aufnahmen eines Stimulationsexperimentes

Eine 25,3 mm² große Fläche des Mausherzens wurde im Bereich der Injektion mit Lichtreizen beleuchtet (Wellenlänge $\lambda = 470$ nm (blau), Impulsdauer 20 ms und Lichtintensität 0,3 mW/mm²). **(A)** Aufnahme des EKGs (schwarz) parallel zur Lichtstimulation mit 40 Lichtimpulsen. **(B)** Vergrößerungen der Boxen in (A) zur deutlicheren Darstellung des EKGs. Die rote Box zeigt den Bereich am Anfang des Experimentes und die grüne Box den Bereich am Ende der Lichtstimulation.

4.1.3 Analyse nach lokaler Injektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

In den Lichtstimulationsexperimenten mit den lokal infizierten Mausherzen wurden die minimalen Lichtintensitäten zu den jeweils getesteten Lichtreizzeiten gemessen. Für jedes analysierte Mausherz

wurde aus diesen Daten die entsprechenden Reizeit-Intensitäts-Diagramme erstellt. In Abbildung 11A ist exemplarisch ein Diagramm zu sehen, dessen Herz die niedrigsten Lichtintensitäten in dieser Messreihe ergab und welches selbst bei sehr kurzen Lichtreizeiten noch stimulierbar war. Die Lichtintensitätswerte stellten hyperbelförmige Kurven dar, mit hohen Lichtintensitäten wie $2,31 \text{ mW/mm}^2$ und $1,52 \text{ mW/mm}^2$ bei kurzen Lichtimpulszeiten von 1 ms, und niedrigen Lichtintensitäten wie $0,36 \text{ mW/mm}^2$ und $0,20 \text{ mW/mm}^2$ bei langen Lichtreizeiten von 50 ms, entsprechend der Beleuchtungsflächen $10,2 \text{ mm}^2$ (grün) bzw. $25,3 \text{ mm}^2$ (magenta). Aus der Reizeit-Intensitäts-Kurve wurden Rheobase und Chronaxie für die Lichtstimulation bei diesem Herzmuskel bestimmt (Kapitel 3.9.2). Die Rheobase ist die geringste elektrische Reizstärke, die zur Erregung benötigt wird, wohin gegen die Chronaxie die minimale Zeit angibt, die ein Reiz dauern muss, um bei doppelter Rheobase gerade noch erregend zu wirken. In Abbildung 11A wird dies exemplarisch durch gestrichelte Pfeile für die Messungen mit der Beleuchtungsfläche $25,3 \text{ mm}^2$ wiedergegeben. Der blaue Pfeil weist auf die Rheobase bei $0,19 \text{ mW/mm}^2$ und der rote Pfeil zeigt auf die Chronaxie 5,2 ms. Bei der Beleuchtungsfläche $10,2 \text{ mm}^2$ betrug die Rheobase $0,32 \text{ mW/mm}^2$ und die Chronaxie 4,6 ms. Diese Werte besagen, dass bei diesem Herzen die 60 %ige Verkleinerung der Beleuchtungsfläche einen Anstieg der benötigten minimalen Lichtintensität um 68 % zur Folge hatte.

In Abbildung 11B werden die einzelnen Daten der fünf untersuchten Herzen präsentiert, sofern bei gleicher Beleuchtungsfläche und Lichtimpulszeit jeweils fünf Werte messbar waren. Anhand dieser Lichtintensitäten wurden Durchschnittswerte berechnet und daraus die durchschnittlichen Reizeit-Intensitäts-Kurven erstellt. Für die Lichtimpulszeiten 10 ms, 20 ms und 50 ms waren für beide Beleuchtungsflächen alle fünf Tiere stimulierbar. Die jeweiligen Datengruppen wurden mit gepaarten, zweiseitigen *t*-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft (10 ms, $p = 0,0305$; 20 ms, $p = 0,0066$; 50 ms, $p = 0,0047$) und zeigten deutlich, dass die Vergrößerung der Beleuchtungsfläche eine Verringerung der notwendigen Lichtleistung ermöglichte. Um eine Aussage zu treffen, ob Rheobase und Chronaxie im Durchschnitt ebenfalls Unterschiede aufwiesen, wurden aus den Ergebnissen jeder Maus einzelne Reizeit-Intensitäts-Kurven erstellt und die Werte daraus ermittelt. In Abbildung 11C ist deutlich zu sehen, dass die Mittelwerte der Rheobase bei beiden Beleuchtungsflächen doppelt so hoch lagen wie bei dem Einzelexperiment in Abbildung 11A. Dies hing mit der großen Streuung der Lichtintensitätswerte zusammen, wie Abbildung 11B belegt. Die Relevanz der Beleuchtungsfläche wurde auch bei der Analyse der Rheobase-Werte durch einen gepaarten, doppelten *t*-Test deutlich ($p = 0,0046$), bei der die größere Beleuchtungsfläche eine niedrigere Lichtintensität zur Stimulation der Herzen ermöglichte. Die Chronaxie Werte in Abbildung 11D wiesen eine Streuung mit bis zu 5 ms auf, dennoch lagen die Mittelwerte gleichauf zu den Zeiten des exemplarischen Experiments aus Abbildung 11A. Selbst wenn die Verteilungswolken der Daten den Eindruck vermittelten, dass einer Vergrößerung

der Beleuchtungsfläche mit gleichzeitiger Verringerung der Rheobase eine Verlängerung der Chronaxie folgte, wurde das beim Signifikanztest nicht bestätigt ($p = 0,1507$). Eine eindeutige Verlängerung der Chronaxie hätte bedeutet, dass die benötigte Impulsdauer sich verlängert hätte. Die Ursache dafür wäre ein durch Hitze geschädigtes Muskelgewebe gewesen, welches dadurch mehr Energie für eine Kontraktionserregung benötigt hätte (Bossert and Vogedes, 2019). Da dies nicht der Fall war konnte davon ausgegangen werden, dass der Muskel durch die Lichtstimulation nicht beschädigt wurde.

Der QRS-Komplex zeigte eine erhebliche Veränderung durch die Lichtstimulation über die genetisch manipulierten Zellen im Arbeitsmyokard des Ventrikels, wie in Abbildung 10 deutlich zu sehen ist. Die Dauer der nativen und durch Licht erzeugten QRS-Komplexe bei 20 ms Lichtreizen wurde von vier gemessenen Mausherzen analysiert und für die Beleuchtungsflächen 10,2 mm² in Abbildung 11E und 25,3 mm² in Abbildung 11F dargestellt. In allen Fällen bewirkten die Lichtreize Verbreiterungen der QRS-Komplexe, was Signifikanztests bestätigten (gepaarter, zweiseitiger t -Test, Abbildung 11E, $p = 0,0426$; Abbildung 11F, $p = 0,0197$).

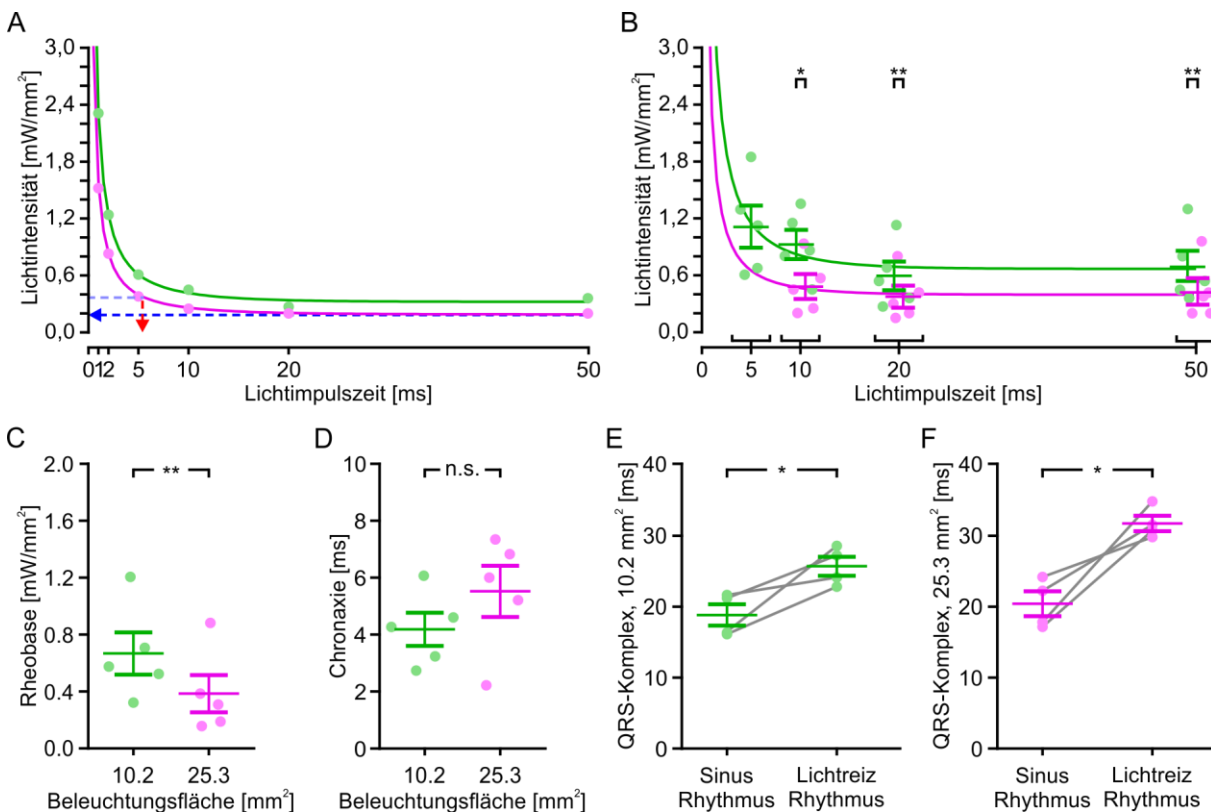


Abbildung 11: Ergebnisse der Lichtstimulationsexperimente, eine Woche nach lokaler Injektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

(A, B) Reizzeit-Intensitäts-Kurven wurden aus den gemessenen Stimulationswerten mit der mathematischen Lapicque-Hill Gleichung mit Origin Pro 8 errechnet. Beleuchtungsflächen: 10,2 mm² in Grün, 25,3 mm² in Magenta. (A) Experimente eines Herzens mit den am niedrigsten gemessenen Lichtintensitätswerten, für 1 – 50 ms. Blauer Pfeil deutet auf Rheobase sowie Roter Pfeil auf Chronaxie, der Reizzeit-Intensitäts-Kurve für 25,3 mm² Beleuchtungsfläche. (B) Einzelwerte der Experimente und Durchschnitt \pm SEM für 5 – 50 ms. (C) Rheobase- und (D) Chronaxie- Werte wurden aus den einzelnen Reizzeit-Intensitäts-Kurven ermittelt (B – D, $n = 5$). (E, F) QRS-Komplex Analyse anhand der 20 ms Lichtreize für 10,2 mm² und 25,3 mm² Beleuchtungsfläche ($n = 4$). Fehlerbalken: SEM. (B – F) gepaarter, zweiseitiger t -Test, P : * < 0,05, ** < 0,001, *** < 0,0001.

Die Transduktion durch Adeno-assoziierte Virusvektoren führt bekanntermaßen zu einer episomalen Expression (Wolff et al., 1990), da die genetische Information nicht in die Wirts DNA eingebaut wird, sondern lediglich als Plasmid in der Wirtszelle verbleibt. Die Expression der Channelrhodopsin-2 und mCherry Proteine kann entweder durch Apoptose oder Proliferation der exprimierenden Zellen abnehmen, da im ersteren Fall die Information verloren geht und im letzteren der prozentuale Anteil positiver Zellen abnimmt. Es ist daher unabdingbar den Expressionsverlauf zu untersuchen, indem nach mehreren Zeitpunkten die Expressionsstärke überprüft wird. Nach den Untersuchungen, die eine Woche nach der Infektion mit 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry durchgeführt wurden, folgte die nächste Versuchsreihe zwei Wochen nach der Infektion. Von drei infizierten Mäusen reagierte ein Herz auf Licht (33 %). Abbildung 12 zeigt das Diagramm mit den einzelnen Lichtintensitätswerten und den Verlauf der daraus abgeleiteten Reizzeit-Intensitäts-Kurven. Die entsprechend auszulesenden Rheobase-Werte betragen $0,29 \text{ mW/mm}^2$ und $0,48 \text{ mW/mm}^2$ für die Beleuchtungsflächen $25,3 \text{ mm}^2$ und $10,2 \text{ mm}^2$. Diese Werte lagen noch unter den Mittelwerten, die bei den Mäusen nach einer Woche gemessen wurden. Die Analysen der QRS-Komplex Dauer bei den 20 ms Experimenten ergaben bei der Beleuchtungsfläche $10,2 \text{ mm}^2$ eine Verlängerung um 7 ms mit Lichtstimulation, sowie bei der Beleuchtungsfläche $25,3 \text{ mm}^2$ einen Verlängerung um 7,2 ms. Damit waren die Experimente eindeutig ventrikuläre und lichtgetriggerte Stimulationen.

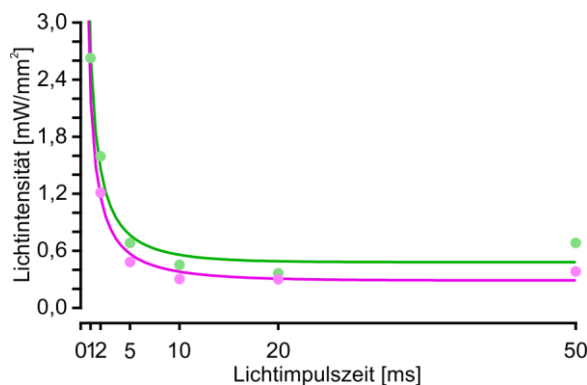


Abbildung 12: Reizzeit-Intensitäts-Diagramm des einzigen stimulierbaren Mauserzens zwei Wochen nach lokaler Injektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

Reizzeit-Intensitäts-Kurven mit der mathematischen Lapicque-Hill Gleichung mit Origin Pro 8 errechnet. Beleuchtungsflächen: $10,2 \text{ mm}^2$ in Grün, $25,3 \text{ mm}^2$ in Magenta.

Um den Expressionsverlauf von ChR2 und mCherry weiter zu verfolgen wurde eine weitere Versuchsreihe drei Wochen nach AAV Infektion analysiert. Keines der untersuchten Tiere ($n = 4$) konnte durch Licht stimuliert werden (Abbildung 13A). Die Expressionsstärke des Fusionsproteins wurde anhand der mCherry Expression durch Messung der Fluoreszenzintensität durchgeführt (Kapitel 3.11.1). Aufgrund der gemeinsamen Expression der Bestandteile des Fusionsproteins und der Annahme, dass alle mCherry Proteine gleich stark fluoreszieren, kann die Fluoreszenzintensität von mCherry als Maß für die Expression von Channelrhodopsin-2 gleichgesetzt werden. Aus technischen Gründen existieren nicht für alle untersuchten Mauserzen entsprechende Fluoreszenzmessungen. Die Ergebnisse in Abbildung 13B zeigen deutlich, dass die stimulierbaren Herzen aus der ersten Woche

eine rund drei bis siebenfach höhere mCherry und somit Chr2 Expression hatten, als die nicht stimulierbaren Herzen aus der dritten Woche. Für einen direkten Vergleich innerhalb der zweiten Woche fehlen die Daten des stimulierbaren Herzens. Dennoch kann festgehalten werden, dass die mCherry Fluoreszenz mit der optogenetischen Stimulationsfähigkeit der Mausherzen einhergeht.

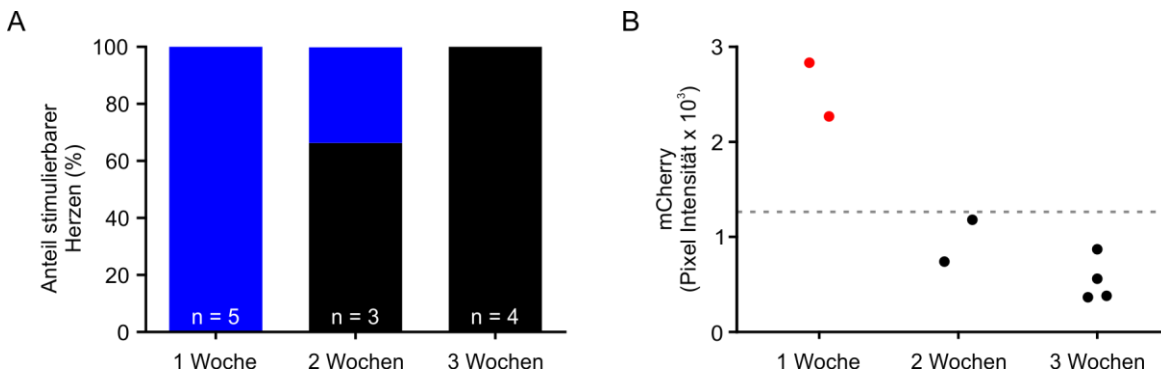


Abbildung 13: Übersicht der analysierten Mausherzen nach lokaler Infektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChr2-mCherry
(A) Anzahl der untersuchten Mäuse, weiße Schrift. Blau: mit Licht stimulierbare Mausherzen, Schwarz: Mausherzen die nicht auf Licht reagiert haben. **(B)** Analyse der mCherry Intensität, Einheit: a.u. (*arbitrary units*). Rote Punkte: mit Licht stimulierbare Mausherzen, Schwarz: Mausherzen die nicht auf Licht reagiert haben. Graue Linie: imaginäre Lichtsensitivitätsschwelle.

Der Verlust der Stimulationsfähigkeit und der Rückgang der mCherry Fluoreszenz kann unter anderem durch eine Immunreaktion hervorgerufen werden. Das Immunsystem könnte entweder durch die Injektionsverletzungen (Xiao et al., 1996), den AAV Virusvektor oder den Expressionsprodukten Chr2 bzw. mCherry aktiviert worden sein (Vandenberghe and Wilson, 2007). Um zu bestätigen, dass eine Immunreaktionen bei der reduzierten Expression beteiligt sein könnte wurden histologische Analysen der bisher gemessenen Herzen durchgeführt (Kapitel 3.10, 3.10.3, 3.10.4). Abbildung 14 zeigt repräsentative Herzschnitte von links nach rechts in chronologischer Reihenfolge und von oben nach unten Folgeschnitte des gleichen Herzens mit unterschiedlichen Färbungen. Die CD45 Färbung, die Leukozyten markiert, weist bei allen untersuchten Herzen im Bereich der Injektion auf eine massive Infiltration weißer Blutkörperchen hin (Abbildung 14A-C, grünes Signal). Die Fülle dieser Immunzellen bestätigt sich durch die hohe Anzahl an Zellkernen in den HE-Färbungen (Abbildung 14D-F, blaues Hämatoxylin). Hinzu kommt, dass der Bereich des Herzens, in denen die weißen Blutkörperchen eindringen, sich mit der mCherry Expression deckte (Abbildung 14A, B). Im Herz von einer Woche nach der Injektion bildeten die Immunzellen eine Schneise inmitten der mCherry exprimierenden Zellen, wobei wenige rote Signale auch zwischen den grünen CD45 Signalen sichtbar sind. Dieser Herzschnitt scheint direkt den Einstichkanal zu zeigen, in den die Immunzellen einwanderten, die infizierten Zellen angriffen und durch ihre große Anzahl den Spalt im Muskelgewebe weiter weiteten. Anstelle der abgebauten Muskelzellen wurde fibrotisches Gewebe erzeugt, das sich wegen der Kollagenfasern in der Picro-Siriusrot Färbung als pink darstellte (Abbildung 14G-I). Das Herz der zweiten Analysewoche

zeigte ein ähnliches Infiltrationsmuster, wie das der ersten Woche, wobei beide Herzen durch Licht stimulierbar waren. Das Herz aus der dritten Woche nach der Injektion war dagegen nicht stimulierbar, wobei in der Fluoreszenzaufnahme (Abbildung 14C) auch kein mCherry Signal sichtbar ist. Gleichzeitig sind in rund zwei Dritteln dieses Herzschnitts CD45 Signale zu sehen, die auf eine sehr ausgeprägte Infiltration von Leukozyten hinweisen. Die Hämatoxylin-Eosin Färbung (Abbildung 14F) bestätigt die Infiltration von Immunzellen durch die hohe Anzahl an Zellkernen.

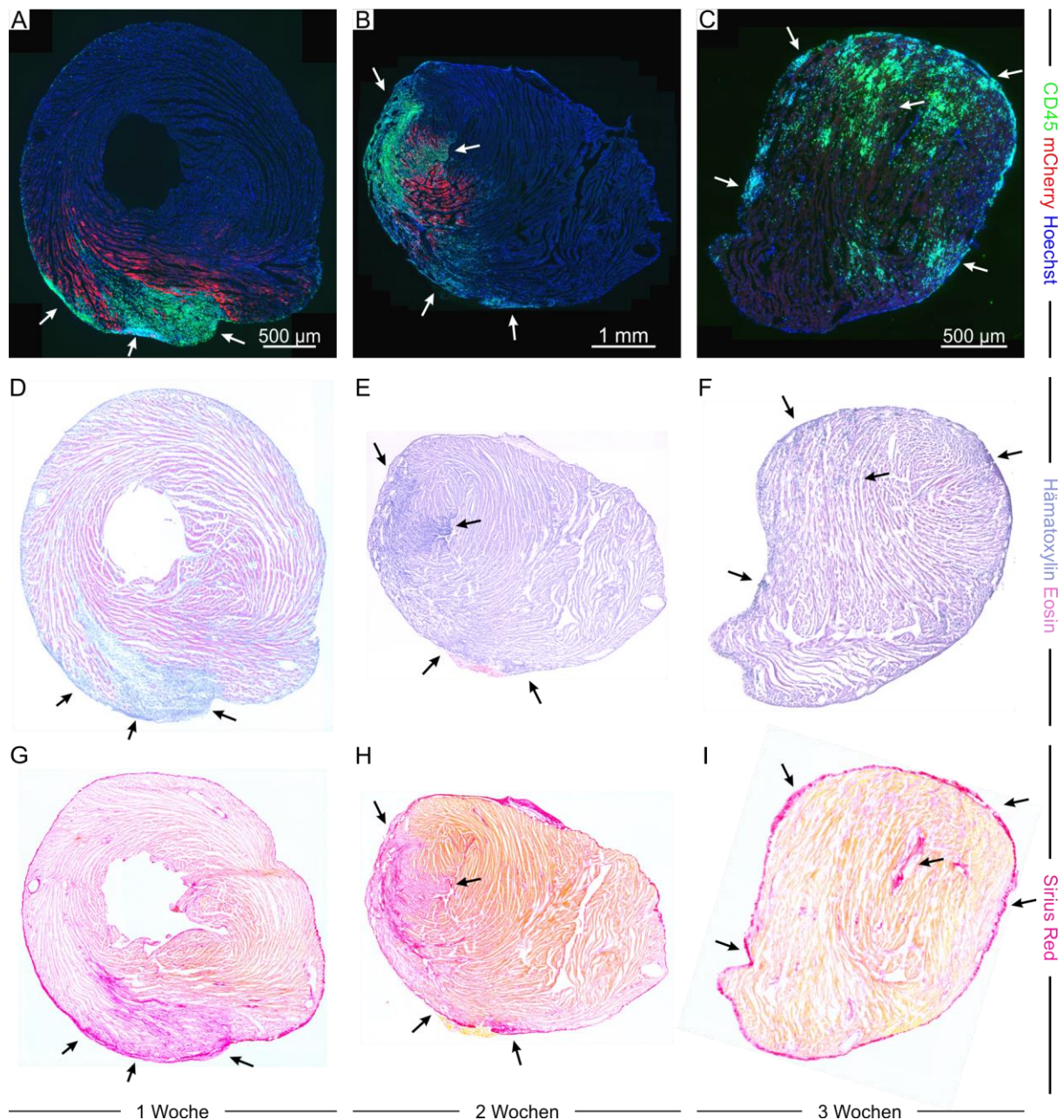


Abbildung 14: Infiltration von Immunzellen nach lokaler Injektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

(A – C) Fluoreszenzaufnahmen mit CD45 (grün), mCherry (rot) und Zellkernfärbung Hoechst (blau). Weiße Pfeile deuten auf Bereiche mit hoher CD45 Markierung. (D – E) HE-Färbungen, mit blau-violetter Zellkernfärbung (Hämatoxylin) und rosa/roter Zellplasmaproteinfärbung (Eosin). Schwarze Pfeile deuten auf Bereiche mit hoher Anzahl an Zellkernen. (G – I) Piko-Siriusrot Färbungen mit Kollagenfasern (pink), Muskelfasern und Zytoplasma (gelborange). Schwarze Pfeile deuten auf Bereiche mit viel Fibrose. (A, D, G) Folgeschnitte eines Mausherzens aus der 1. Analysewoche. (B, E, H) Folgeschnitte eines Mausherzens aus der 2. Analysewoche. (C, F, I) Folgeschnitte eines Mausherzens aus der 3. Analysewoche.

4.1.4 Analyse nach lokaler Injektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

Die bisher durchgeführten lokalen AAV-Injektionsexperimente ermöglichten es den Herzschlag durch Lichtimpulse wie einen Herzschrittmacher anzuregen. Diese Funktion konnte bei einer Virusvektormenge von 2×10^{11} gc bis zu zwei Wochen nach Infektion nachgewiesen werden (Kapitel 4.1.3). In histologischen Untersuchungen der infizierten Herzen wurden Immunreaktionen in Form von Infiltrationen weißer Blutkörperchen und anschließender Fibrose des Myokards festgestellt. Es ist davon auszugehen, dass dies den Verlust der Channelrhodopsin-2 Expression und der optogenetischen Stimulationsfähigkeit zur Folge hatte. Bereits Xiao et al. berichteten davon, dass das Myokard durch das Einstechen der Injektionsnadel verletzt wurde und eine kurzzeitige Inflammation verursachte (Xiao et al., 1996). Diese sorgte für eine Infiltration von Immunabwehrzellen in dem Bereich, wodurch eine große Wahrscheinlichkeit bestand, dass die AAVs oder deren Genprodukte als Fremdkörper wahrgenommen wurden. In der Forschungsgruppe von James Wilson (*Perelman School of Medicine an der University of Pennsylvania*) bestand die Theorie, dass ein gewisser Antigen Grenzwert notwendig sei, um eine Immunreaktion hervorzurufen (Mays and Wilson, 2011; Snyder et al., 1997). Dadurch entstand die Arbeitshypothese, dass eine niedrigere AAV-Dosis einen möglichen Schwellenwert unterschreiten könne und somit den Abbau von AAV infizierten, mCherry- und ChR2- exprimierenden Zellen verhindern könnte. Diese Hypothese wurde bei der nächsten Versuchsreihe berücksichtigt und die Virusmenge um das 10-fache auf 2×10^{10} gc herabgesetzt.

Die ersten Tiere mit niedriger AAV-Dosis wurden zwei Wochen nach der AAV-Injektion analysiert. Die Herzfrequenz von fünf der sechs Versuchstieren konnte durch Lichtimpulse kontrolliert werden. In Abbildung 15A werden die Ergebnisse des Mausherzens gezeigt, das mit den niedrigsten Lichtintensitäten stimuliert werden konnte. Die Rheobase-Werte lagen mit $0,36 \text{ mW/mm}^2$ und $0,32 \text{ mW/mm}^2$ für $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ sehr nahe beieinander. In Abbildung 15B sind die einzelnen Werte aller gemessenen Herzen mit den daraus berechneten Mittelwerten, Varianzen und Reizeit-Intensitäts-Kurven dargestellt, sofern mindestens $n = 5$ Werte pro Reizeit gemessen wurden. Dies war bei diesen Messungen für die Lichtimpulszeiten von 10 ms, 20 ms und 50 ms der Fall. Anhand der Streuung der Lichtintensitätswerte ist zu sehen, dass die Stimulierbarkeit der Herzen sehr variierte. Eine Signifikanzanalyse (gepaarter, zweiseitiger *t*-Test) zwischen den Versuchsgruppen anhand der zwei Beleuchtungsflächen zeigte, dass bei 10 ms und 20 ms ($p = 0,0155$ und $p = 0,0289$) die Vergrößerung der Fläche mit einer Verringerung der Lichtintensität einherging. Bei 50 ms ($p = 0,0692$) scheiterte der Test, doch lag der *P*-Wert sehr nah an der Signifikanzgrenze und deutete damit ebenfalls auf den Einfluss der Größe der beleuchteten Fläche hin. Für jedes gemessene Herz wurde eine Reizeit-Intensitäts-Kurve erstellt und daraus jeweils die Rheobase und Chronaxie ausgelesen (Abbildung 15C und D). Bei der Analyse der einzelnen EKGs der Mäuse wurde bei der Betrachtung der QRS-Komplexe

deutlich, dass diese sich durch die Lichtstimulationen signifikant verlängerten, wodurch die ventrikuläre Stimulation durch die Lichtreize eindeutig identifiziert und bestätigt wurden (gepaarter, zweiseitiger t -Test, Abbildung 15E, $p = 0,0225$; Abbildung 15F, $p = 0,0003$).

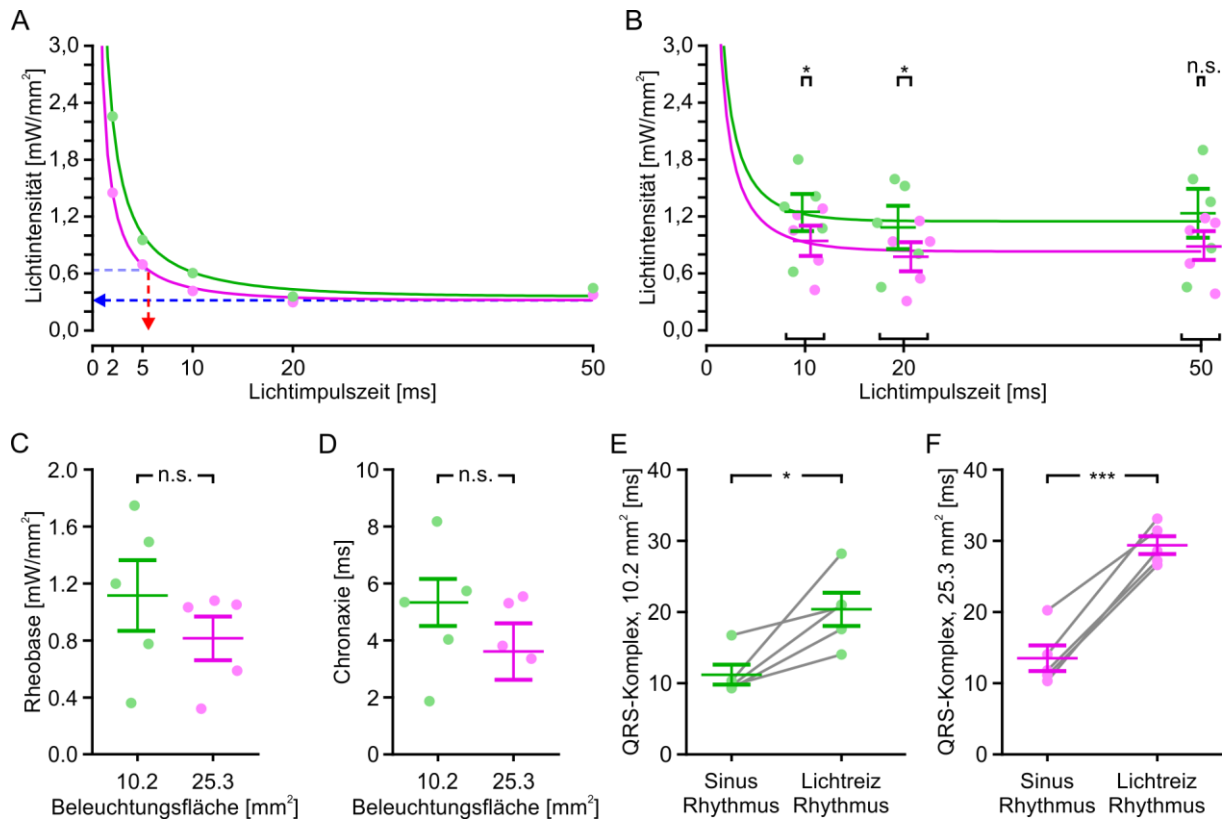


Abbildung 15: Ergebnisse der Lichtstimulationsexperimente, zwei Wochen nach lokaler Injektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChr2-mCherry

(A, B) Reizzeit-Intensitäts-Kurven wurden aus den gemessenen Stimulationswerten mit der mathematischen Lapicque-Hill Gleichung mit Origin Pro 8 errechnet. Beleuchtungsflächen: 10,2 mm² in Grün und 25,3 mm² in Magenta. (A) Experimente eines Herzens mit den am niedrigsten gemessenen Lichtintensitätswerten, für 2 – 50 ms. Blauer Pfeil deutet auf Rheobase, Roter Pfeil auf Chronaxie, der Reizzeit-Intensitäts-Kurve für 25,3 mm² Beleuchtungsfläche. (B) Einzelwerte der Experimente und Durchschnitt \pm SEM für 10 – 50 ms. (C) Rheobase- und (D) Chronaxie- Werte wurden aus den einzelnen Reizzeit-Intensitäts-Kurven ermittelt (B - D, $n = 5$). (E, F) QRS-Komplex Analyse anhand der 20 ms Lichtreize für 10,2 mm² und 25,3 mm² Beleuchtungsfläche ($n = 5$). Fehlerbalken: SEM. (B - F) gepaarter, zweiseitiger t -Test, P : * $< 0,05$, ** $< 0,001$, *** $< 0,0001$.

Die Verringerung der AAV-Dosis führte dazu, dass, zum Zeitpunkt von drei Wochen nach der AAV-Injektion, bei zwei von vier Versuchstieren die Stimulation durch kontinuierliche Lichtimpulse möglich war. Im Vergleich zueinander, wiesen die Ergebnisse der beiden Herzen große Unterschiede auf, wie in Abbildung 16 und Abbildung 17 zu sehen ist. Die Stimulationsfähigkeit des Herzens aus Abbildung 16A ist mit den Herzen vergleichbar, die bisher am besten zu stimulieren waren. Das Herz, dessen Werte in Abbildung 16B dargestellt sind, war dagegen schwieriger zu stimulieren und mit jenen Herzen vergleichbar, deren lichtinduzierte Stimulation bisher am schlechtesten funktionierte. Für die Beleuchtungsfläche 25,3 mm² konnte beim zweiten Herz keine hyperbelförmige Reizzeit-Intensitäts-Kurve berechnet werden. Die Intensitätswerte ergaben mit der Lapicque-Hill Gleichung eine Gerade

parallel zur X-Achse. Entsprechend konnten keine Chronaxie-Werte für diese Messdaten bestimmt werden. Bei den Herzen, die eine optische Stimulation ermöglichten, wiesen die Analysen der EKGs eine Verlängerung der QRS-Komplexe auf. Dies war bei beiden Herzen für beide Beleuchtungsflächen der Fall.

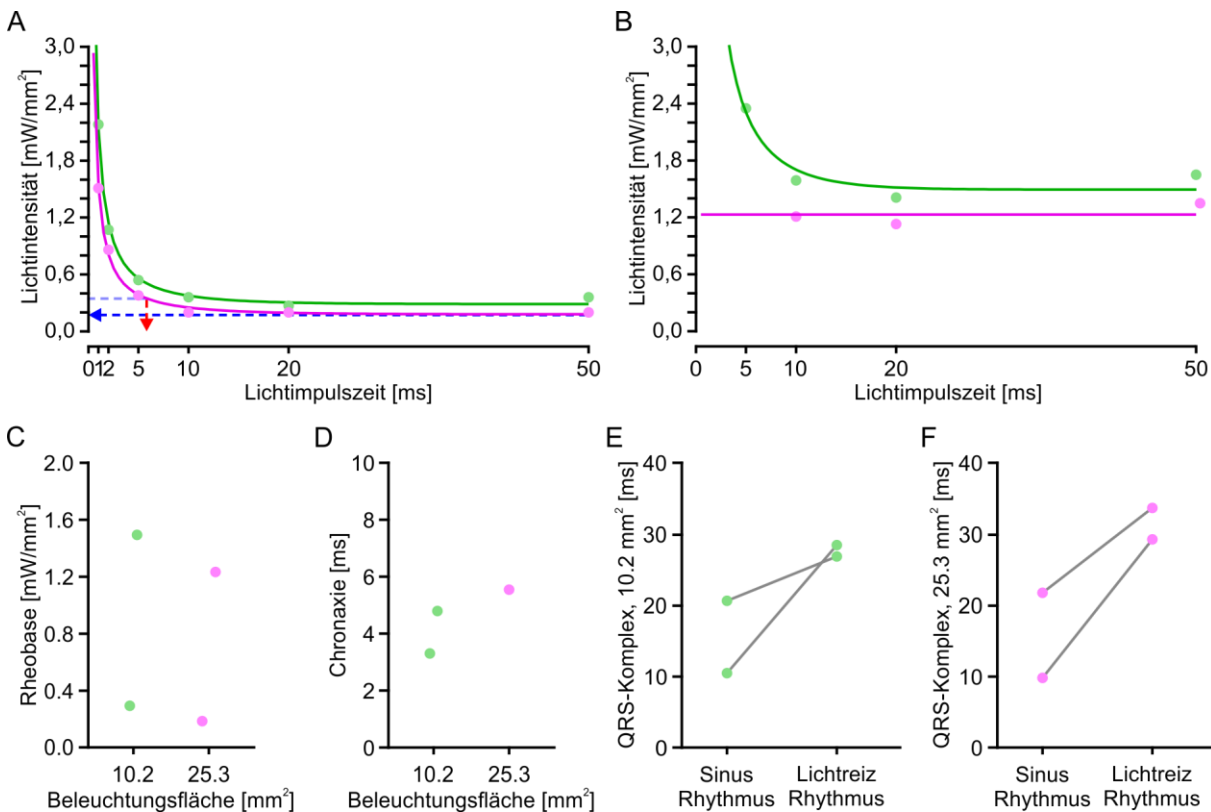


Abbildung 16: Ergebnisse der Lichtstimulationsexperimente, drei Wochen nach lokaler Injektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

(A, B) Reizzeit-Intensitäts-Kurven wurden aus den gemessenen Stimulationswerten mit der mathematischen Lapicque-Hill Gleichung mit Origin Pro 8 errechnet. Beleuchtungsflächen: 10,2 mm² in Grün und 25,3 mm² in Magenta. (n = 2) (A) zeigt die Ergebnisse des einen Mausherzens, (B) die des anderen. Blauer Pfeil deutet auf Rheobase, Roter Pfeil auf Chronaxie, der Reizzeit-Intensitäts-Kurve für 25,3 mm² Beleuchtungsfläche hin. (C) Rheobase- und (D) Chronaxie- Werte wurden aus den einzelnen Reizzeit-Intensitäts-Kurven ermittelt. (E, F) QRS-Komplex Analyse anhand der 20 ms Lichtreize für 10,2 mm² und 25,3 mm² Beleuchtungsfläche. (C – F, n = 2).

Wie das Balkendiagramm in Abbildung 17A verdeutlicht, führte die Reduzierung der AAV-Dosis zu einer einwöchigen Verlängerung der lichtinduzierten Herzschrittmarkerfunktion. Die zwei Versuchstiere, die vier Wochen nach der AAV-Injektion auf ihre Lichtstimulationsfähigkeit getestet wurden, zeigten keinerlei Stimulierbarkeit, selbst bei Lichtimpulsen mit maximaler Intensität. Daher wurden keine weiteren Versuchsreihen nach diesem Zeitraum durchgeführt.

Die Ergebnisse der mCherry Fluoreszenz Intensitätsanalyse spiegelten die Lichtstimulationsergebnisse wider, wie in Abbildung 17B zu sehen. Herzen, die stimulierbar waren wiesen eine deutliche mCherry Fluoreszenz auf. Es zeigte sich, dass bei 1000 a.u. (*arbitrary units*) eine imaginäre Grenze gezogen

werden konnte (Abbildung 17B, gestrichelte, graue Linie). Sieben der acht Herzen (87,5 %), die über dieser Grenze lagen konnten durch die Lichtreize stabil gepaced werden. Dagegen waren die vier Herzen, die unter der imaginären Grenze von 1000 a.u. lagen, nicht stimulierbar. Ein Herz, mit einem mCherry Fluoreszenzwert von 2432 a.u., erwies sich trotz deutlicher mCherry Expression als nicht stimulierbar. Technische Fehlerquellen wurden während des Experiments ausgeschlossen und die Maus zeigte keinerlei Gründe für ein Stimulationsversagen.

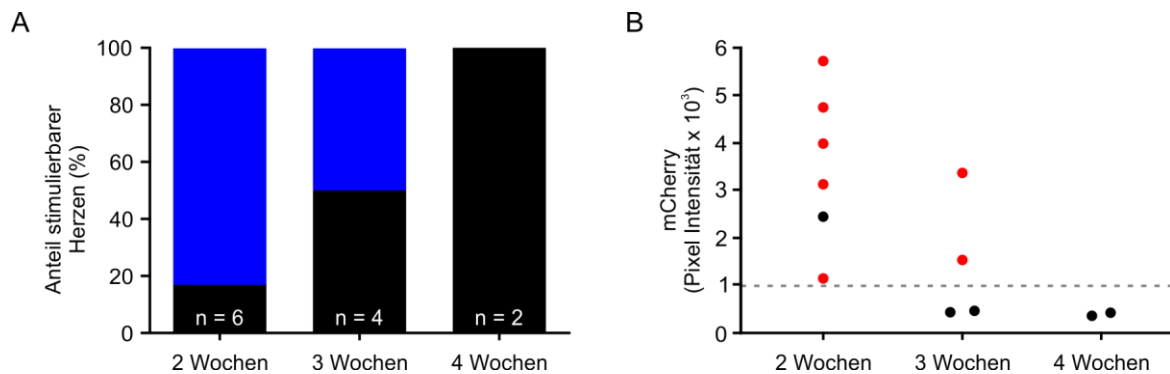


Abbildung 17: Übersicht der analysierten Mausherzen nach lokaler Infektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChr2-mCherry (A) Anzahl der untersuchten Mäuse, weiße Schrift. Blau: mit Licht stimulierbare Mausherzen, Schwarz: Mausherzen die keine Lichtrezeptivität zeigten. (B) Analyse der mCherry Intensität, Einheit a.u. (*arbitrary units*). Rote Punkte: mit Licht stimulierbare Mausherzen, Schwarz: Mausherzen die keine Lichtsensitivität zeigten. Graue Linie: imaginäre Lichtsensitivitätsschwelle.

Die histologische Analyse der Herzen, die mit 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChr2-mCherry behandelt wurden, zeigte wie bei den Herzen mit dem 10-fach höheren AAV-Dosis eine deutliche Infiltration von weißen Blutkörperchen. Dies ist deutlich in den Fluoreszenzbildern eines zweiwöchigen (Abbildung 18A) und eines dreiwöchigen (Abbildung 18B) Herzens durch CD45 Signale ersichtlich. Inmitten dieser CD45 Signale sind bei beiden Herzen rote mCherry Signale sichtbar, da die exemplarischen Organschnitte von Herzen stammen, die durch Licht stimulierbar waren. In den Folgeschnitten (Abbildung 18D und E) wurden deckungsgleich zu den CD45 Signalen, Häufungen von blaufärbten Zellkernen nachgewiesen, wodurch die unüblich hohe Anzahl von einzelnen Zellen bestätigt wurde. Abbildung 18G und H zeigen Folgeschnitte dieser Herzen mit Pikro-Siriusrot Färbung, in denen die Myokarde der Herzen eine für Fibrose typische Färbung haben. Von dem Herz aus der vierten Woche, dessen Herzschnitte in Abbildung 18C, F und I dargestellt sind, konnten keine Organschnitte von der Virusinjektionsstelle gemacht werden. Bei beiden Herzen dieser Messreihe war das Gewebe an diesen Stellen atrophiert und damit so dünn, dass es beim Schneiden riss und somit nicht aufgenommen werden konnten. Die hier gezeigten Schnitte sind aus der Ventrikel Region und präsentierten einen sehr großlumigen Ventrikel mit einem sehr dünnen Myokard. Die Fluoreszenzaufnahme dieses Herzens weist weder CD45 noch mCherry Signale vor. Es ist lediglich eine sehr hohe Dichte von Hoechst Signalen in den sehr dünnen Bereichen der Herzwand sichtbar. Diese Bereiche mit vermehrter Anzahl

an Zellkernen sind auch in der HE Färbung wiedererkennbar. Die Piko-Siriusrot Färbung zeigt bei diesem Herz keine tiefroten-pinken Bereiche, wie vergleichsweise bei bisherigen Herzen. Die schmale Seite der Herzwand ist deutlich roter als das gegenüberliegende breitere Myokard und zeigt somit stark fibrotisches Gewebe, wie es auch bei einem Infarkt der Fall wäre.

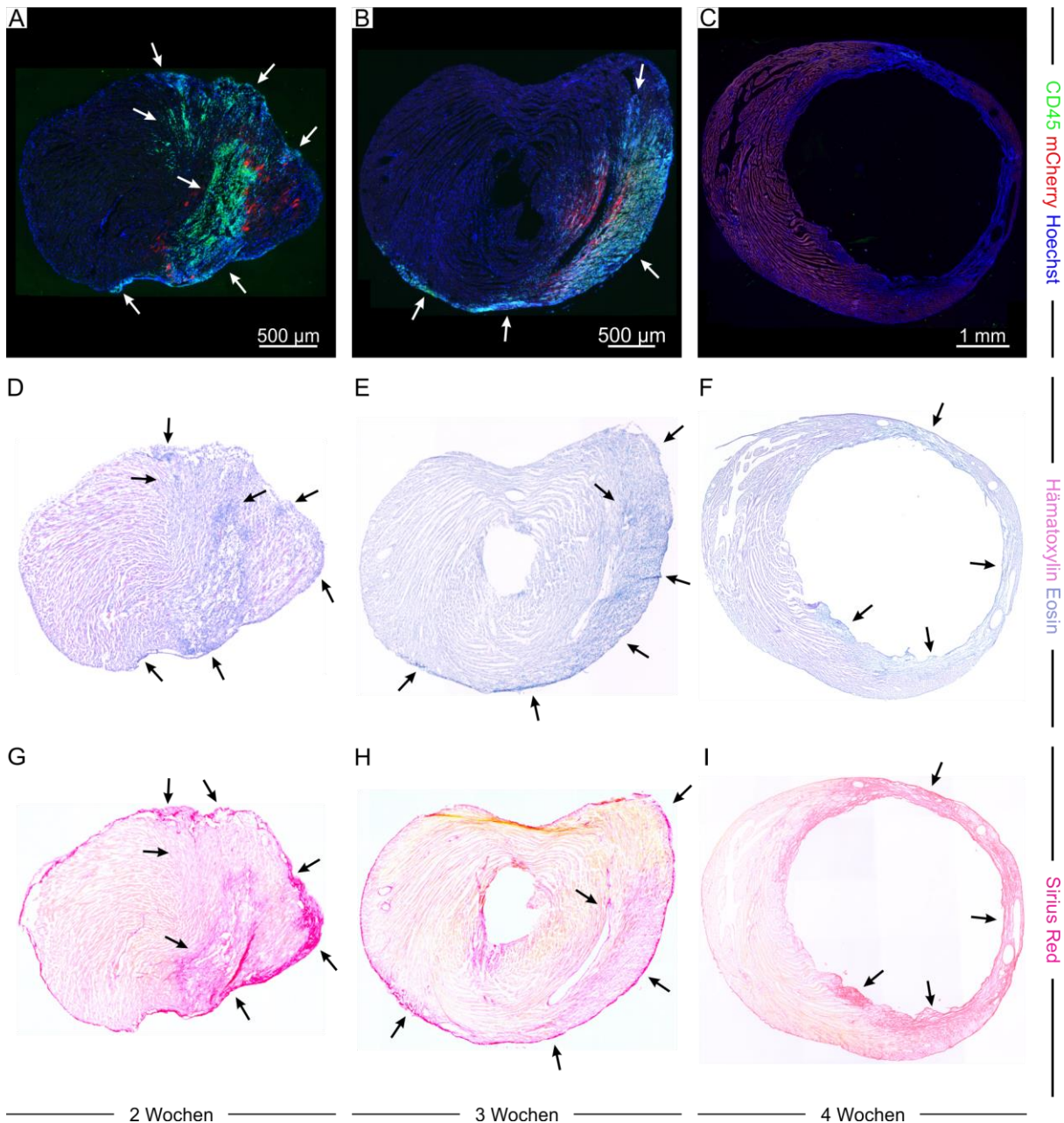
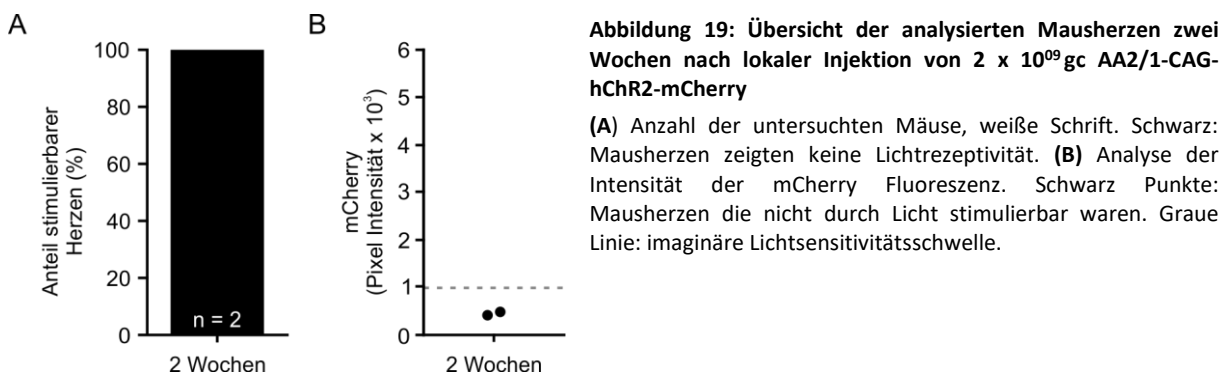


Abbildung 18: Immunzellinfiltration nach Injektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChr2-mCherry

(A – C) Fluoreszenzaufnahmen mit CD45 (grün), mCherry (rot) und Zellkernfärbung Hoechst (blau). Weiße Pfeile deuten auf Bereiche mit hoher CD45 Markierung. (D – E) HE-Färbungen, mit blauer Zellkernfärbung (Hämatoxylin) und rosa/roter Zellplasmaproteinfärbung (Eosin). Schwarze Pfeile deuten auf Bereiche mit hoher Anzahl an Zellkernen. (G – I) Piko-Siriusrot Färbungen mit Kollagenfasern (pink), Muskelfasern und Zytoplasma (gelborange). Schwarze Pfeile deuten auf Bereiche mit viel Fibrose. (A, D, G) Folgeschnitte eines Mauserherzens aus der zweiten Analysewoche. (B, E, H) Folgeschnitte eines Mauserherzens aus der dritten Analysewoche. (C, F, I) Folgeschnitte eines Mauserherzens aus der vierten Analysewoche.

4.1.5 Analyse nach lokaler Injektion von 2×10^{09} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

Die Verdünnung des Virusvektors auf 2×10^{10} gc verlängerte erfolgreich die Lichtstimulationsfähigkeit der Mausherzen auf drei Wochen nach der Injektion. Dennoch war der Schwellenwert der AAV-Menge punktuell immer noch so hoch, sodass nach drei Wochen 50 % und nach vier Wochen 100 % der Herzen starke Infiltrationen von weißen Blutkörperchen und Fibrose zeigten und nicht mehr durch Licht stimuliert werden konnten. Daher führten wir eine weitere Testreihe durch und injizierten 2×10^{09} gc AAVs in zwei Mäuse. Zwei Wochen nach der Injektion wurden die *in vivo* Analysen der Herzen durchgeführt und es konnte selbst bei maximaler Lichtintensität keine Stimulation nachgewiesen werden (Abbildung 19A). Fluoreszenzmessungen für mCherry bestätigten, dass diese bei beiden Herzen sehr niedrig und unter dem bisher festgelegten Schwellenwert lagen, der eine ausreichende Menge an ChR2 Konzentration bedeutete (Abbildung 19B).



Die niedrige mCherry Expression wurde in den histologischen Untersuchungen bestätigt, wie in der exemplarischen Fluoreszenzaufnahme (Abbildung 20A) zu sehen. Im Bereich der roten Signale waren wenige konzentrierte CD45 positive Zellen nachzuweisen, wobei die Fläche dieser Signale im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen kleiner war. In Abbildung 20B konnte eine Anhäufung von blau gefärbten Zellkernen, die deckungsgleich zu den CD45 Signalen waren nachgewiesen werden. Die Pikro-Siriusrot Färbung zeigte die Fibrose des Muskelgewebes im Bereich der CD45 Signale und der blauen Zellkerne (Abbildung 20C).

Die Verdünnung des AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry auf 2×10^{09} gc führte zu einer lokalen Expression des Fusionsproteins. Die Expressionsstärke von ChR2 war für eine durch Licht angeregte Stimulation zu gering. Eine stabile Expression von ChR2, die eine kontinuierliche Stimulation der Herzen ermöglichte, wurde durch die niedrigere VAAV-Dosis nicht erreicht. Trotz der geringen Menge von AAVs wurde punktuell eine Immunreaktion ausgelöst, die zu Fibrose im Herzmuskel führte.

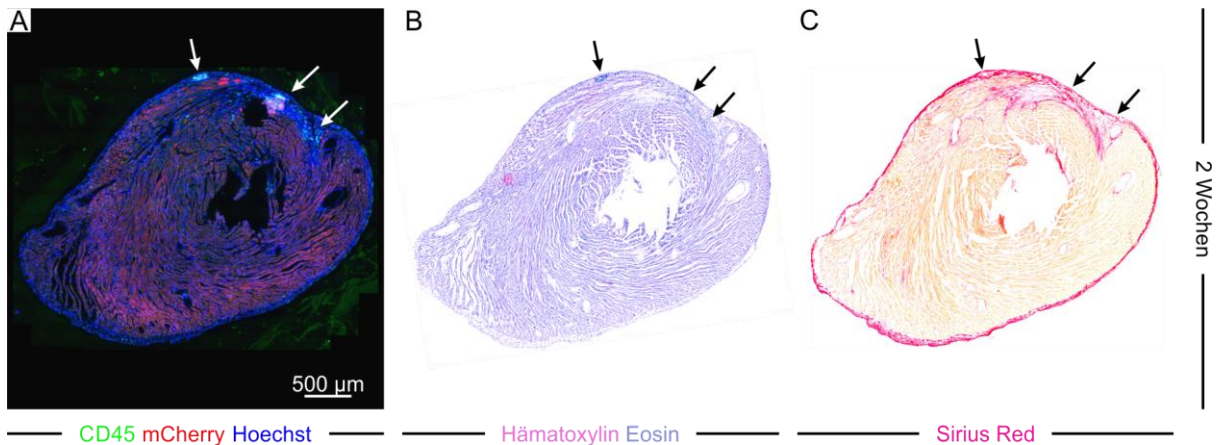


Abbildung 20: Immunzellinfiltration nach Injektion von 2×10^9 gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

(A) Fluoreszenzaufnahme mit CD45 (grün), mCherry (rot) und Zellkernfärbung Hoechst (blau). Weiße Pfeile deuten auf Bereiche mit hoher CD45 Markierung. (B) HE-Färbung, mit blauer Zellkernfärbung (Hämatoxylin) und rosa/roter Zellplasmaproteinfärbung (Eosin). Schwarze Pfeile deuten auf Bereiche mit hoher Anzahl an Zellkernen. (C) Pikro-Siriusrot Färbung mit Kollagenfasern (pink), Muskelfasern und Zytoplasma (gelborange). Schwarze Pfeile deuten auf Bereiche mit viel Fibrose. (A, B, C) Folgeschnitte eines Mauserzens.

4.1.6 Kontrollversuch durch lokale Injektion von 10 µl PBS-Lösung

Die Experimente, den Virusvektor AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry durch eine lokale Injektion in das Myokard zu platzieren um dort eine Transduktion der Herzmuskelzellen zur Expression von Channelrhodopsin-2 zu erreichen, waren erfolgreich. Eine Herzschrittmacherfunktion durch Lichtimpulsstimulation war bei 2×10^{11} gc und 2×10^{10} gc möglich, wobei die Verringerung der AAV-Last sich positiv auf die Expressionsdauer auswirkte. Die Injektion von 2×10^9 gc ergab jedoch eine unzureichende Expressionsstärke von ChR2, womit keine optische Stimulation möglich war.

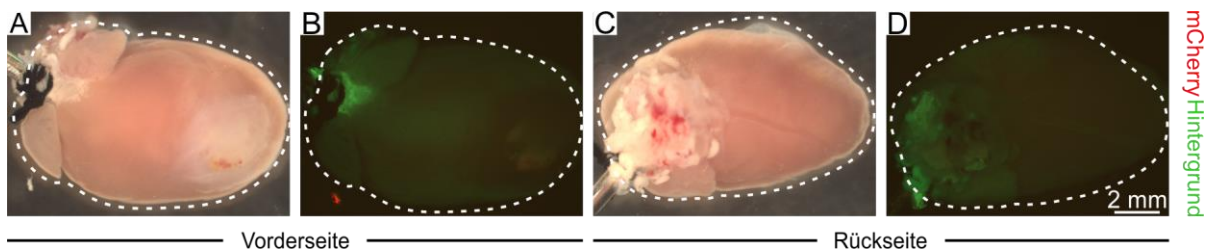


Abbildung 21: Makroskopische Aufnahmen nach lokaler Injektion von 10 µl PBS-Lösung in der Nähe des Apex – Kontrollexperiment

(A, B) Vorderseite und (C, D) Rückseite des Herzens. (A, C) Hellfeld- und (B, D) Fluoreszenzaufnahmen. Es ist kein rotes mCherry Signal neben dem grünen Hintergrundsignal vorhanden.

In allen histologischen Analysen der lokalen Injektionen mit AAVs wurden Infiltrationen von Immunzellen beobachtet, gefolgt von Fibrose der Herzmuskeln. Ob die AAVs trotz ihrer niedrigen Immunogenität, laut Literatur (Williams et al., 2010), allein dafür verantwortlich sind, oder ob der Einstich durch die Injektionsnadel eine Entzündung hervorruft, welche die Immunsensitivität gegenüber der AAV oder dem exprimierenden Protein hChR2-mCherry herabsetzt ist unklar (Xiao et

al., 1996). Daher wurde als Kontrolle eine Testreihe durchgeführt mit 10 µl 0,9 %iger PBS-Lösung anstatt der Virusvektorlösung. Zwei Wochen nach der lokalen Injektion wurden die Mäuse euthanasiert, die Herzen entnommen und untersucht. Abbildung 21A zeigt in der makroskopischen Hellfeldaufnahme exemplarisch die Vorderseite eines der untersuchten Herzen. Das weiße Gewebe im Bereich der Einstichstelle deutet auf Fibrose hin. Die weiteren Aufnahmen zeigen keine weiteren Verletzungen oder Fehlentwicklungen des Organs.

In Abbildung 22 werden die histologischen Färbungen von vier Schnittebenen dieses Herzens exemplarisch dargestellt. Die Fluoreszenzaufnahmen weisen wie zu erwarten keine mCherry Signale auf. Die CD45 Signale für infiltrierende Immunzellen sind deutlich zu sehen. Die HE-Färbungen zeigen im Bereich der Einstichstelle eine große Anzahl an Zellkernen. Diese sind, durch die Pikro-Siriusrot Färbung zugeordnet, im Bereich des fibrotischen Gewebes (schwarze Pfeile). Dadurch zeigt sich, dass bereits durch Einstichverletzungen und PBS Injektionen starke Gewebeveränderungen mit Immunantwort und Schädigung des Herzmuskels stattfanden.

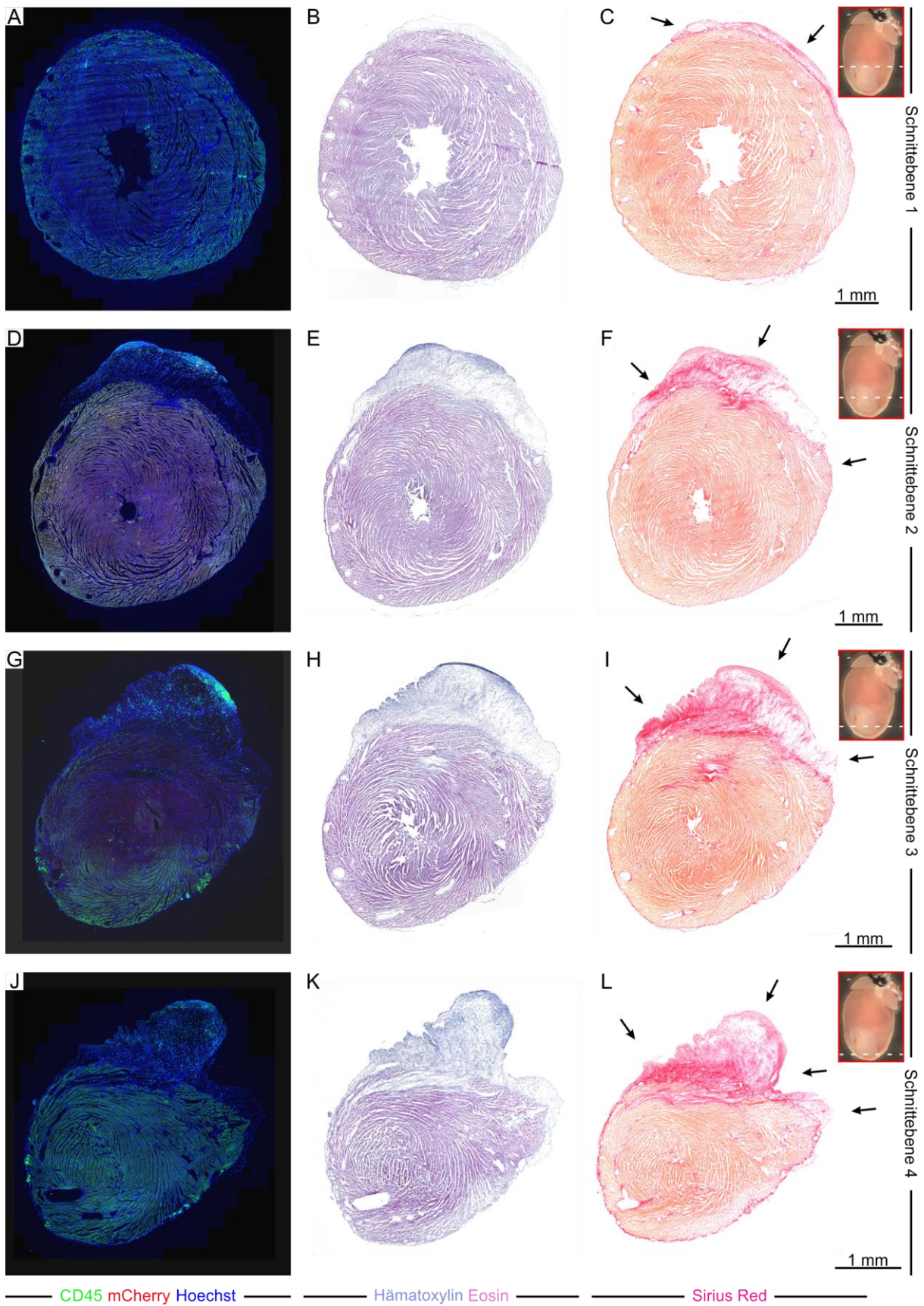


Abbildung 22: Histologische Analyse nach lokaler Injektion von 10 μ l PBS in der Nähe des Apex

(A, D, G, J) Fluoreszenzaufnahmen mit CD45 (grün), mCherry (rot) und Zellkernfärbung Hoechst (blau). (B, E, H, K) HE-Färbungen, mit blauer Zellkernfärbung (Hämatoxylin) und roter Zellplasmaproteinfärbung (Eosin). (C, F, I, L) Piko-Siriusrot

Färbung mit Kollagenfasern (pink), Muskelfasern und Zytoplasma (gelborange). Rote Box, lichtmikroskopisches Bild des Herzens. Weiße gestrichelte Linie zeigt die jeweilige Schnittebene an. Schwarze Pfeile deuten auf Bereiche mit viel Fibrose.

4.2 Systemische Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry

Der Transport von Adeno-assoziierten Virusvektoren durch eine lokale Injektion in den Herzmuskel, wirkte sich für die Expression von Channelrhodopsin-2 in Kardiomyozyten positiv aus. Diese Methode aktivierte das Immunsystem der Versuchstiere, sodass innerhalb weniger Wochen die lichtsensitiven Zellen des Myokards eliminiert wurden und sich stattdessen fibrotisches Gewebe bildete. Mehrfaches Verringern der AAV-Dosis verlängerte die Dauer der Expression von ChR2 und die Stimulierbarkeit der Herzen, aber führte schlussendlich zum gleichen Ergebnis. Ebenso zeigten Kontrollversuche mit lokaler Injektion von physiologischer Saline (PBS) ohne AAV eine ähnliche Immunreaktion (Kapitel 4.1).

Eine alternative Darreichungsform stellte die systemische Injektion des Virusvektors über die Blutbahn dar, für die ein anderer AAV Serotyp gewählt wurde, da AAV1 laut Literatur bei systemischer Gabe eine sehr niedrige myokardiale Expressionsstärke des gewünschten Gens ermöglichte (Pacak et al., 2006). In Vergleichsstudien zeigte AAV Serotyp 9, als rekombinanter Virusvektor AAV2/9, eine deutliche Überlegenheit gegenüber den anderen Transportvektoren AAV1-8 hinsichtlich der Intensität und Dauer der Expression (Zincarelli et al., 2008). Dies galt insbesondere für die Expression in Kardiomyozyten, da bei der Integration des *LacZ* Gens neben einer hohen Intensität, eine gleichmäßige Verteilung im gesamten Herz erzielt wurde.

Für die systemischen Injektionsversuche wurden wie bei der direkten Injektion zehn Wochen alte CD-1 WT (Wildtyp) Weibchen verwendet. Die Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry erfolgte unter Anästhesie durch einen Hautschnitt am Hals und der Punktion der linken Halsvene (Vena jugularis) (Kapitel 3.8.2). Nach Schließung der Halswunde wurden die Tiere bis zur Untersuchung im Tierstall untergebracht. Wie zuvor bei der direkten Injektion, wurden Expression und optogenetischer Aktivität des Fusionsproteins nach mehreren Inkubationszeiträumen überprüft.

4.2.1 Histologische Betrachtung der mCherry Expression einen Monat nach systemischer Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry

Die Mäuse erhielten AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry durch eine systemische Injektion in die Vena jugularis. Durch diese Injektionsmethode sollte die Immunantwort, die in den lokalen Injektionsversuchen beobachtet wurde, verringert werden. Abbildung 23 zeigt exemplarisch ein Mausherz einen Monat nach systemischer Injektion mit AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry. Die Wahl des Zeitpunkts, von 4 Wochen nach der Injektion, sollte verdeutlichen, wie intensiv die Expression über das gesamte Herz hinweg war, selbst nach diesem Zeitraum. Der systemische Injektionsweg über die Blutbahn ermöglichte damit eine länger andauernde Expression über eine größere Fläche des Myokards als die lokale Injektionsmethode (Ergebnisse in Kapitel 4.1).

Die makroskopischen Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 23B und C zeigen die organweite Expression des mCherry-Proteins, wobei auffällig ist, dass das Expressionsmuster nicht homogen war. Die mikroskopischen Aufnahmen bestätigten, dass nicht alle Kardiomyozyten mCherry exprimierten und die exprimierenden Zellen in Gruppen nah beieinander lagen (Abbildung 23D – F). Die α -Actinin Färbung bestätigte, dass es sich bei den mCherry exprimierenden Zellen um Kardiomyozyten handelte (Abbildung 23D – F). Die Eigenschaft des ChR2 als integrales Membranprotein führte zu einer membranständigen Position des Fluoreszenzproteins mCherry, wodurch dessen Expression ausschließlich an der Zellmembran und somit in den Membraninvaginationen der T-Tubuli lokalisiert war (Abbildung 23F, rot).

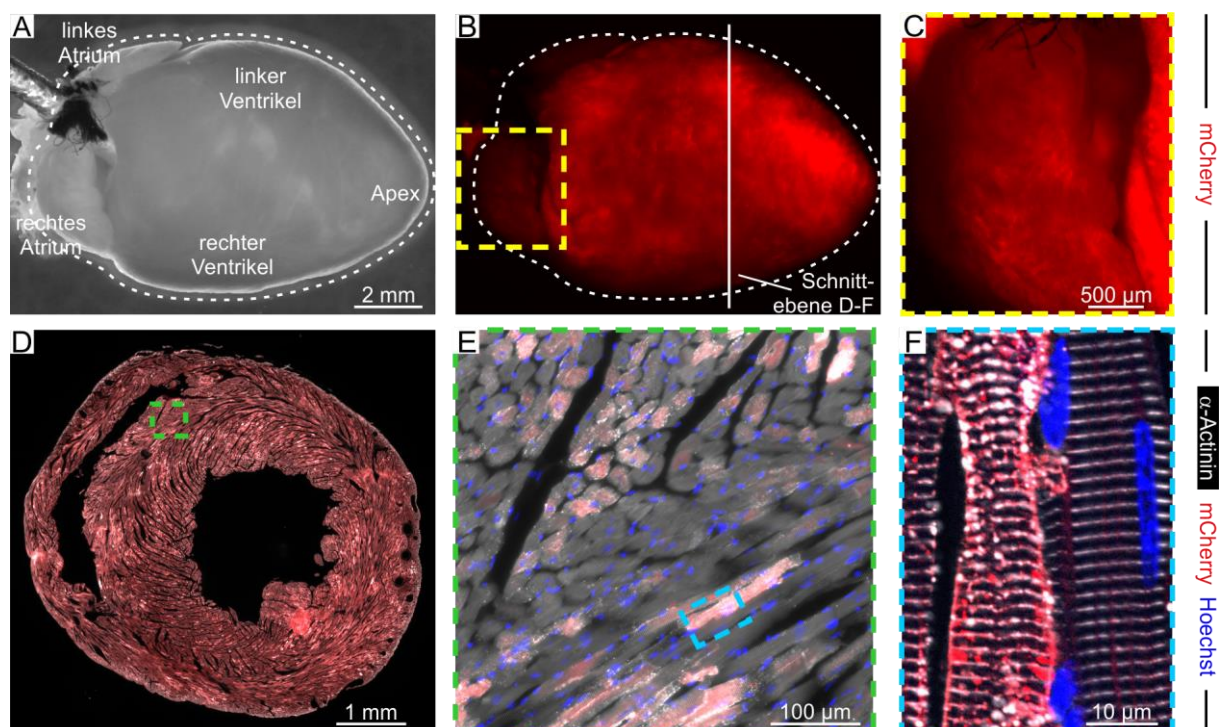


Abbildung 23: Systemische Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry über die Vena jugularis

(A) Durchlicht- und (B) Fluoreszenzaufnahmen und (C) Vergrößerung des in (B) gelb markierten Bereich des Herzens. (D – F) Histologischer Herzschnitt vom in (A – C) abgebildeten Mauserz. α -Actinin in Weiß, mCherry Fluoreszenz in Rot, Hoechst Färbung in Blau. (D) Vollständiger Querschnitt. (E) Vergrößerung des grün markierten Bereichs in (D). (F) Vergrößerung des blau markierten Bereichs in (E).

4.2.2 Nachweis von lichtaktivierten Aktionspotentialen und des Photostroms bei isolierten Kardiomyozyten von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry transduzierten Mauserzen

Die lichtinduzierte Beeinflussung der Muskelzellenkontraktion wurde an isolierten Kardiomyozyten mittels Patch Clamp Analysen analysiert (Kapitel 3.9.1). Zwei Monate nach der Injektion des AAV Virus wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation euthanasiert, ihre Herzen explantiert, dissoziiert und die Kardiomyozyten isoliert (Kapitel 3.8.6). Zunächst wurden die isolierten Zellen licht- und

fluoreszenzmikroskopisch überprüft, ob sie die typische, rechteckige Form isolierter, adulter Kardiomyozyten hatten und durch die rekombinanten Adeno-assoziierten Virusvektoren transduziert waren und somit mCherry exprimierten (Abbildung 24A).

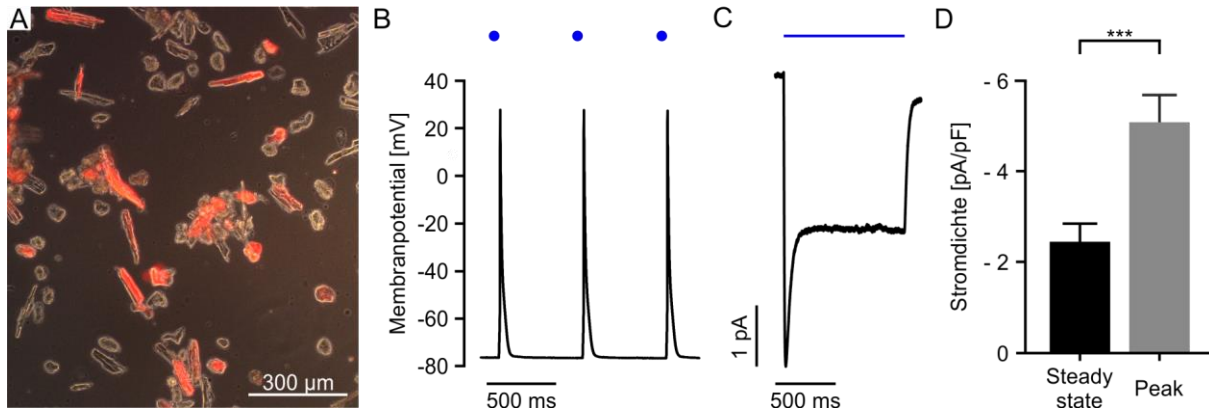


Abbildung 24: Isolierte Kardiomyozyten transduzierter Herzen.

(A) Lichtmikroskopische Aufnahme einzelner dissoziierter Kardiomyozyten aus einem transduzierten Mauserherz mit Überlagerung des mCherry Fluoreszenzsignals. (B) Repräsentatives Beispiel von lichtaktivierten (blaue Punkte: 1 ms, 5 mW/mm²) Aktionspotentialen in mCherry positiven Kardiomyozyten. (C) Blaues Licht (blauer Linie: $\lambda = 470$ nm, 5 mW/mm²) induziert Einwärtsstrom. (D) Statistische Analyse von Peak und Steady state der Chr2-induzierten Stromdichte (n = 10 Zellen von insgesamt drei Mäusen). Fehlerbalken: SEM < 0,0001.

Die zytologischen Analysen ergaben, dass durchschnittlich $58,2 \pm 6,5$ % (n = 5) der Kardiomyozyten durch die systemische Injektion von AAV2/9-CAG-hChr2-mCherry mCherry positiven waren (Kapitel 4.2.3). Lichtreize von 1 ms Dauer und 5 mW/mm² Intensität konnten in diesen dissoziierten mCherry positiven Kardiomyozyten Aktionspotentiale auslösen (Abbildung 24B). Das in diesen Zellen gemessene Ruhemembranpotential lag bei $-69,2 \pm 2,6$ mV (n = 5), wie für adulte Kardiomyozyten üblich und zeigte dadurch keine Abweichungen durch die Expression des hChr2-mCherry Proteins oder der AAV Transduktion. Der Chr2 Photostrom wurde im *voltage clamp* Modus mit einem konstanten Haltepotential von -52,1 mV gemessen und zeigte den initialen Einwärtsstrom („Peak“), der anschließend auf ein konstantes Niveau abfiel („Steady State“) (1 ms, 5 mW/mm², Abbildung 24C). Zwischen den *Peak* und *Steady state* Ionenströmen wurde ein deutlicher Unterschied festgestellt (Abbildung 24D, n = 10, P < 0,0001), was zu den biophysikalischen Eigenschaften von Chr2 passt.

4.2.3 Übersicht der optischen Stimulationsexperimente und der mCherry Expressionsanalyse nach systemischer Injektion von AAV2/9-CAG-hChr2-mCherry

Die Methode der systemischen Injektion ermöglichte die Transduktion von Kardiomyozyten durch AAV2/9-CAG-hChr2-mCherry in allen Bereich des Herzens (Abbildung 23). Die systemisch AAV infizierten Mäuse wurden analysiert, um zu sehen, ob eine durch Licht erregte Stimulation deren

Herzen möglich war (Abbildung 25B). Die optische Stimulierbarkeit der Mausherzen wurde mit 40 Lichtimpulsen, bei einer Frequenz von 30 – 50 bpm über dem intrinsischen Herzrhythmus, getestet. Es wurde untersucht ob mindestens die letzten 20 Lichtimpulse zu 100 % stimulierten Extrasystolen führten. Abbildung 25 zeigt zu allen Analysezeitpunkten von 1, 2, 8 und 16 Monate nach der Injektion, dass deutliche myokardiale mCherry Expressionen festgestellt und optische Stimulationen mit den transduzierten Herzen durchgeführt werden konnten. Die Analyse der Stimulationseffizienz folgt in den Kapiteln 4.2.4 (*in vivo*) und 4.2.5 (*ex vivo*).

In Abbildung 25A wird die Stimulierbarkeit der Herzen prozentual aufgeführt. In der einmonatigen Versuchsgruppe konnten 60 %, in der zweimonatigen 61,5 % der Herzen durch Lichtreize kontinuierlich stimuliert werden (blaue Balken). Bei der achtmonatigen Gruppe, sowie auch bei der 16-monatigen Gruppe nach der Injektion konnten alle Versuchstiere kontinuierlich optisch stimuliert werden. Alle Herzen hatten eine mCherry Expression die > 1394 a.u. (*arbitrary units*) lag (Abbildung 25B, blaue Punkte). Es ließen sich lediglich vier der zehn Herzen im ersten Monat und 5 der 13 im zweiten Monat nicht stimulieren (Abbildung 25A, schwarze Balken, Abbildung 25B, schwarze Punkte). Deren mCherry Analysen ergaben Fluoreszenzwerte die < 1100 a.u. lagen. Ähnliche Grenzwerte konnte bereits bei den Analysen der lokal transduzierten Herzen gezeigt werden (Abbildung 13B und Abbildung 17B).

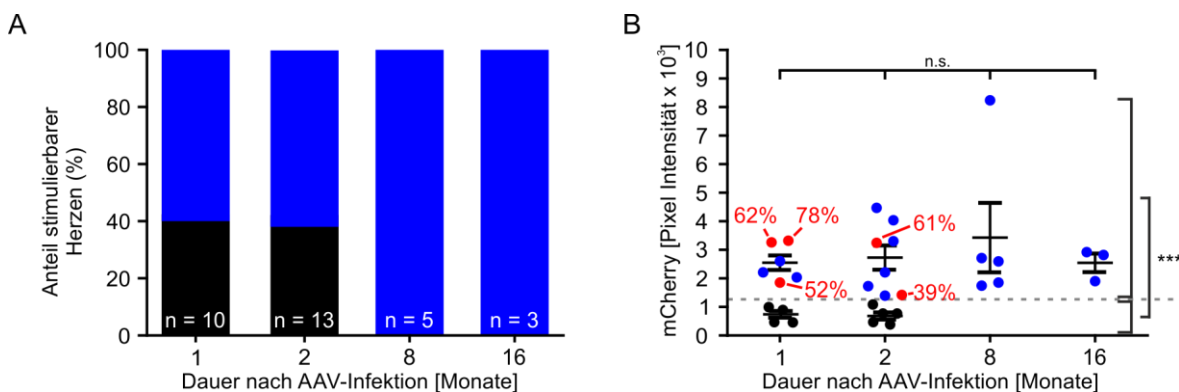


Abbildung 25: mCherry Expressionsanalysen: Stimulationsfähigkeit, Anteil mCherry positiver Kardiomyozyten

(A) Blau: Herzen, die durch Lichtreize kontinuierlich stimuliert werden konnten. Schwarz: Herzen, die nicht kontinuierlich oder gar nicht stimuliert werden konnten. (B) Blaue und Rote Punkte: optisch stimulierbare Mausherzen ($n = 22$). Rote Punkte: Herzen, die dissoziiert wurden, zum Auszählen der mCherry positiven Kardiomyozyten, Prozentangabe ($n = 5$). Schwarze Punkte: nicht stimulierbare Herzen ($n = 9$). Graue Linie: imaginäre Lichtsensitivitätsschwelle. Fluoreszenzstärke zeigte zwischen stimulierbaren Gruppen keinen signifikanten Unterschied, einfaktorielle ANOVA, $P > 0,05$. Vergleich der mCherry Intensität zwischen stimulierbaren und nicht stimulierbaren Mausherzen, ungepaarter t -Test, $P = 0,0002$. Fehlerbalken: SEM.

Ein Vergleich zwischen den Gruppen 1, 2, 8 und 16 Monaten der stimulierbaren Herzen durch eine ANOVA zeigte mit einem $P = 0,7781$, dass es keine signifikante Veränderung der mCherry Expression hinsichtlich der Dauer nach der Injektion gibt. Die Gegenüberstellung aller stimulierbaren (blau) und nicht stimulierbaren (schwarz) Herzen durch einen ungepaarten t -Test zeigte eine sehr signifikante Trennung dieser zwei Gruppen, $P = 0,0002$ (Abbildung 25B). Hiermit wurde eine klare Abgrenzung

zwischen stimulierbaren und nicht stimulierbaren Herzen anhand der Expressionsstärke von ChR2 deutlich. Dies legte die Möglichkeit nahe, die für die optische Stimulation notwendige Anzahl an genetisch veränderten Kardiomyozyten zu bestimmen. Hierzu wurden fünf stimulierbare Herzen dissoziiert (Kapitel 3.8.6) und die vereinzelt adulten Kardiomyozyten ausgezählt (Abbildung 24A, isolierte und vereinzelt mCherry positive und negative Kardiomyozyten aus einem transduzierten Herz). Es wurde ein Mittelwert von 58.2 ± 6.5 % mCherry positiven Kardiomyozyten festgestellt (rote Punkte mit Prozentangaben, Abbildung 25B). Eines der stimulierbaren Herzen wies ein sehr niedriges epikardiales Signal von 39 % positiven Kardiomyozyten auf. Im Vergleich dazu zeigten nicht stimulierbare Herzen geringfügig weniger Prozent an mCherry Fluoreszenzsignalen. Entsprechend wurde der geschätzte minimale Prozentsatz an ChR2 positiven Kardiomyozyten, der für eine kontinuierliche optogenetische Stimulation benötigt wurde, zwischen 30 % und 40 % festgelegt.

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass die Versuche der systemischen Injektion des Adeno-assoziierten Virusvektors AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry zu optisch stimulationsfähigen Herzen im Mausmodell führten. Zudem wurde eine stabile Expression des hChR2-mCherry Fusionsproteins über den gesamten Versuchszeitraum, hier bis zu 16 Monate, festgestellt. Dies war ein deutlicher Fortschritt im Vergleich zu den Ergebnissen der lokalen Injektionsversuche (siehe Kapitel 4.1).

In den Kapiteln 4.2.4 und 4.2.5 werden die unterschiedlichen Rheobase-Werte der einzelnen Versuche detailliert dargestellt, die ein Maß für die jeweilige Stimulationseffizienz der Herzen darstellen.

4.2.4 Optische Stimulation *in vivo* von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry Mausherzen

Die systemische Injektion des AAV2/9 Vektors führte zur hChR2-mCherry Expression in allen Bereich des Herzens, wie in Abbildung 23 gezeigt wurde. Bei der optischen Stimulation wurde daher neben den bisherigen Beleuchtungsflächen $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$, auch mit einer Fläche von $72,3 \text{ mm}^2$ experimentiert, wodurch die gesamte Vorderseite des Herzens beleuchtet werden konnte. Die Versuche wurden nach 1, 2, 8 und 16 Monaten durchgeführt und deren Ergebnisse in den Reizezeit-Intensitäts-Diagrammen in Abbildung 26 zusammengefasst. Über den gesamten Zeitraum hinweg konnten bei insgesamt $n = 20$ Mäuse fortlaufende optische Stimulationen *in vivo* nachgewiesen werden (Abbildung 25A). Für jede Messgruppe, die mindestens ein $n = 5$ aufwies, wurde Mittelwert und SEM berechnet und im Diagramm angegeben. Anhand der Mittelwerte wurden die entsprechenden Reizezeit-Intensitäts-Kurven der jeweiligen Beleuchtungsflächen berechnet und wie folgt dargestellt: $10,2 \text{ mm}^2$ in Grün, $25,3 \text{ mm}^2$ in Magenta und $72,3 \text{ mm}^2$ in Blau (Kapitel 3.9.2, Origin Pro 8, Lopicque-Hill Gleichung).

Die Diagramme in Abbildung 26 zeigen vergleichbare Messergebnisse mit Lichtintensitäten durchschnittlich zwischen $0,43 \text{ mW/mm}^2$ und $0,72 \text{ mW/mm}^2$ für 20 ms lange Lichtstimuli. Bei den Versuchen nach 2 Monaten ist eine deutliche Streuung mit $0,92 \pm 0,23 \text{ mW/mm}^2$ Lichtintensität im Durchschnitt ($3 \leq n \leq 8 \text{ SEM}$). Am ehesten ließen sich die Herzen durch Lichtreize mit den Beleuchtungsflächen $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ optisch stimulieren. Dennoch zeigten die Versuche mit $72,3 \text{ mm}^2$ das Potential, dass vergleichsweise weniger Lichtintensität benötigt wurde, sofern eine erfolgreiche Stimulation erzielt wurde.

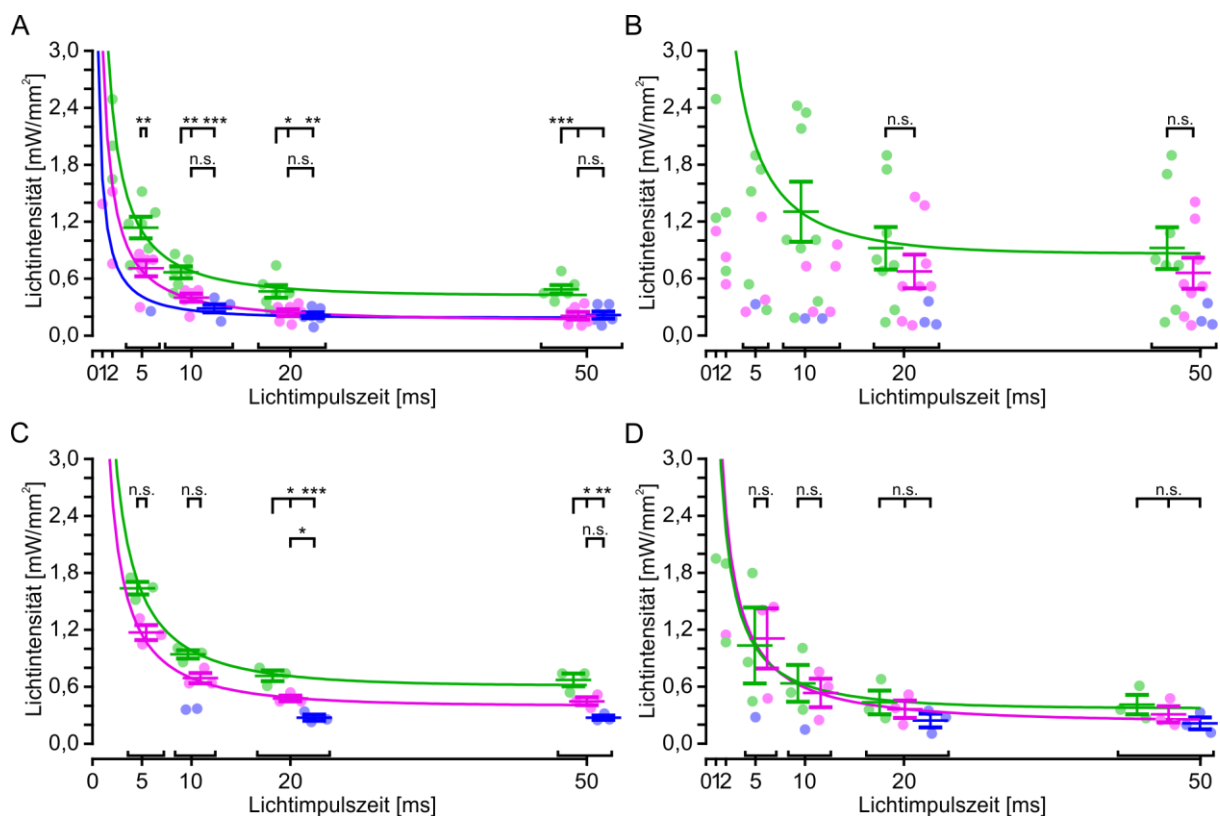


Abbildung 26: Ergebnisse der *in vivo* Lichtstimulationsversuche 1, 2, 8 und 16 Monate nach systemischer Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry

(A) 1 Monat nach Injektion ($n = 6$). (B) 2 Monate nach Injektion ($n = 8$). (C) 8 Monate nach Injektion ($n = 3$). (D) 16 Monate nach Injektion ($n = 3$). (A – D) Einzelmessdaten; Mittelwerte und Abweichungen (Fehlerbalken: SEM) wurden berechnet, sofern von allen Tieren der Messgruppe Ergebnisse vorlagen; Reizzeit-Intensitäts-Diagramme aus den gezeigten Mittelwerten durch Origin Pro 8 anhand der Lapique-Hill Gleichung errechnet. $10,2 \text{ mm}^2$ in Grün, $25,3 \text{ mm}^2$ in Magenta und $72,3 \text{ mm}^2$ in Blau. Signifikanztests zwischen 2 Gruppen wurden mit gepaarten *t*-Test durchgeführt, ab 3 Gruppen wurde eine einfaktorielles ANOVA mit Tukeys Posthoc Test verwendet, *P*: * < 0,05, ** < 0,001, *** < 0,0001.

Von den 20 optisch stimulierten Mauserzen in Abbildung 26 konnten $n = 8$ Herzen mit allen drei Beleuchtungsflächen ($10,2 \text{ mm}^2$, $25,3 \text{ mm}^2$ und $72,3 \text{ mm}^2$) kontinuierlich stimuliert werden. Aus den entsprechenden Reizzeit-Intensitäts-Kurven wurden die Rheobase- und Chronaxie- Werte pro Herz bestimmt und in Abbildung 27A und B zusammengefasst (Methode beschrieben in Kapitel 4.1.3). Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede der Datengruppen erfolgte jeweils durch eine einfaktorielles ANOVA mit Tukeys Posthoc Test.

Das Diagramm in Abbildung 27A zeigte, dass mit wachsender Beleuchtungsfläche eine Verringerung der benötigten Lichtintensität einherkam. Anhand der statistischen Analyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Datengruppen 10,2 mm² und 25,3 mm², sowie 25,3 mm² und 72,3 mm² festgestellt werden. Hinsichtlich der Vergrößerung der beleuchteten Fläche von 10,2 mm² (0,416 ± 0,08 mW mm²) zu 72,3 mm² (0,174 ± 0,03 mW mm²), $P = 0.01892$, wurde eine signifikante Abnahme der benötigten Lichtintensität nachgewiesen.

Der Vergleich der Chronaxie-Werte in Abbildung 27B zeigte zwischen den Datengruppen der unterschiedlich großen Beleuchtungsflächen keine signifikanten Unterschiede. Die Versuche wurden in der Regel immer mit 10,2 mm² beginnend in der gleichen ansteigend Reihenfolge durchgeführt. Eine deutliche Verlängerung der Chronaxie hätte auf eine Verschlechterung der optischen Stimulierbarkeit hingewiesen. Da dies nicht der Fall war konnte ein solcher Effekt ausgeschlossen werden.

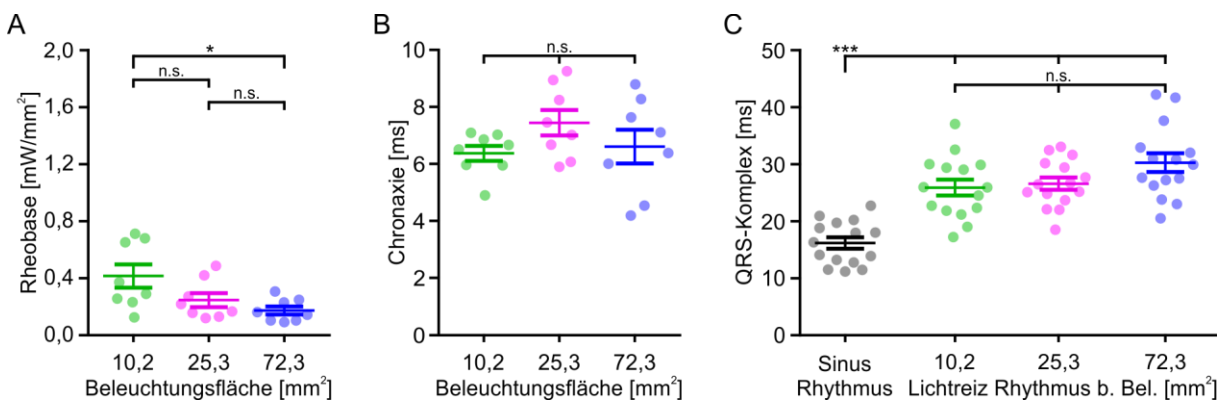


Abbildung 27: Rheobase, Chronaxie und QRS Analysen der *in vivo* Versuche in Bezug zu den Beleuchtungsflächen

(A) Rheobase und **(B)** Chronaxie von vergleichbaren Daten aus allen Versuchen von 1 – 18 Monate nach Injektion, $n = 8$. **(C)** QRS Analyse aus EKG Aufzeichnungen während Sinusrhythmus und Lichtstimulationen mit 20 ms Lichtimpulsen mit den Beleuchtungsflächen 10.2 mm², 25.3 mm² und 72.3 mm², $n = 15$. (A – C) zeigen Einzelmessdaten; Abweichungen (Fehlerbalken: SEM); Stimulationsoberfläche in Grün (10.2 mm²), in Magenta (25.3 mm²) und in Blau (72.3 mm²); Signifikanztests durch einfaktorielles ANOVA mit Tukeys Posthoc Test, P : * < 0.05, ** < 0.001, *** < 0.0001

Die QRS-Komplexe wurden bezüglich ihrer Dauer bei Sinusrhythmus und bei Lichtstimulation mit 20 ms Impulsen mit den Beleuchtungsflächen (10.2 mm², 25.3 mm² und 72.3 mm²) untersucht ($n = 15$). Die vier Datengruppen wurden durch eine einfaktorielles ANOVA mit Tukeys Posthoc Test miteinander verglichen.

Die Analyse der QRS-Komplex Dauer zeigte, dass die durch Licht stimulierten Ergebnisse alle signifikant länger waren als diejenigen die während des Sinusrhythmus aufgezeichneten Daten. Hierbei zeigte sich, dass die QRS-Komplexe der unterschiedlichen Beleuchtungsgruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.

Dieses Ergebnis spiegelte die Erfahrungen wider, welche die Untersuchungen der lokalen Injektion gezeigt hatten. Die Verlängerung der QRS-Komplexe bei optischer Stimulation wurde durch die

ventrikuläre Stimulation bewirkt, da hierdurch eine veränderte Erregungsausbreitung vom Ventrikel aus eingeleitet wurde.

In Abbildung 28A – C werden exemplarisch die Versuchsdaten mit $10,2 \text{ mm}^2$ Beleuchtungsfläche genutzt und deren Rheobase- und Chronaxie- Werte, sowie die QRS-Komplex Dauer hinsichtlich der unterschiedlich langen Infektionszeit miteinander verglichen ($3 \leq n \leq 8$, SEM). Über den gesamten Versuchszeitraum von 16 Monaten hinweg konnten keine signifikanten Verbesserungen oder Verschlechterungen in den Parametern Rheobase, Chronaxie oder QRS-Komplex Dauer festgestellt werden. Lediglich in der Versuchsgruppe zwei Monate nach der Injektion sind einige Schwankungen zu sehen. Die Qualität der Stimulierbarkeit der Herzen wurde über den gesamten Zeitraum erhalten. Da die Lebensdauer von Mäusen in Haltung zwei bis drei Jahre beträgt, zeigt die Stimulierbarkeit nach 16 Monaten das Potential für eine lebenslange Expression des hChR2-mCherry Genkonstrukts.

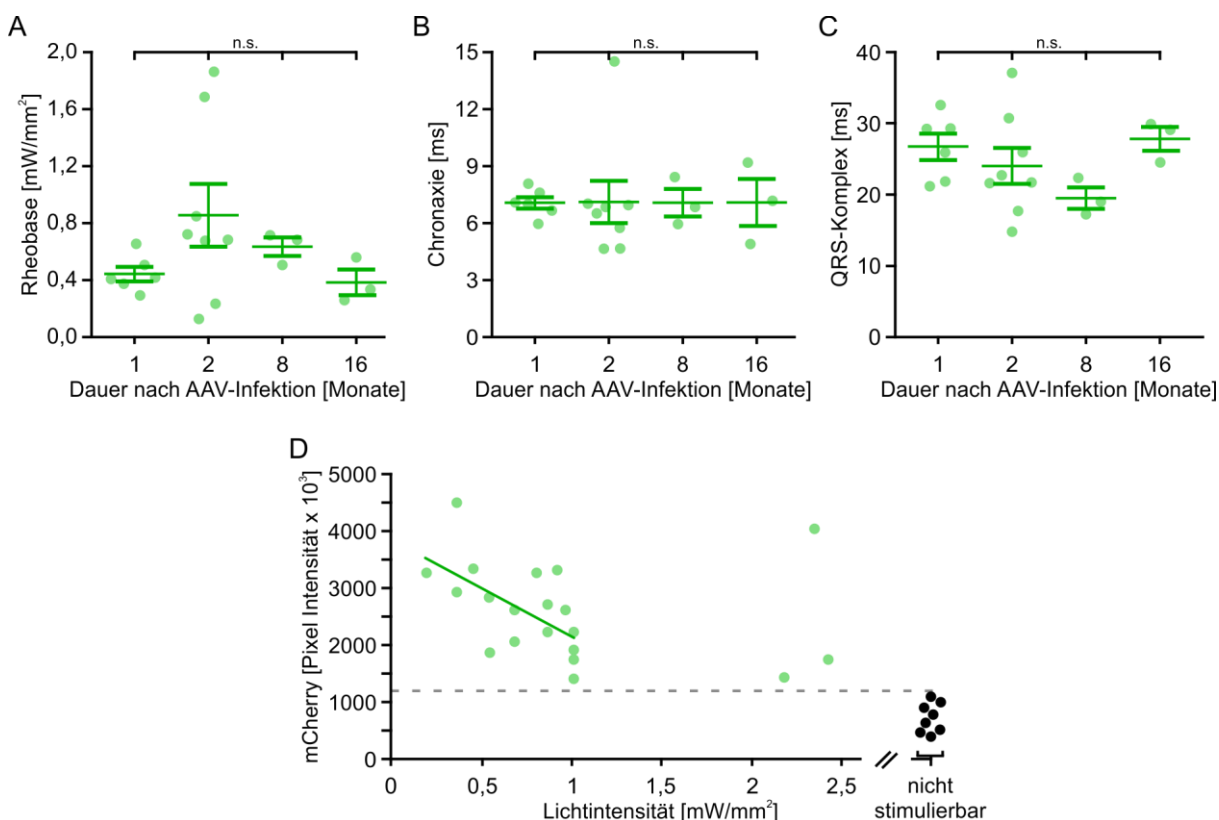


Abbildung 28: Rheobase, Chronaxie, QRS Analyse und Korrelation zwischen mCherry Fluoreszenz und minimaler Lichtintensität

(A) Rheobase, (B) Chronaxie, (C) QRS Analyse und (D) mCherry Fluoreszenz in Bezug zur benötigten Lichtintensität der *in vivo* Stimulationsversuche mit der Beleuchtungsfläche $10,2 \text{ mm}^2$. 1 Monat ($n = 6$), 2 Monate ($n = 8$), 8 Monate ($n = 3$) und 16 Monate ($n = 3$) nach der systemischen Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry. (C) QRS Analyse der 20 ms Stimulationen. (A – C) Fehlerbalken: SEM. Signifikanztests durch einfaktorielle ANOVA mit Tukeys Posthoc Test. (D) 10 ms Stimulationsversuche. Grüne Gerade zeigt Trend, $R^2 = 0,3564$, ohne die drei Werte $> 1 \text{ mW/mm}^2$. Schwarze Punkte: nicht stimulierbare Herzen ($n = 9$). Graue Linie: imaginäre Lichtsensitivitätsschwelle.

Von den in Abbildung 28A – C analysierten Herzen werden in Abbildung 28C die mCherry Fluoreszenzwerte in Bezug zu den Lichtintensitätswerten gezeigt, die für die kontinuierliche

Stimulation bei 10 ms langen Lichtreizen mit $10,2 \text{ mm}^2$ benötigt wurden ($n = 20$). Die meisten Werte finden sich zwischen $0,4 \text{ mW/mm}^2$ und $1,01 \text{ mW/mm}^2$. Bei alleiniger Betrachtung dieser Punkte kann eine moderate Korrelation $R^2 = 0,3564$ zwischen mCherry- und somit ChR2-Expression und benötigter Lichtintensität festgestellt werden (R^2 Berechnung: Microsoft Excel). Die absteigende Korrelationsgerade zeigt, dass mehr Lichtintensität benötigt wurde, sobald weniger mCherry Fluoreszenz zu messen war. In Kapitel 4.2.3, Abbildung 25 konnte bereits gezeigt werden, dass die gemessene mCherry Fluoreszenz mit der tatsächlichen hChR2-mCherry Expression in Kardiomyozyten einher ging. Wenn die Messwerte aller stimulierbarer Herzen (grün) betrachtet werden ist $R^2 = 0,0747$. Dieser Wert sagt aus, dass es keine Korrelation zwischen der mCherry Fluoreszenzintensität, bzw. der Expression des hChR2-mCherry Proteins und der zur kontinuierlichen Stimulation benötigten Lichtintensität gab. Die drei Werte, die dafür verantwortlich sind, könnten als Ausreißer betrachtet werden. Dies ist mit Vorsicht zu betrachten da möglicherweise die Position des Herzens nicht optimal war und dadurch ein Bereich des Herzens stimuliert wurde, der weniger hChR2-mCherry exprimierte. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zwischen den Lichtintensitätswerten $0,19 \text{ mW/mm}^2$ und $1,01 \text{ mW/mm}^2$ (Abbildung 28D) eine Tendenz für eine Korrelation zu sehen war. Jedoch konnte diese nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Stärke der Intensität sagte somit nichts über die Qualität der Stimulierbarkeit aus. Neun Herzen konnten selbst mit der maximalen Lichtintensität $2,69 \text{ mW/mm}^2$ nicht stimuliert werden (schwarze Punkte). Diese lagen alle unter dem geschätzten Grenzwert bei ungefähr 1100 a.u. (graue Linie).

4.2.5 Optische Stimulation *ex vivo* von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry Mausherzen am Langendorff-Apparat durch Lichtstimulation

Während der *in vivo* Analysen im vorherigen Kapitel 4.2.4 waren die Versuchstiere anästhesiert, wodurch die Versuchsparameter lebensnahe Situationen darstellten. Der Organismus der Mäuse konnte dabei noch immer hormonell auf äußere Einflüsse reagieren, da die Herzen weiterhin durch Blut und Nährstoffe versorgt wurden. Zudem waren die Herzen durch die Blutgefäße an ihren Positionen verankert und bei geöffnetem Brustkorb nur atrial, septal und linksventrikulär optisch stimulierbar. Es stellte sich hierbei die Frage, ob die Ergebnisse der *in vivo* Versuch das volle Potential der transduzierten Herzen widerspiegeln. Hierzu wurden die Herzen nach den *in vivo* Experimenten explantiert und an einen sogenannten Langendorff-Apparat angeschlossen (Kapitel 3.8.4 und 3.8.5). Hierin wurden sie durch retrograde Perfusion von oxygenierter, physiologischer Lösung durch die Aorta künstlich am Leben gehalten und konnten so unter dem Makroskop mit LED optisch stimuliert werden. Beim Versuch erfolgte die EKG-Ableitung des Herzens über eine Elektrode an der Aorta und einem kleinen Löffel, auf dem das Herz zur stabilen Positionierung aufgelegt war. Ähnlich wie bei den

in vivo Versuchen wurde für ein Stimulationsexperiment das Herz mit 40 konsekutiven Lichtreizen beleuchtet, deren Frequenz 20 – 30 bpm über dem Sinusrhythmus lag. Dies wurde für die Beleuchtungsflächen 10,2 mm², 25,3 mm² und 72,3 mm² und den Lichtimpulszeiten 1 ms, 2 ms, 5 ms, 10 ms, 20 ms und 50 ms mit unterschiedlichen Lichtintensitäten so lange wiederholt, bis die jeweils niedrigste Lichtintensität bekannt war, bei welcher mindestens die letzten 20 Lichtsignale zu Extrasystolen führten.

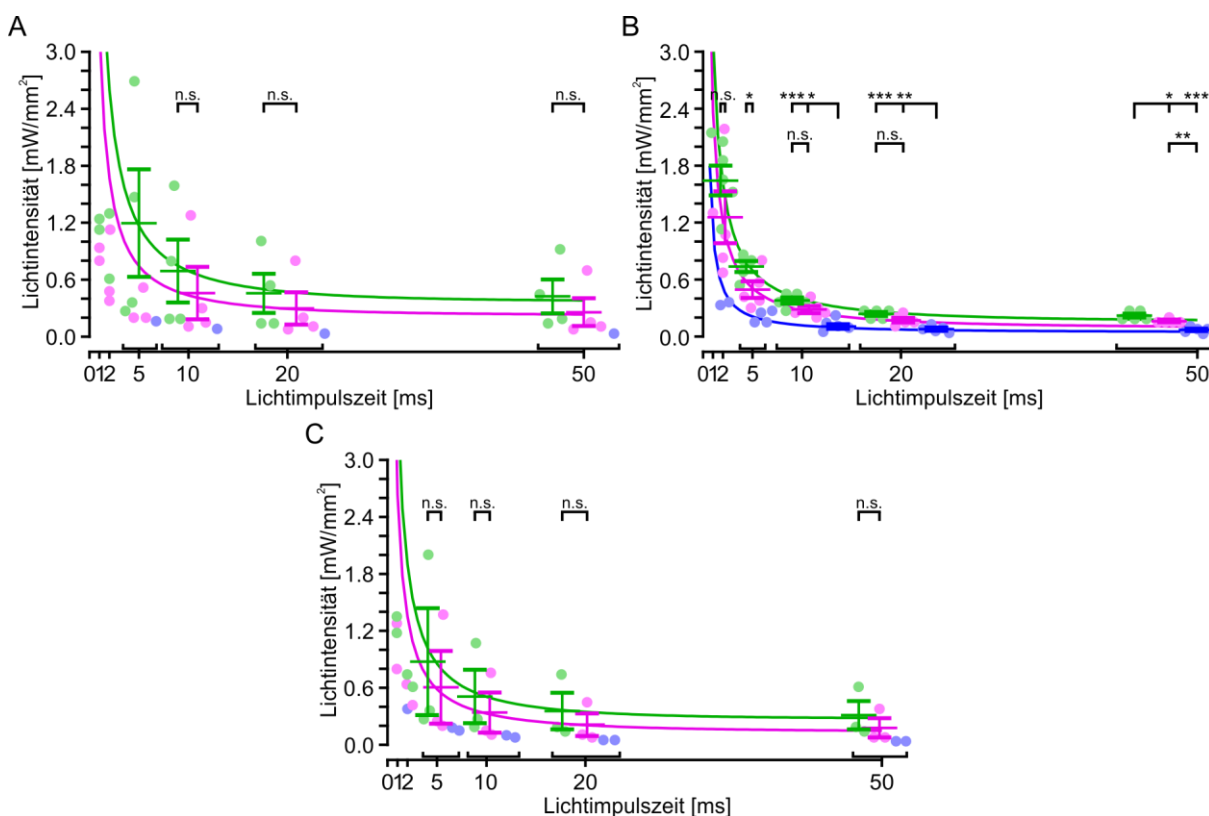


Abbildung 29: Reizzeit-Intensitäts-Kurven der *ex vivo* Stimationsversuche nach systemischer Injektion von AAV2/9-CAG-hChr2-mCherry, *ex vivo*

(A) 2 Monate nach Injektion (n = 4). **(B)** 8 Monate nach Injektion (n = 5). **(C)** 16 Monate nach Injektion (n = 3). (A – C) zeigen alle Einzelmessdaten. Mittelwerte und Abweichungen (Fehlerbalken: SEM) wurden berechnet, sofern von allen Tieren der Messgruppe Ergebnisse vorlagen. Reizzeit-Intensitäts-Diagramme aus den gezeigten Mittelwerten durch Origin Pro 8 anhand der Lapique-Hill Gleichung errechnet. Stimulationsoberfläche in Grün (10.2 mm²), in Magenta (25.3 mm²) und in Blau (72.3 mm²). Signifikanztests mit 2 Gruppen durch gepaarten *t*-Test; für 3 Gruppen wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Tukeys Posthoc Test verwendet, *P*: * < 0,05, ** < 0,001, *** < 0,0001.

Abbildung 29 führt alle gemessenen *ex vivo* Ergebnisse in Reizzeit-Diagrammen auf. In Abbildung 29A wurden die Werte der Versuche zwei Monate nach der Virusinjektion zusammengefasst die stimulierbar waren (n = 4). Alle vier Herzen konnten bei der Beleuchtung mit 10,2 mm² und 25,3 mm² Fläche durch 10 ms, 20 ms und 50 ms langen Lichtimpulse kontinuierlich erregt werden. Des Weiteren folgten bei der Stimulation mit 10,2 mm² alle vier Herzen den 5 ms, zwei Herzen den 2 ms und dieselben zwei Herzen den 1 ms langen Lichtimpulsen. Bei 25 mm² Beleuchtung konnten drei Herzen durch die 5 ms und die 2 ms, und zwei Herzen durch die 1 ms langen Lichtreize stimuliert werden.

Mittelwerte und Abweichungen (SEM) wurden für vollständige Messgruppen ($n = 4$) berechnet und anhand der Mittelwerte die Reizzeit-Intensitäts-Kurven für die Versuche mit $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ Beleuchtungsfläche erstellt. Bei langen Lichtimpulszeiten benötigten die Versuche mit $25,3 \text{ mm}^2$ Fläche ungefähr $0,2 \text{ mW/mm}^2$ weniger als die der $10,2 \text{ mm}^2$. Ein Vergleich der Messgruppen durch t -Tests ergab, dass die Ergebnisse nicht signifikant unterschiedlich waren. Bei der Stimulation mit $72,3 \text{ mm}^2$ Fläche konnte lediglich ein Herz durch die Lichtimpulse kontinuierlich stimuliert werden. Dessen Stimulationswerte waren niedriger als die mit den kleineren Beleuchtungsflächen und hatte einen Maximalwert mit $0,19 \text{ mW/mm}^2$ und 5 ms langen Lichtimpulsen.

Die Einzelergebnisse der Lichtstimulationen acht Monate nach der systemischen Injektion wurden in Abbildung 29B zusammengefasst ($n = 5$). Alle fünf Herzen konnten bei den drei Beleuchtungsflächen $10,2 \text{ mm}^2$, $25,3 \text{ mm}^2$ und $72,3 \text{ mm}^2$ mit 10 ms , 20 ms und 50 ms langen Lichtimpulsen stimuliert werden. Weiterhin folgten die fünf Herzen bei $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ den 2 ms und 5 ms langen Lichtreizen. Mit der $72,3 \text{ mm}^2$ großen Beleuchtungsfläche konnten lediglich zwei bzw. vier Herzen mit 2 ms bzw. 5 ms stimuliert werden. Durch die 1 ms kurzen Lichtimpulsen wurde zumindest ein Herz mit $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ kontinuierlich stimuliert. Sofern bei einer Messgruppe $n = 5$ Daten vorhanden waren, wurden Mittelwerte und Abweichungen (SEM) berechnet und daraus die Reizzeit-Intensitäts-Kurven für die drei Beleuchtungsflächen bestimmt. Die Kurven verliefen bei den langen Lichtimpulszeiten 50 ms und 20 ms sehr eng parallel zueinander. Der Abstand vergrößerte sich bei 5 ms und 2 ms , und verringerte sich bei 1 ms langen Lichtimpulsen. Die Messdaten wurden entsprechend der Lichtimpulszeiten gruppiert und hinsichtlich der zur Stimulation benötigten Lichtintensität miteinander verglichen. Bei den Versuchen mit 2 ms und 5 ms langen Impulsen wurden die Gruppen von $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ durch t -Tests verglichen. Bei der Analyse der 2 ms Versuche wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt, dagegen wiesen die Versuchsgruppen mit 5 ms Lichtimpulsen einen leicht signifikanten Unterschied auf. Für die Versuchsgruppen mit 10 ms , 20 ms und 50 ms langen Impulsen wurde eine 1-faktorielle ANOVA verwendet. Die Messgruppen von $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ waren bei 10 ms und 20 ms nicht signifikant unterschiedlich. im Gegensatz dazu ergab der Vergleich der Messergebnisse bei 50 ms langen Lichtimpulsen einen signifikanten Unterschied, $p = 0,0317$. Die Ergebnisse der Messgruppen der $72,3 \text{ mm}^2$ Beleuchtungsfläche lagen zu denen der $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ Gruppen immer signifikant niedriger mit $0,01887 \leq p \leq 0,00003$. Die Versuchsergebnisse der jeweiligen Gruppen lagen vor Allem bei längeren Lichtimpulszeiten sehr nahe beieinander, wodurch signifikante Unterschiede deutlich wurden. Somit zeigte sich deutlich, dass eine Vergrößerung der beleuchteten und stimulierten Fläche eine Verringerung der benötigten Lichtintensität bedeutete.

Abbildung 29C zeigt die zusammengefassten Einzelergebnisse der Messungen 16 Monate nach der systemischen Injektion der AAVs ($n = 3$). Für die Beleuchtungsflächen $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ waren alle drei Herzen mit 5 ms, 10 ms, 20 ms und 50 ms langen Lichtimpulsen kontinuierlich stimulierbar. Bei kurzen 1 ms und 2 ms langen Lichtreizen folgten jeweils nur zwei Herzen den optischen Stimulationen. Mit der $72,3 \text{ mm}^2$ Beleuchtung schaffte es nur ein Herz den 2 ms Lichtimpulsen zu folgen. Bei 5 ms, 10 ms, 20 ms und 50 ms langen Lichtimpulsen folgten zwei Herzen kontinuierlich. Mittelwerte und Abweichungen (SEM) wurden für die Messgruppen berechnet die vollständig ($n = 3$) waren und anhand der Mittelwerte wurden die Reizezeit-Intensitäts-Kurven für $10,2 \text{ mm}^2$ und $25,3 \text{ mm}^2$ erstellt. Die Kurven verlaufen in einem Abstand von rund $0,2 \text{ mW/mm}^2$ weitestgehend parallel bis sie bei 1 ms sich stark annähern. Die Messgruppen wurden jeweils durch t -Tests verglichen und zeigten keine signifikanten Unterschiede.

4.2.6 Vergleich der *in vivo* und *ex vivo* Lichtintensitätswerte

In den vorherigen Kapiteln 4.2.4 und 4.2.5 wurden die notwendigen Lichtintensitäten dargestellt, die eine kontinuierliche optische Stimulation der Maus Herzen *in vivo* im lebenden Organismus und explantiert in einem Langendorff-Apparat *ex vivo* ermöglichten. Die *ex vivo* Versuche erlaubten eine freie Positionierung der Herzen, wodurch eine möglichst optimale Beleuchtung des Endokards erreicht wurde. Zudem wurden die Herzen durch den Langendorff-Apparat retrograd mit farbloser, physiologischer Tyrode-Lösung versorgt. Dadurch war kein rotes Blut in den Herzkammern und in den Koronargefäßen, welches das stimulierende Licht absorbieren oder streuen konnte, bevor es auf ChR2 Proteine in Kardiomyozyten in tieferen Muskelschichten treffen konnte. Somit stellte sich die Frage, ob dieser Umstand bei einer Gegenüberstellung der Ergebnisse ersichtlich sein würde. Hierfür wurden die Daten der identischen Herzen, die sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* optisch stimuliert wurden, in den Diagrammen der Abbildung 30A – C gegenübergestellt. Abbildung 30A zeigt die Ergebnisse zwei Monate, Abbildung 30B acht Monate und Abbildung 30C 16 Monate nach der AAV-Injektion. In dieser Übersicht sind die Daten der $10,2 \text{ mm}^2$ Experimente mit grünen Punkten, die der $25,3 \text{ mm}^2$ Experimente mit orangen Punkten und die der $72,3 \text{ mm}^2$ Experimente in blauen Punkten dargestellt. Die hellen Punkte zeigten die *in vivo* und die dunklen Punkte die *ex vivo* Versuche. Zueinander gehörende Ergebnisse, die mit derselben Maus und bei gleichen Parametern durchgeführt wurden, sind durch graue Linien verbunden. Abbildung 30A – C zeigen insgesamt 105 Messpaare, von denen 96,2 % bei deren *ex vivo* Stimulation einen niedrigeren Schwellenwert zur optischen Stimulation der Herzen hatten als bei den jeweiligen *in vivo* Versuchen. Hierbei zeigte sich eine Stimulationsverbesserung um einen Faktor von durchschnittlich 1,4 bis 2,8 exemplarisch für die mit 10 ms Lichtimpulsen und $10,2 \text{ mm}^2$ Beleuchtungsfläche (Balkendiagramm, Abbildung 30D).

Die vier Fälle, in denen mit *ex vivo* Bedingungen mehr Lichtintensität benötigt wurden (Abbildung 30A, C) können als Ausnahmen klassifiziert werden. Drei dieser Versuche erfolgten mit demselben Herz bei den Stimulationen mit 10,2 mm² Beleuchtungsfläche (Abbildung 30C). Bei den *ex vivo* Versuchen könnte zufällig ein Bereich des Ventrikels beleuchtet worden sein in dem vergleichsweise weniger ChR2 positive Kardiomyozyten waren, als es bei den *in vivo* Versuchen der Fall war. In Kapitel 4.2.1 Abbildung 23 wurde die Transduktion von Kardiomyozyten in allen Bereichen des Herzens nach systemischer Injektion des Adeno-assoziierten Virusvektors AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry demonstriert.

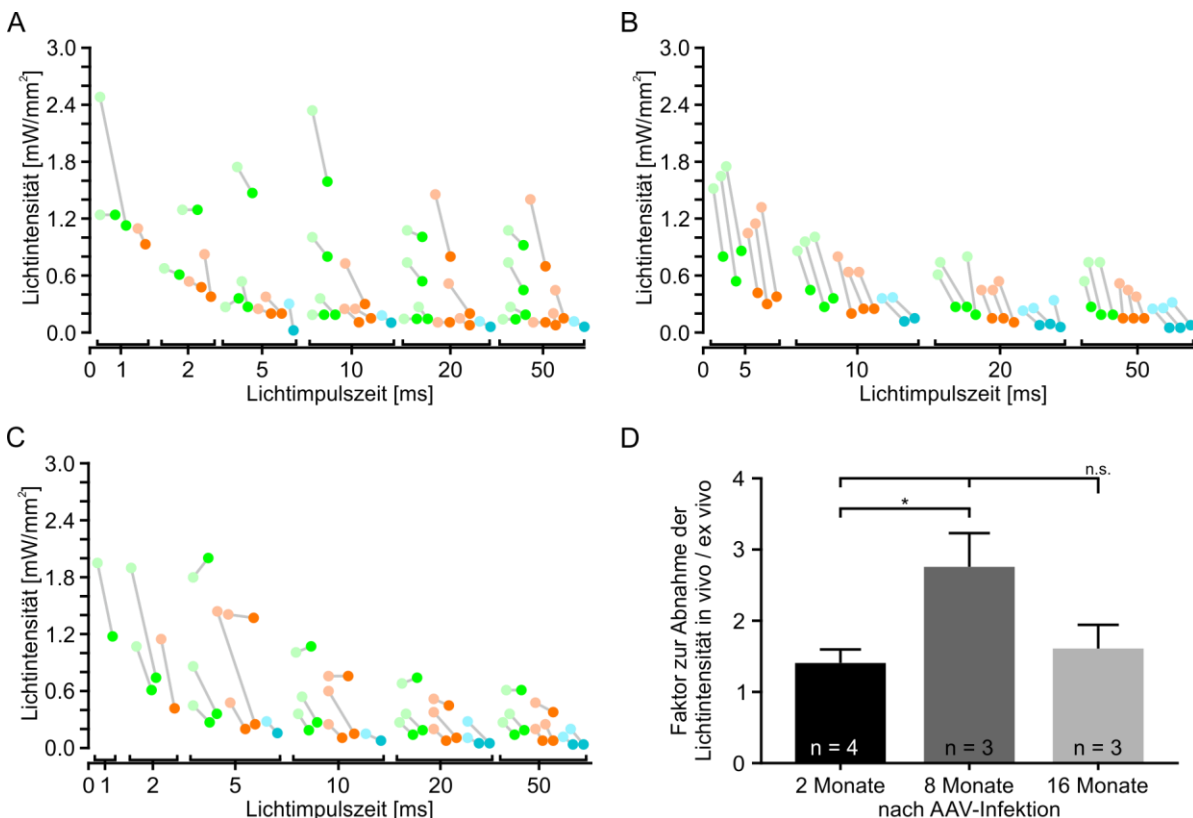


Abbildung 30: Visuelle Darstellung des Vergleichs von *in vivo* und *ex vivo* Lichtintensitätswerten, nach systemischer AAV-Injektion (AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry).

(A) Zwei Monate nach Injektion (n = 4). **(B)** Acht Monate nach Injektion (n = 3). **(C)** 16 Monate nach Injektion (n = 3). (A – C) zeigen direkt miteinander zu vergleichende Einzelmessdaten von denselben Mäusen und mit gleichen Parametern, von *in vivo* (helle Punkte) und *ex vivo* (dunkle Punkte) Versuchen. Einander zugehörige Daten aus gleichen Herzen wurden mit Linien verbunden. Grüne Punkte wurden mit 10,2 mm², orangene Punkte mit 25,3 mm² und blaue Punkte mit 72,3 mm² Beleuchtung stimuliert. **(D)** Darstellung der Faktoren um welche die benötigte Lichtintensität bei *ex vivo* Stimulation geringer war als bei *in vivo* Versuchen. Daten der 10 ms Versuche von A-C. Fehlerbalken: SEM. Einfaktorielle ANOVA mit Tukeys Posthoc Test, P: * < 0,05.

4.2.7 Die optische Stimulation durch Beleuchtung unterschiedlicher Herzbereiche

Das Herz ist ein Vierkammersystem und ist somit aus vier anatomischen Bereichen, linkes und rechtes Atrium, sowie linker und rechter Ventrikel aufgebaut. Die bisher beschriebenen Stimulationsversuche dieser Arbeit wurden durchgeführt, indem die Lichtimpulse die endokardialen Bereiche des linken

Ventrikels beleuchteten und dabei das Myokard des Herzens zur Kontraktion erregte. Wie in Abbildung 23 deutlich sichtbar ist, führte die systemische Injektion des Adeno-assoziierten Virusvektors AAV2/9-hChR2-mCherry dazu, dass in allen Bereichen des Herzens, linkes und rechtes Atrium und linker und rechter Ventrikel, die Kardiomyozyten das Fusionsprotein hChR2-mCherry exprimierten.

Dies führte zur Frage, ob die optische Stimulation von anderen Bereichen des Herzens, wie der Atrien oder dem rechten Ventrikel bzw. dem frontalen Septum, möglich oder wohlmöglich sogar effektiver wäre. Für den Vergleich der Schwellenwerte der unterschiedlichen Herzbereiche wurden die Stimulationsversuche nur an explantierten Herzen an einem Langendorff-Apparat *ex vivo* durchgeführt. Nur in diesem Versuchsaufbau konnten die Herzen frei positioniert werden, um die unterschiedlichen anatomischen Herzbereiche mit dem stimulierenden Lichtimpuls anzuvisieren.

Die Versuche wurden mit $n = 4$ Herzen durchgeführt, deren minimalen Lichtintensitätswerte in Abbildung 31 dargestellt wurden. Alle vier Herzen folgten den Stimulationen über die linken und rechten Ventrikel, sowie der zentralen Stimulation über das Septum. Drei der vier Herzen konnten zusätzlich über ihr rechtes Atrium stimuliert werden. Über das linke Atrium war keines der Herzen kontinuierlich stimulierbar trotz des visuellen Nachweises der mCherry Expression im linken Atrium. Signifikanztests zwischen den Ergebnisgruppen ergaben keine signifikanten Unterschiede.

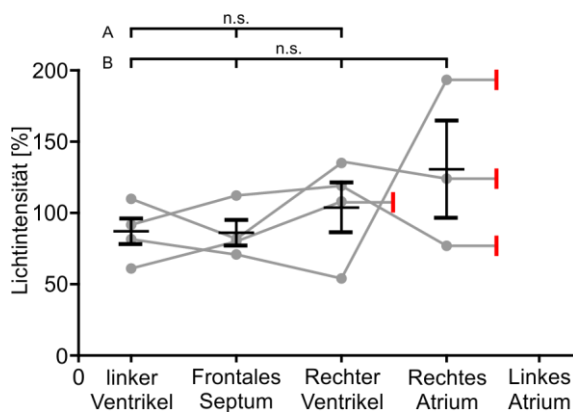


Abbildung 31: Schrittmacherfunktion durch optische Stimulation in unterschiedlichen Herzbereichen

Normalisierte Stimulationsschwellenwerte für 10 ms lange Lichtimpulse mit $10,2 \text{ mm}^2$ Beleuchtung auf verschiedenen anatomischen Bereichen des Herzens. Vier Herzen waren über linken und rechten Ventrikel und über das frontale Septum stimulierbar. Drei der vier Herzen konnten über das rechte Atrium und keines der Herzen über das linke Atrium stimuliert werden. Nicht stimulierbar: roter Balken. Vergleiche der Ergebnisgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede, einfaktorielles ANOVA, A: $n = 4$, B: $n = 3$, $P > 0,05$. Fehlerbalken: SEM.

In Abbildung 32 wird exemplarisch ein Ausschnitt einer EKG Aufnahme zum Zeitpunkt der Stimulation am rechten Atrium gezeigt. Die ektopische Stimulation über das rechte Atrium veränderte die Form des QRS-Komplexes nicht, im Gegensatz zur ventrikulären Stimulation die in Kapitel 4.1.2 Abbildung 10 gezeigt wurde. Im Fall der atrialen Stimulation (Abbildung 32) wurde die Erregung vom rechten Vorhof über die Reizweiterleitungsbahnen geleitet, wodurch die Kontraktionsstimulation des gesamten Herzens wie bei einem Impuls durch den Sinusknoten verlief. Der Unterschied zwischen der optischen atrialen Stimulation und der Erregung durch den Sinusknoten ist im EKG in einer deutlichen Formveränderung der P-Welle zu sehen. Diese wurden in Abbildung 32 durch unterschiedlich gefärbte

Kreise hervorgehoben. In grau sind die P-Wellen der Sinus Erregung gekennzeichnet, in blau die der atrialen Lichtstimulation. Im Beispiel ist zu sehen, dass das erste Lichtsignal die darauffolgende P-Welle noch nicht beeinflusste. Ab dem zweiten Lichtsignal veränderte sich die P-Welle deutlich und folgte ab dann der Lichtstimulation.

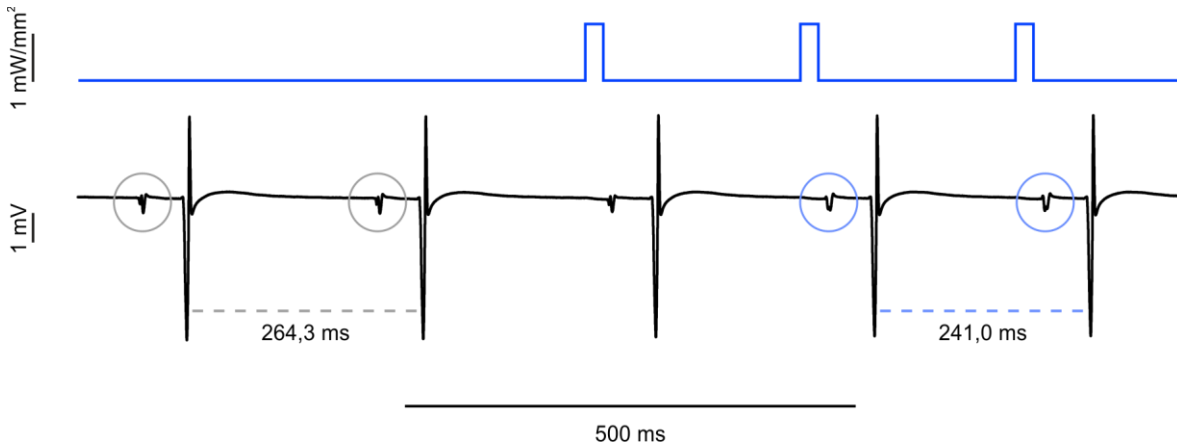


Abbildung 32: EKG Aufnahme von der optischen Stimulation des rechten Atriums

EKG Aufnahme (schwarz) während der optischen Stimulation des rechten Atriums mit $1,24 \text{ mW/mm}^2$ Lichtintensität (blau) und mit $10,2 \text{ mm}^2$ Beleuchtungsfläche. Sinusrhythmus stimulierte P-Wellen bzw. der RR-Abstand sind mit grauen Kreisen bzw. einer gestrichelten Linie markiert. Lichtstimulierte P-Wellen sowie der RR-Abstand sind dagegen in Hellblau markiert. Verkürzung der RR-Abstände verdeutlicht die höhere Frequenz der Lichtstimulation, im Vergleich zum Sinusrhythmus.

4.2.8 Optische Stimulation über eine längere Zeit, *in vivo*

Um die Effizienz der optischen Stimulation am Herzen über einen längeren Zeitraum zu testen, wurden zehn Minuten lang überschwellige Stimulationen *in vivo* durchgeführt ($n = 3$). Aus den Versuchen zu Kapitel 4.2.4 waren die Grenzwerte zur optischen Stimulation für die unterschiedlich langen Lichtreize bekannt. Für die zehnminütige Stimulation wurden 20 ms lange Lichtreize mit den entsprechenden minimalen Lichtintensitätswerten eingestellt. Die Stimulation erfolgte mit einer Frequenz 20 – 30 bpm über der basalen Herzfrequenz. Wie in der Frequenzanalyse exemplarisch in Abbildung 33A zu sehen, folgten alle drei Herzen dem entsprechenden Lichtreiz zuverlässig. In den EKG Aufnahmen zeigte sich, dass ab der ersten lichtinduzierten Extrasystole jeder Lichtreiz eine Extrasystole hervorrief. In den drei Versuchen kam es zu keinen Aussetzern während der zehnminütigen optischen Stimulation. Nach dem Beenden der Lichtstimulationen kehrten die Herzen zum physiologischen Sinusrhythmus zurück. Dabei glichen die Parameter PR-Intervall, QRS-Komplex Dauer und Herzfrequenz fast den Werten vor der Stimulation (Abbildung 33A – C). Des Weiteren waren weder Arrhythmien noch Anzeichen für kardiale Infarkte sichtbar. Die kontinuierliche Lichteinwirkung führte somit zu keiner lokalen Erhitzung und entsprechenden Gewebeschäden, die Arrhythmien begünstigen würden. Somit ermöglichte die optische Stimulation mit Hilfe von ChR2 eine ausreichende Auswurfleistung mit intakter Sauerstoffversorgung des Sinusknotens und der Kardiomyozyten.

Im Fall einer Verletzung der Herzen wären die EKG Parameter nach der zehnmütigen Stimulation nicht in den gleichen Bereichen gewesen wie vor der Stimulation. Eine Gewebeschädigung des AV-Knotens oder des Ventrikels wäre durch ein verlängertes PR-Intervall oder einer verlängerten Dauer des QRS-Komplexes aufgefallen, sowie einer deutlichen Formveränderung des QRS-Komplexes. Zudem würde eine Verletzung des Sinusknotens zu einer deutlichen Bradykardie führen.

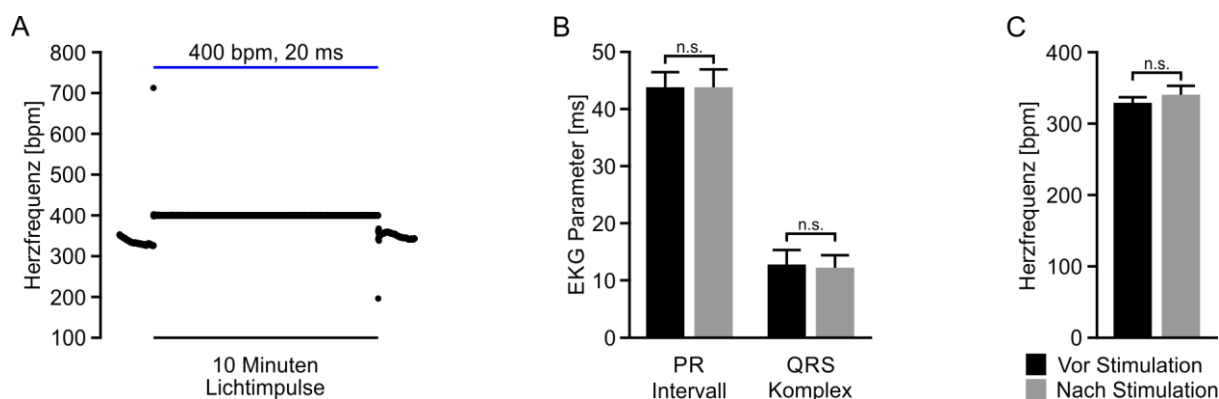


Abbildung 33: Effekte der optogenetischen Langzeitstimulation *in vivo*, nach systemischer Adeno-assoziiertes Virusvektordinjektion, AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry

(A) Exemplarische Analyse der Herzfrequenz während 10 Minuten überschwelliger Lichtstimulation. Blaue Linie: Lichtimpulse mit 20 ms, 1,5 mW/mm² und 10,2 mm². (B, C) Statistische Analyse der PR-Intervalle, der QRS-Komplexe (B), und der Herzfrequenzen (C) im Sinusrhythmus vor und nach der 10 Minuten Lichtstimulation. B – C: n = 3; $P > 0,05$, Fehlerbalken: SEM.

4.2.9 Analyse der mCherry Expression in Nicht-Kardiomyozyten im Herz, sowie in weiteren Organen, zwei Monate nach systemischer AAV-Injektion, AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry

Adeno-assoziierte Virusvektor Partikel mit dem Kapsid des Serotyps 9 (AAV2/9) transduzieren bevorzugt Kardiomyozyten. Sie haben das Potential in unterschiedliche Zellarten anderer Gewebe und Organe einzudringen und diese genetisch zu manipulieren, wie z.B. Leberzellen (Inagaki et al., 2006). Um die Transduktion weiterer Organe durch AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry zu überprüfen wurden von drei Mäusen, acht Wochen nach der Infektion, neben dem Herz folgende Organe entnommen: Diaphragma, Leber, Lunge, Nieren, Milz und Gehirn. Die Herzen dieser Tiere konnten vor der Explantation optisch stimuliert werden. Von den explantierten Organen wurden Gewebeschnitte angefertigt (Kapitel 3.10) und histologische Fluoreszenzfärbungen durchgeführt (Kapitel 3.10.3): Die Gewebeschnitte der Herzen (Abbildung 34A) wurden gegen α -Aktinin (grün) und Vimentin (weiß) gefärbt, sowie mit der DAPI Zellkernfärbung behandelt. Die Gewebeschnitte der restlichen Organe (Abbildung 34B – H) wurden lediglich mit DAPI angefärbt. Anschließend wurden von den gefärbten Gewebeschnitten hochauflösende, mikroskopische Aufnahmen angefertigt (Kapitel 3.11), wobei alle akribisch auf mCherry Fluoreszenzsignale untersucht wurden.

Die Gewebeschnitte der Herzen zeigten deutliche mCherry Fluoreszenzsignale (rot) entlang der α -Aktinin Färbung (Cy2, grün), die spezifisch für Myozyten ist (Abbildung 34A). Weder in Fibroblasten, die Vimentin als filamentäres Protein enthalten (Abbildung 34A, weiß), noch in gefäßartigen Strukturen wurden mCherry Signale nachgewiesen. Damit bestätigte sich die starke Affinität AAV9 für Muskelzellen und die Selektivität für Kardiomyozyten im Herzen.

Als Beispiel für Skelettmuskeln wurden die Diaphragmen analysiert, die bei Säugetieren als zentrale Atemmuskeln dienen (Abbildung 34B). Sowohl AAV2 (Hoggan et al., 1966) als auch AAV9 (Inagaki et al., 2006) sind bekannt neben Herzmuskelzellen auch Skelettmuskelzellen zu transduzieren. In den Gewebeschnitten der Diaphragmen konnte neben dem grünen Cy2-Signal am α -Aktinin in 17 % der Zellen das rote mCherry-Signal des Fusionsproteins hChR2-mCherry deutlich nachgewiesen werden (Abbildung 34B).

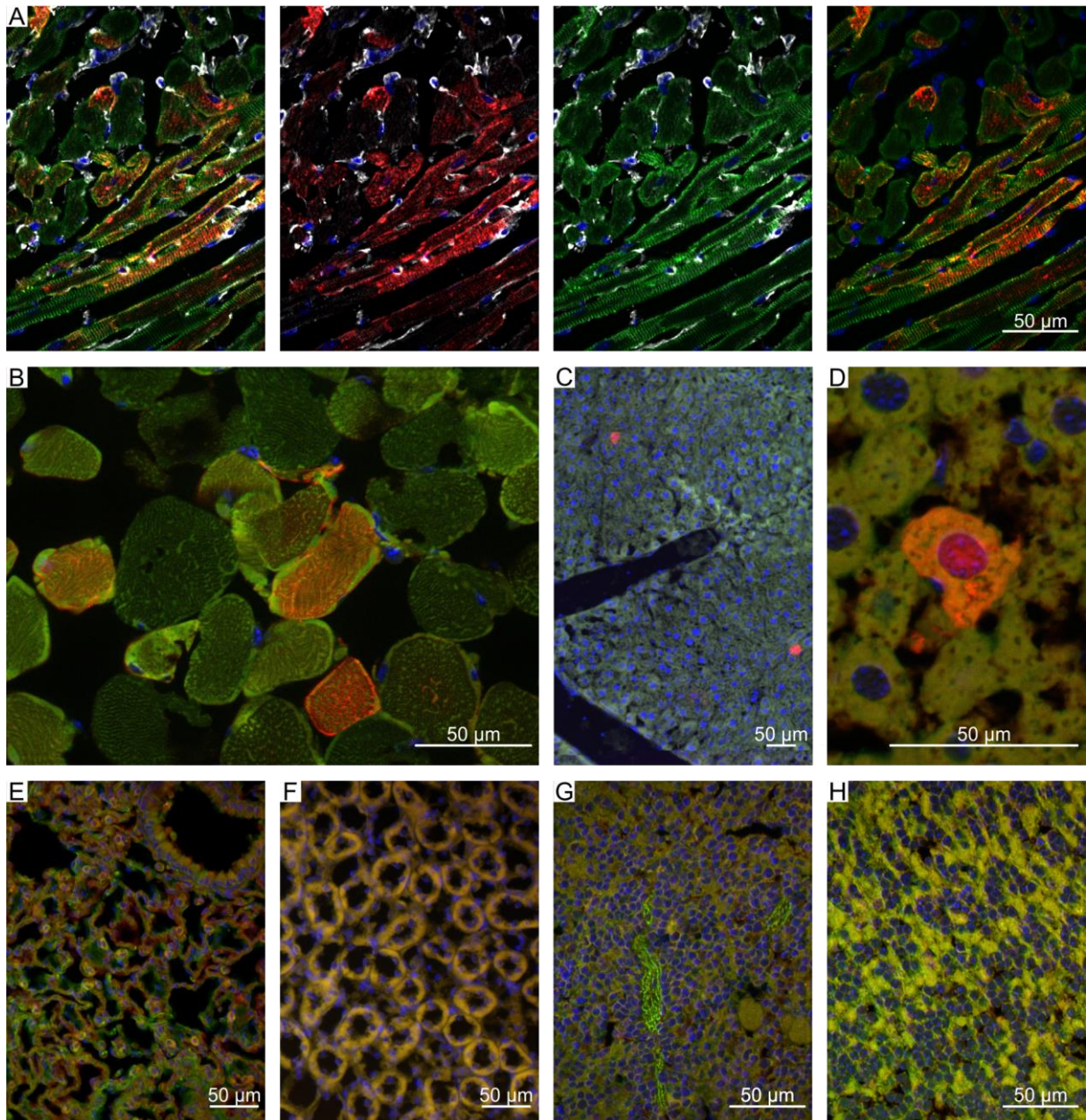


Abbildung 34: Analyse der mCherry Expression in Nicht-Kardiomyozyten im Herz, Diaphragma, Leber, Lunge, Niere, Milz und Gehirn, zwei Monate nach systemischer Adeno-assoziiierter Virusvektoringjektion, AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry

(A) Gewebeschnitt vom Herz zeigt deutliches mCherry Fluoreszenzsignale (rot) in α -Actinin (grün) gefärbten Kardiomyozyten. Weder in Fibroblasten noch in gefäßartigen Strukturen, mit Vimentin (weiß) gefärbt, sind mCherry Fluoreszenzsignale. In (B) Diaphragma und (C, D) Leber wurden mCherry Fluoreszenzsignale in einzelnen Zellen gefunden. (E) Lunge, (F) Niere, (G) Milz und (H) Gehirn zeigen keine mCherry Fluoreszenzsignale. (B – H) Hintergrundfluoreszenz (grün). Kernfärbung mit DAPI (blau).

Abbildung 34C bzw. die Vergrößerung daraus in Abbildung 34D zeigen Ausschnitte der Leber in denen wenige, deutliche mCherry Fluoreszenzsignale gefunden wurden. Dies bestätigte die Aussage von Inagaki et al., die für AAV9 Vektoren eine hohe Transduktionseffizienz in Hepatozyten festgestellt hatten (Inagaki et al., 2006). In den Analysen der anderen Organe: Lunge, Nieren, Milz und Gehirn wurden keine Anzeichen einer hChR2-mCherry Expression gefunden (Abbildung 34E – H).

Zusammenfassend wurden durch die systemischen AAV2/9-Injektionsversuche über die *Vena jugularis* bevorzugt Kardiomyozyten im Herz der Mäuse transduziert. Des Weiteren wurden lediglich wenige transduzierte Myozyten in Skelettmuskelzellen des Diaphragmas und vereinzelt transduzierte Leberzellen nachgewiesen.

4.2.10 Analyse der Lichtdurchlässigkeit der Haut

In Anbetracht der sehr niedrigen Lichtintensitäten, die zur Stimulation der Herzen benötigt wurden, stellte sich die Frage wie lichtdurchlässig die Haut einer Maus ist. Wichtig war, dass eine starke Beleuchtung außerhalb des Körpers, wie z.B. Laserlicht oder starkes Licht in einer Diskothek keine ungewünschten Kontraktionen auslösen würde. Hierzu wurde der abgetrennte Brustkorb einer Maus mit der maximalen Stärke der LED bei einer Wellenlänge von $\lambda = 470 \text{ nm}$ beleuchtet. Der Sensor des Powermeters wurde direkt unter den Brustkorb platziert und maß $5,7 \mu\text{W}/\text{mm}^2$. Die direkte Beleuchtung des Sensors mit maximaler Stärke der LED ohne den Brustkorb ergab $2,69 \text{ mW}/\text{mm}^2$. Der Brustkorb mit Fell und allen Hautschichten absorbierte somit 99,8 % der applizierten Lichtintensität. In den *in vivo* und *ex vivo* Stimulationsversuchen war $0,09 \text{ mW}/\text{mm}^2$ der niedrigste gemessene Lichtintensitätswert. Auch im Vergleich hierzu zeigte sich, dass die hinter dem Brustkorb gemessenen Wert von $5,7 \mu\text{W}/\text{mm}^2$ 16-mal niedriger war als die $0,09 \text{ mW}/\text{mm}^2$, die zur Stimulation mindestens benötigt wurden.

Eine ungewollte Stimulation der transduzierten Herzen bei geschlossenem Brustkorb durch alle Haut- und Gewebeschichten scheint somit ausgeschlossen.

5 Diskussion

5.1 Bradykarde Herzrhythmusstörungen

Bei Herzrhythmusstörungen liegt eine zu langsame oder zu schnelle, bzw. eine unregelmäßige Frequenz des Herzschlags vor. Eine zu langsame Herzfrequenz mit < 50 Herzschläge pro Minute wird als Bradykardie bezeichnet, dagegen wird eine zu schnelle Herzaktivität mit $> 100 - 150$ Herzschläge pro Minute Tachykardie genannt (Pape et al., 2014). Weiterhin unterscheidet man Herzrhythmusstörungen anhand ihres Entstehungsorts. Liegt dieser in der Herzkammer spricht man von einer ventrikulären Arrhythmie. Ist der Grund für die Herzrhythmusstörungen aus Sicht der Erregungsleitung vor dem Ventrikel spricht man von einer supraventrikulären Arrhythmie (Pape et al., 2014).

Bradykarde Arrhythmien werden durch Störungen entweder in der Reizbildung im Sinusknoten oder in der Reizweiterleitung durch AV-Knoten, His-Bündel und Tawara-Schenkel ausgelöst. Diese äußern sich unter anderem im Sick-Sinus-Syndrom, Sinuatrialen Block, atrioventrikulären Block (AV-Block). Bradykardien können asymptomatisch sein, führen jedoch in vielen Fällen zu typischen Symptomen wie Bewusstseinsstörung (Synkope), Schwindel, Belastungsintoleranz und Herzinsuffizienz (Trappe, 2019). In Deutschland erleiden jährlich 70.000 - 100.000 Menschen, in den USA bis zu 450.000 Menschen die älter als 35 Jahre sind einen plötzlichen Herztod (Trappe and Gummert, 2011). Dieser wird als Folge eines irreversiblen Herz-Kreislauf-Stillstands, der in 5 – 20 % der Fälle durch bradykarde Arrhythmien und in 65 – 90 % der Fälle durch tachykarde Arrhythmien hervorgerufen (Trappe and Gummert, 2011).

Für eine Sinusknotendysfunktion und bei hochgradigem AV-Block ist der elektrische Herzschrittmacher die Therapie der Wahl. Jedoch können Infektionen, Kabelbrüche und vaskuläre Komplikationen zu Morbidität und Mortalität führen (Sasse, 2011). Zudem erfordert die begrenzte Batterielebensdauer einen Gerätewechsel, der das Infektionsrisiko erhöht (Borek and Wilkoff, 2008). Darüber hinaus ist es eine technische Herausforderung die Stimulation des sich entwickelnden Herzens pädiatrischer Patient*innen zu gewährleisten (Sasse, 2011).

Eine alternative Stimulation des Herzens bietet sich durch die Optogenetik an, indem mikrobielle, durch Licht aktivierbare, Ionenkanäle und Ionenpumpen in Herzmuskelzellen exprimiert werden (Sasse, 2011). Das Labor von Philipp Saße kreierte eine transgene Mauslinie, die in ihren Muskelzellen das Fusionsprotein Channelrhodopsin-2 – eYFP (ChR2-eYFP) exprimiert (Bruegmann et al., 2010). Dafür wurden embryonalen Stammzellen (ESCs) mit einem Plasmid transformiert, welches die genetische Information des Fusionsproteins ChR2-EYFP unter der Kontrolle des CAG Promotors enthielt. Durch

Aggregation diploider Mausembryonen wurde die transgene Channelrhodopsin-2 (ChR2) Mauslinie erschaffen. Die optische Stimulation bei einer Wellenlänge von $\lambda = 470$ nm regte die Muskelzellen der ChR2 Mauslinie zur Depolarisation und Kontraktion an (Bruegmann et al., 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen geprüft, ob der Adeno-assoziierte Virusvektor (AAV-Vektor) den Gentransfer ChR2 in das native Herz ermöglichte und ob die Expression des transportierten Gens für die optische Stimulation von Extrasystolen ausreichte. Zum anderen wurde geprüft ob der AAV-Vektor spezifisch Kardiomyozyten transduzierte, oder auch andere Organe ChR2 transduzierten.

Das Ziel dieser Arbeit war eine hinreichend starke und lang andauernden Expression von ChR2 in Kardiomyozyten für die optische Stimulation zu erreichen, um eine Basis für neue Stimulationsverfahren zu schaffen, die eine mögliche Alternative für konventionelle elektrische Schrittmacher und Defibrillatoren sein können.

Im Folgenden wird zunächst auf den bisherigen Einsatz von Adeno-assoziierten Virusvektoren in vorklinischen Studien zur Therapie von Herzinsuffizienz eingegangen. Dem folgt die Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der lokalen und systemischen Injektion von AAV. Anschließend werden klinische Studien zur Therapie von Herzinsuffizienz betrachtet. Zum Schluss werden Möglichkeiten für die klinische Anwendung kardialer Optogenetik besprochen.

5.2 Präklinische Studien zur Herzinsuffizienz mit AAV-Vektoren

Das Potential von Adeno-assoziierten Viren (AAVs), als Transportvektoren für den Gentransfer bei Therapien für Herzrhythmusstörungen eingesetzt zu werden, wurde intensiv in vorklinischen Studien untersucht (Hadri et al., 2010; Kawase et al., 2008; Lyon et al., 2011). Dies wurde bei kleinen Säugetieren sowie bei großen menschenähnlichen Tiermodellen getestet.

Lyon et al. setzten für Ihre Forschung Ratten mit einer Herzinsuffizienz ein, die künstlich durch eine Ligatur von Herzkranzgefäßen herbeigeführt wurde (Lyon et al., 2009). Dieses Herzinsuffizienz-Ratten-Modell, hatte während der Diastole eine erhöhte spontane Kalzium (Ca^{2+}) Ausschüttung (Lyon et al., 2011). Den Tieren wurde *in vivo* AAV9 Vektoren injiziert, die das SERCA2a Gen in die Herzmuskelzellen transportierten. SERCA2a codiert für die Ca^{2+} ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), die durch ATP Dephosphorylierung Ca^{2+} Ionen vom Zytoplasma in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) transportiert. Der AAV2/9 Transport von SERCA2a führte zu einer Überexpression des Gens in den Herzmuskelzellen. Dies resultierte in einer Normalisierung der Ca^{2+} Konzentration im SR und in einer Reduktion der spontanen Ca^{2+} Ausschüttung während der Diastole.

Dadurch verbesserte sich die systolische und diastolische Funktion des linken Ventrikels (Lyon et al., 2011).

Kawase et al. verwendeten Schweine als Herzinsuffizienzmodell, die aufgrund einer Mitralklappendysfunktion eine Volumenüberlastung des linken Ventrikels aufwiesen (Kawase et al., 2008). Der linke Ventrikel der Modelltiere wies veränderte Maße des linken Ventrikels auf, die mit den Parametern beim ventrikulären Remodeling vergleichbar sind. Kardiales Remodeling sind Adaptations- und Umbauprozesse des Herzens nach Myokardinfarkt. Den Schweinen wurde *in vivo*, intrakoronar AAV1 Vektoren mit dem SERCA2a Gen injiziert. Die Überexpression von SERCA2a hatte eine positive inotrope Wirkung im linken Ventrikel (Steigerung des Kontraktionsvermögens) und eine positive Verbesserung des ventrikulären Remodelings (Kawase et al., 2008).

Hadri et al. arbeiteten mit einem Schweinemodell mit kongestiver Herzinsuffizienz, die mit einer gestörten endothelabhängigen, stickoxidvermittelten Vasodilatation assoziiert ist (Hadri et al., 2010). Als Hauptursache der endothelialen Dysfunktion bei Herzinsuffizienz wurde eine Abnahme von endothelalem Stickstoffmonoxid (NO) aufgrund verminderter Expression und Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) identifiziert (Smith et al., 1996). eNOS oxidiert L-Arginin zu L-Citrullin und NO, wobei diese Reaktion Ca^{2+} /Calmodulin-abhängig ist und eine Phosphorylierung von eNOS erfordert. Verschiedene Agonisten wie Histamin, Acetylcholin oder Scherstress aktivieren die eNOS womit NO erzeugt wird. NO aktiviert wiederum die lösliche Guanylylzyklase in glatten Gefäßmuskelzellen, um die Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) zu erhöhen, wodurch die Vasodilatation gefördert wird (Fleming and Busse, 2003). Hadri et al. injizierten AAV2/1-SERCA2a intrakoronar den Schweinen *in vivo*. Dies führte zu einer Überexpression von SERCA2a in den Endothelzellen der Koronararterien, was eine Zunahme der Phosphorylierung der Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) zur Folge hatte (Hadri et al., 2010). Der Anstieg von NO in den glatten Gefäßmuskelzellen löste eine Zunahme von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus, wodurch eine verbesserte Vasodilatation bewirkt wurde (Hadri et al., 2010).

Diese vorklinischen Studien zeigen, dass AAVs für den Gentransfer von SERCA2a zur Therapie von Herzinsuffizienz im Tiermodell eingesetzt werden kann. Die nächsten zwei Kapitel gehen auf die Daten dieser Arbeit ein, die den Gentransfer von Channelrhodopsin-2 durch AAV in das native Mausherz zeigen.

5.3 Lokaler Gentransfer von Channelrhodopsin-2 durch den Adeno-assoziierten Virus (AAV) Vektor, AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine stabile Expression von Channelrhodopsin-2 (ChR2) im nativen Herzmuskel zu erreichen. Eine Bedingung dafür war, dass die Expressionsstärke von Channelrhodopsin-2 für eine optische Stimulation hinreichend sein musste. Ein positives Ergebnis dieser Arbeit sollte als wissenschaftliche Grundlage dienen in Zukunft genetisch sichere, schmerzfreie und physiologisch sinnvolle, kardiale Schrittmachersysteme mit optischer Stimulation zu entwickeln.

Mit diesem Ziel wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst das Potential des lokalen Gentransfers von Channelrhodopsin-2 durch den Adeno-assoziierten Virus (AAV) Vektor, AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry (AAV2/1-ChR2), anhand der lokalen, intramyokardialen (i.m.) Injektion analysiert.

Die Methode der lokalen Injektion von AAV2/1-ChR2 in das Myokard hat wünschenswerte Vorteile für eine genetische Manipulation am menschlichen Herzen, die im Folgenden erörtert werden. Die allgemeine Skepsis an genetischen Veränderungen im menschlichen Körper und möglicher Nebenwirkungen fordert eine höchstmögliche Kontrolle des Gentransfers. Die lokale Injektion der AAV-Vektoren in das Myokard bietet die Möglichkeit, dass fremde Gene gezielt in spezifische Bereiche des Herzens transduziert werden. Hierdurch bleibt der virale Kontakt auf diese Bereiche begrenzt und andere Gewebe und Organe des Körpers sind vor dem Gentransfer bewahrt. Dieser Punkt ist vor Allem mit Blick auf die vielfältige Gewebeaffinität der unterschiedlichen AAV Serotypen und deren abgeleiteten rekombinanten AAV-Vektoren von Bedeutung.

Für den Gentransfer ins Myokard durch die intramyokardiale Injektion haben sich zwei verschiedene Virusvektoren etabliert. Der Adenovirusvektor (Guzman et al., 1992) und der Adeno-assoziierte Virusvektor (Svensson et al., 1999). Laut Svensson et al. ist der Vorteil des Adeno-assoziierten Virusvektors, dass dieser keine *Rep* Gene enthält und dadurch eine niedrigere Immunantwort im Organismus der Zielzellen auslöst als der Adenovirusvektor (Svensson et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde für den lokalen Gentransfer von Channelrhodopsin-2 (ChR2) der rekombinante Adeno-assoziierte Virusvektor AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry verwendet. Der Virusvektor AAV2/1 setzt sich aus den Kapsidproteine von AAV Serotyp 1 und dem Virusgenom von AAV2 zusammen. Die Kapsidproteine sorgen für die Gewebespezifität, wobei AAV1 spezifischer an Muskelzellen bindet als AAV2 (Du et al., 2004; Palomeque et al., 2007) (Übersicht der unterschiedlichen Gewebespezifitäten der AAV Kapside, Tabelle 3). Die AAV2 Bestandteile sorgen für einen erfolgreichen Genexpression in den Zielzellen (Du et al., 2004). Die dem rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (AAV) Vektor zugrundeliegenden Serotypen AAV1 und AAV2 sind ihrer Nummerierung nach die ersten AAVs, die

entdeckt wurden (Atchison et al., 1965; Hoggan et al., 1966). Trotz der Verbreitung von AAV1 und AAV2 bei Tieren und Menschen wurden bisher keine Krankheiten auf AAV Infektionen zurückgeführt (Atchison et al., 1965; Hoggan et al., 1966). Da rekombinante Adeno-assoziierte Virusvektoren bereits 1987 (Samulski et al., 1987, 1989) entwickelt und seit dem in der präklinischen Forschung und in klinischen Studien eingesetzt wurden, ist ihre sichere Handhabung bekannt und geregelt (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2005, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der lokalen, intramyokardialen (i.m.) AAV-Injektion eine Dosis von 1×10^9 gc – 1×10^{11} gc eingesetzt (Kapitel 3.8.1). Zur Festlegung dieser AAV-Dosis wurden frühere Studien analysiert, die ebenso Adeno-assoziierten Virusvektoren verwendeten: Vassalli et al. injizierte $2,5 \times 10^6$ gc in das Myokard einer CD-1WT Maus und zeigte, dass der virale Gentransfer eine bis zu 52 Wochen andauernde GFP (*green fluorescent protein*) Expression ermöglichte (Vassalli et al., 2003). In einer mit Rattenherzen durchgeführten Analyse der Dosisempfindlichkeit wurde eine optimale Virusvektormenge von 1×10^{11} gc zur Expression des *LacZ* Gens nach einer intramyokardialen Injektion bestimmt (Palomeque et al., 2007). Prasad et al. injizierten 5×10^{10} gc des rekombinanten Adeno-assoziierte Virusvektors AAV2/9 lokal in den Herzmuskel, in der mittleren Region des linken Ventrikels des Mauserzens (Prasad et al., 2011a). Bereits sieben Tage nach der Injektion konnte eine deutliche Expression von Luziferase (*Luc*) nachgewiesen werden, die bis zu 42 Tage anhielt. Die Expression reichte vom Apex des Herzens bis zur mittleren Ebene der vorderen, seitlichen und unteren linken Ventrikelwand.

Prasad et al. injizierte den Virusvektor in männliche adulte C57BL/6 Mäuse im Alter von acht bis zehn Wochen (Prasad et al., 2011a). Dieses Versuchsmodell ist kleiner, wiegt ca. 27 g und ist rund 10 g leichter als die 10 Wochen alte, weibliche adulte CD-1 WT Maus (ca. 36 g), die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde (Kapitel 3.6). Beim Initialversuch wurde AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry durch eine intramyokardiale Injektion mit einer Dosis von 2×10^{11} gc verabreicht (Kapitel 4.1.3). Das war die vierfache Virusmenge von der, die Prasad et al. bei der C57BL/6 Maus eingesetzt hat. Die Mauserzen ($n = 3$) exprimierten sieben Tage nach der Injektion ChR2-mCherry und waren optisch stimulierbar. In der zweiten Woche waren 1/3 der Herzen optisch stimulierbar, in der dritten Woche keines der Herzen (Abbildung 13). Die Analyse der mCherry Fluoreszenzintensität (Kapitel 3.11.1), die als Indikator für die Quantität der ChR2 Expression verwendet wurde bestätigte die Reduktion der Expression von ChR2-mCherry. Das Ziel dieser Arbeit war eine andauernde Expression von ChR2-mCherry in den Kardiomyozyten und nicht der gemessene Expressionszeitraum von bis zu zwei Wochen. Der Grund für diesen kurzen Zeitraum wurde anhand von histologischen Analysen untersucht. Es wurden Piko-Siriusrot Färbungen von Organschnitten der transduzierten Mauserzen durchgeführt. Die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung zeigte in konsekutiven Herzschnitten viele kleine Zellkerne im Bereich

der Injektionsstelle, die auf eine Immunzellinfiltration hindeuteten (Abbildung 14). Dies wurde durch eine Färbung gegen das Immunzell-spezifische CD45 Epitop bestätigt, wodurch die Zellen eindeutig als Leukozyten identifiziert wurden (Abbildung 14A – C).

In früheren Studien zur AAV Transduktion wurde bereits von Immunreaktionen berichtet, die aufgrund von Gewebeverletzungen durch den intramyokardialen Injektionsstich auftraten (Guzman et al., 1992; Vassalli et al., 2003; Xiao et al., 1996). Das Augenmerk dieser Studien lag weniger auf der eigentlichen Immunreaktion, sondern auf der Bewertung (Adenovirus) (Guzman et al., 1992) und dem Vergleich der beiden viralen Vektorsysteme (AAV und Adenovirus) für den Gentransfer und der Dauer der Genexpression in Muskelzellen (Xiao et al., 1996; Vassalli et al., 2003).

Im Folgenden wird hinsichtlich der Immunreaktion auch darauf eingegangen, warum der AAV-Vektor für eine Gentherapie bei Herzinsuffizienz besser geeignet ist als der Adenovirusvektor. Für den Vergleich des Gentransfers durch AAV-Vektor und Adenovirusvektor setzte Xiao et al. jeweils eine Virusvektordosis von 3×10^4 gc ein. Ziel war es das *LacZ* Gen in murinen Skelettmuskeln (Swiss Webster Maus) zu exprimieren (Xiao et al., 1996). Der Gentransfer mit Hilfe des Adenovirusvektors führte zu einer zwei Wochen andauernden Expression des *LacZ* Gens, wohingegen der Gentransfer durch die AAV-Vektoren bis zu 19 Monate nach der Injektion eine Genexpression von *LacZ* ermöglichte (Xiao et al., 1996). In den durch Adenovirusvektor transduzierten Skelettmuskeln wurde vier Tage nach der Injektion eine Immunzellinfiltration durch Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung bestätigt (Xiao et al., 1996). In der dritten Woche nach der Adenovirusvektordinjektion konnte weder eine Genexpression von *LacZ*, noch eine Immunzellinfiltration nachgewiesen werden (Xiao et al., 1996). In den AAV-Vektor behandelten Skelettmuskeln wurde ebenfalls vier Tage nach der Injektion eine Immunzellinfiltration gezeigt, die zu späteren Analysezeitpunkten ebenfalls nicht mehr festgestellt wurde. Im Gegensatz zu den Adenovirusvektorversuchen hielt die Expression des *LacZ* Gens durch den AAV-Gentransfer weiterhin an (Xiao et al., 1996). In der Arbeit von Vassalli et al. wurde $2,5 \times 10^6$ gc AAV-Vektoren und 6×10^7 gc Adenovirusvektoren für die Expression des *eGFP* Gens (eGFP, enhanced green fluorescent protein) in CD-1 WT Mausherzen lokal injiziert (Vassalli et al., 2003). Der Gentransfer durch den Adenovirusvektor führte zu einer zwei Wochen andauernden Expression des *eGFP* Gens im Herzmuskel. Im Vergleich dazu wurde durch den AAV-Vektor eine bis zu 52 Wochen andauernden Expression von *eGFP* im Myokard erreicht (Vassalli et al., 2003). Durch Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbungen wurde gezeigt, dass im Bereich der Injektionsstelle sowohl in den Adenovirusvektor behandelten murinen Herzen (drei Tage nach Injektion), als auch in den AAV-Vektor behandelten (acht Wochen nach der Injektion) und in den mit Pufferlösung behandelten murinen Herzen Infiltrate von Immunzellen vorhanden waren (Vassalli et al., 2003). Aus diesem Grund, geht Vassalli et al. davon aus, dass zumindest ein Teil dieser Immunzellen dem Wundheilungsprozess diene, der durch die

Injektionsnadelverletzung hervorgerufen wurde (Vassalli et al., 2003). Zu späteren Analysezeitpunkten (AAV: 25 und 52 Wochen nach der Injektion) wurden im Bereich der *eGFP* exprimierenden Kardiomyozyten lediglich einzelne interstitielle mononukleare Zellen beobachtet (Vassalli et al., 2003). Diese Studien zeigen deutlich, dass der AAV-Vektor gegenüber dem Adenovirusvektor für eine lang andauernden Genexpression von Channelrhodopsin-2 im Herzmuskel die bessere Wahl ist.

Snyder et al. beschäftigten sich genauer mit der Immunantwort nach einer Gewebeverletzung durch die Injektionsspritze und dem AAV-Genstransfer in und um diesen Bereich (Snyder et al., 1997). Dafür wählten Snyder et al. das *LacZ* Gen zur Kontrolle des AAV-Genstransfers aus. Um eine schnelle Degeneration des Muskelgewebes zu simulieren und die Regeneration des Gewebes zu stimulieren wurde zunächst BaCl_2 (Bariumchlorid, als Lösung) in den Skelettmuskel des Hinterbeins einer weiblichen, sechs bis acht Wochen alten BALB/c Maus injiziert (Snyder et al., 1997). 30 Minuten nach der BaCl_2 Injektion wurde im selben Bereich der AAV-Vektor mit dem *LacZ* Gen injiziert (Virusvektormenge: $1,7 \times 10^7$ gc) (Snyder et al., 1997). Zwei Wochen nach der AAV-Injektion fanden Snyder et al. in Muskelzellen um den Injektionsbereich herum, die durch das BaCl_2 nicht degeneriert waren, eine stabile *LacZ* Genexpression vor. In Muskelzellen, durch das BaCl_2 geschädigt waren und in regenerierenden Muskelzellen war die *LacZ*-Expression vergleichsweise niedriger. In den BaCl_2 -geschädigten und regenerierenden Muskelzellen wurden zudem Immunzellinfiltrationen gefunden, die zwei und vier Wochen nach der AAV-Injektion in einer vergleichbar großen Anzahl vorhanden waren (genaue Anzahl nicht angegeben) (Snyder et al., 1997). Bei späteren Analysen (126 und 178 Tage nach der AAV-Injektion) sank die Anzahl der infiltrierenden Zellen wieder (genaue Anzahl nicht angegeben) (Snyder et al., 1997). Die Immunzellinfiltrationen waren nur auf regenerierende Zellen begrenzte, die gleichzeitig *LacZ* positiv waren (Snyder et al., 1997). Sie stellten somit fest, dass nach einer Gewebeverletzung die frühen Entzündungsprozesse den AAV-Genstransfer maßgeblich beeinträchtigten (Snyder et al., 1997). Snyder et al. nahmen an, dass die hohe Anzahl an Immunzellen im Injektionsbereich die körperfremden AAV-Vektoren oder die exprimierende Fremd-DNA somit schneller eliminierten (Snyder et al., 1997).

Die Analyse der Literaturrecherche zeigte, dass die lokale Injektion des AAV-Vektors in einer transienten Immunreaktion resultieren kann. Trotz dieser Immunreaktionen konnten lang andauernde Expressionen der transduzierten Gene nachgewiesen werden. Auffallend war, dass in diesen Fällen deutlich weniger als die in dieser Arbeit eingesetzten 2×10^{11} gc AAV-Vektoren eingesetzt wurden. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Versuchen die AAV-Dosis um ein und zwei Zehnerpotenzen auf 2×10^{10} gc und 2×10^9 gc gesenkt, um zu sehen, ob die Chr2-Expression länger als die bisher erreichten zwei Wochen anhält (Kapitel 4.1.4 und 4.1.5).

Die reduzierte AAV-Dosis von 2×10^{10} gc ermöglichte bei fast gleichbleibender Stimulationseffizienz (im Vergleich zu den Versuchen mit 2×10^{11} gc) die optische Stimulation des nativen Herzens drei Wochen nach der lokalen intramyokardialen Injektion (Kapitel 4.1.4). Dies war eine Woche länger als mit 2×10^{11} gc AAV2/1-ChR2. Vier Wochen nach der Injektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-ChR2 konnte jedoch keine ChR2-mCherry Expression mehr festgestellt werden. Die Gewebeschnitte (Abbildung 18C, F und I) zeigten, dass das Lumen des linken Ventrikels verhältnismäßig groß war im Vergleich zu dem schmalen Ventrikulomyokard bzw. zu der schmalen Herzwand (Beispiele für ein normales Verhältnis von Ventrikellumen und Ventrikulomyokard, z.B. Abbildung 18A, B, D, E, G und H). Aufgrund der oben beschriebenen Erkenntnisse von Snyder et al. (1997) wurde die veränderte Struktur des Ventrikels im Bereich der Injektionsstelle als das Resultat einer Immunzellinfiltration identifiziert. Die Verletzung des Herzmuskels durch den Injektionsstich löste vermutlich frühe Entzündungsprozesse aus. Die infiltrierenden Immunzellen initiierten offensichtlich die Apoptose und Phagozytose der verletzten Kardiomyozyten, wobei vermutlich vorwiegend die AAV-ChR2-mCherry positiven Zellen phagozytiert wurden. Durch weiteres Senken der Virusvektormenge auf 2×10^9 gc wurde versucht eine solche Immunantwort zu vermeiden. Zwei Wochen nach der AAV-Injektion waren diese Herzen optisch jedoch nicht stimulierbar. Die mCherry Fluoreszenzanalyse des ChR2-mCherry Fusionsproteins ergab sehr niedrige Werte, die unter dem in dieser Arbeit ermittelten Grenzwert von 1000 a.u. (*arbitrary units*, siehe Kapitel 4.1.4, Abbildung 17B und Kapitel 4.1.5, Abbildung 19) lagen. Aufgrund der fehlenden optischen Stimulierbarkeit war die Senkung der AAV-Menge auf unter 2×10^9 gc nicht nutzbar.

Da die lokale, intramyokardiale Injektion immer eine Gewebeverletzung des Herzmuskels bewirkte, wurde die systemische Injektion als alternative Verabreichungsform der AAV-Vektoren geprüft.

5.4 Systemische Adeno-assoziierte Virus (AAV) Vektor Injektion

Aufgrund der starken Immunreaktion der CD-1 WT Maus bei lokaler AAV-Injektion, wurde als Alternative die systemische Injektion von AAVs in die Blutzirkulation über eine Vene untersucht. Im Vergleich zur lokalen intramyokardialen Injektion erforderte die systemische Injektion von AAV keine aufwändige Öffnung des Brustkorbs, sondern erfolgte über einen minimalinvasiven Eingriff. Dadurch reduzierte diese Eingriffsart das Risiko einer Infektion direkt am Herzen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die systemische Injektion von AAV bei der CD-1 WT Maus durch Punktion der linken Halsvene *Vena jugularis* durchgeführt. Die Vene wurde nach einer kleinen Inzision am Hals dargestellt, wofür das Tier eine kurze inhalative Anästhesie erhielt.

Für die systemische Injektion wurde in dieser Arbeit der AAV2/9-Vektor verwendet, da dieser eine höhere Gewebespezifität für Kardiomyozyten hat als der AAV2/1. Prasad et al. zeigten in einem Vergleich von AAV-Vektoren, dass der Serotyp 9 die am effizientesten ist hinsichtlich der Transduktion des Herzmuskels nach systemischer Injektion (Prasad et al., 2011b).

Abbildung 23 zeigt das mCherry Fluoreszenz Signal in allen Bereichen des Herzens nach systemischer AAV-Injektion. Nicht jede Herzmuskelzelle exprimierte das ChR2-mCherry Fusionsprotein, wodurch die mCherry Fluoreszenz mosaikartig wirkte. Über die gesamte Fläche des Herzens gesehen war das Expressionsmuster jedoch weitestgehend homogen. Es wurde eine durchschnittliche Transduktion von 58.2 ± 6.5 % der Kardiomyozyten in den Herzen festgestellt (Kapitel 4.2.2, Abbildung 24). Wie bereits in der ChR2-Mauslinie, in der alle Muskelzellen das Fusionsprotein aus hChR2 und eYFP exprimierten (Bruegmann et al., 2010), zeigte sich auch nach dem AAV-basierten Gentransfer in dieser Arbeit eine membranständige Lokalisation des ChR2-mCherry Fusionsproteins.

Patch-Clamp Experimente zeigten lichtinduzierte Ionenströme in mCherry positiven Kardiomyozyten transduzierter Herzen, die zu Aktionspotentialen und Zellkontraktionen führten (Kapitel 3.9.1 und Kapitel 4.2.2, Abbildung 24). Hierdurch wurde das erste Mal gezeigt, dass das Channelrhodopsin-2 Gen durch viralen Gentransfer gezielt in Herzmuskelzellen eines Säugetiers exprimiert und das Protein zur optischen Stimulation genutzt werden konnte.

Die *in vivo* Stimulationsversuche wurden in dieser Arbeit an anästhesierten Mäusen mit geöffnetem Brustkorb durchgeführt (Kapitel 3.8.3 und 4.2.4). Dabei wurden unterschiedlich große Beleuchtungsflächen mit variierenden Lichtintensitäten verglichen ($10,2 \text{ mm}^2$, $25,3 \text{ mm}^2$ und $72,3 \text{ mm}^2$). Limitiert wurden die *in vivo* Versuche dadurch, dass das Herz *in vivo* nur über den linken Ventrikel stimuliert werden konnte, da es wegen der Blutgefäße im Thorax nicht frei beweglich ist.

Die *ex vivo* Stimulationsversuche dieser Arbeit wurden am Langendorff-Apparat durchgeführt. Das Herz wurde dabei retrograd durch die Aorta mit physiologischer Lösung perfundiert. Da das Herz bei diesen Versuchen an einer Perfusionsnadel hing konnte seine räumliche Lage verändert werden. Die *ex vivo* Versuche zeigten, dass fast alle Bereiche des transduzierten Herzens zur optischen Stimulation genutzt werden konnten, sowohl die Ventrikel als auch das rechte Atrium.

Ein Vergleich der gemessenen notwendigen Lichtintensitäten zwischen *in vivo* und *ex vivo* Versuchen bei der optischen Stimulation der Ventrikel in dieser Arbeit zeigte, dass die transduzierten Herzen in den *ex vivo* Versuchen bei niedrigeren Lichtintensitäten stimulierbar waren als in den *in vivo* Versuchen (Abbildung 30). Dafür könnten zwei Gründe verantwortlich sein. Der eine Grund wäre eine hormonelle Gegensteuerung während des *in vivo* Versuchs, da das Tier dabei narkotisiert war. Auf eine künstliche

Beschleunigung des Herzschlags hätte der Parasympathikus durch Ausschüttung von Acetylcholin negativ chronotrop einwirken können. Ein weiterer Grund kann die bessere Ausleuchtung der Herzoberfläche bei den *ex vivo* Versuchen sein. Durch die bessere Beweglichkeit perfundierter Herzen konnte eine optimale Position zur bestmöglichen optischen Stimulation gefunden werden. Die Korrelation zwischen beleuchteter Flächengröße und benötigter Energie wurde bereits in den Berechnungen der Rheobase festgestellt (Abbildung 27A). Je größer die optische Stimulationsfläche mit transduzierten Kardiomyozyten war, desto niedriger war die benötigte Lichtintensität. Ein dritter Grund kann der Ersatz von Blut durch externe Perfusionslösung (Tyrode Lösung) gewesen sein. Das Blut kann, vor Allem durch die roten Erythrozyten, einen wesentlichen Anteil vom Licht absorbiert haben. Die durchsichtige Perfusionslösung kann zu einer stärkeren Streuung des Lichts geführt haben. Jedoch konnte das Licht tiefer in das Gewebe eindringen, wodurch die beleuchtete Fläche vergrößert wurde.

Für die notwendige Lichtintensität war das Verhältnis von transduzierten und nicht transduzierten Kardiomyozyten im beleuchtenden Bereich ebenso ein bedeutender Faktor. Hierfür wurde eine quantitative Expressionsanalyse anhand von vereinzelt Kardiomyozyten durchgeführt. Transduzierte Herzen wurden nach den Stimulationsversuchen dissoziiert und die Anzahl der mCherry positiven und negativen Kardiomyozyten gezählt. Das sich daraus ergebende Verhältnis zwischen mCherry positiven und negativen Zellen wurde in Bezug zu den gemessenen mCherry Fluoreszenzintensitäten der analysierten Maus Herzen dargestellt (Kapitel 3.11.1 und 4.2.3). Mit diesen Analysen wurde eine Größenordnung von mindestens 30 – 40 % ChR2 positiver Kardiomyozyten abgeschätzt, die zur Stimulierbarkeit der Herzen notwendig waren (Abbildung 25B). Eine Analyse zur Korrelation zwischen prozentualem Anteil der ChR2 positiven Kardiomyozyten und der notwendigen Lichtintensität zur optischen Stimulation ergab nur eine leichte Korrelation zwischen $0,4 \text{ mW/mm}^2$ und $1,01 \text{ mW/mm}^2$ (Abbildung 28D).

Die lang andauernde Expression des Fusionsproteins ChR2-mCherry war ein besonderes Ergebnis der vorliegenden Arbeit, da das Transgen episomal in der Zielzelle vorliegt. Virale Episome sind Plasmide, die extrachromosomal neben dem Wirtsgenom vorliegen. Der native Adeno-assoziierte Virus (AAV) benötigt zur Replikation sogenannte Helferviren. Das sind in der Regel Adenoviren oder *Herpes simplex* Viren (Daya and Berns, 2008). Der AAV-Vektor, der in dieser Arbeit in der Form der zwei Serotypen AAV2/1 und AAV2/9 verwendet wurde (Zhang et al., 2007; Lock et al., 2010), enthält keine *Rep* Gene (Svensson et al., 1999), die zur Replikation des AAVs mit den Helferviren benötigt werden. Ohne diese *Rep* Gene fehlt dem AAV-Vektor die Fähigkeit seine Gene selbst zu replizieren. Da Herzmuskelzellen sich nicht teilen würde die Apoptose dieser AAV-Plasmid-tragenden Muskelzellen zunächst zu einer Verdünnung der AAV-Plasmide und zuletzt zum Verlust der ChR2-mCherry Expressionsfähigkeit

führen. Für die AAV-vermittelte transgene Expression in Kardiomyozyten wurde die Hypothese hinsichtlich einer zu kurzen Expressionsdauer durch das Ergebnis dieser Arbeit entkräftet (Vogt et al., 2015). Selbst 16 Monate nach der AAV-Injektion waren die transgenen Herzen sehr gut optisch stimulierbar (Abbildung 26D). Auch die Intensität der mCherry-Fluoreszenzsignale wies vergleichbare Werte auf wie die Herzen, die zwei und acht Monate nach der AAV-Injektion untersucht wurden (Abbildung 25B). Dieses Ergebnis zeigte eine länger andauernde Expression nach AAV-Genstransfer als die Versuche von Vassalli et al. mit maximal 52 Wochen (Vassalli et al., 2003).

Ein weiteres besonderes Ergebnis dieser Arbeit war die optische Stimulation des rechten Atriums, die zu einer fast physiologischen Ausbreitung der Erregung im Herz führte. Abbildung 23B und C zeigen die Expression des Fusionsproteins im Vorhof anhand der deutlichen mCherry Fluoreszenz. In einer Arbeit von Zaglia et al. wurde die ektopische ChR2 Stimulation im Atrium verifiziert (Zaglia et al., 2015). Die Expression im transgenen Tiermodell wurde in der Arbeit von Zaglia durch eine Cre-Aktivierung gesteuert und war unter der Kontrolle des α MHC Promotors (Zaglia et al., 2015). Die QRS-Komplexe hatten eine vergleichbare Form wie bei einer Sinusstimulation. Jedoch hatte die P-Welle aufgrund der optischen Stimulation eine veränderte Form (Zaglia et al., 2015). Dies wurde auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit beobachtet (Kapitel 4.2.7, Abbildung 32). Die optische Stimulation über den rechten Vorhof könnte für die Therapie von Sinusknotensyndrom Krankheiten (*sick sinus syndrom*) genutzt werden, da bei diesen Krankheiten die Fehlfunktion allein im Bereich des Vorhofs liegt.

Ein weiterer Punkt, der in dieser Arbeit untersucht wurde, war die Möglichkeit einer längeren optischen Stimulation. Die kontinuierliche Energiezuführung könnte zu einer belastenden Erwärmung des Herzmuskels führen. Mit Blick auf eine mögliche medizinische Anwendung als optogenetischer Herzschrittmacher wurde zehn Minuten lang eine überschwellige *in vivo* Stimulationen von transgenen Herzen an einer anästhesierten Maus durchgeführt (Kapitel 4.2.8). Es wurde gezeigt, dass eine fortlaufende optogenetische Stimulation von Extrasystolen möglich war. Der Vergleich spezifischer kardialer Parameter vor und nach der Lichtstimulation wies keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 33). Eine Beeinträchtigung der Herzphysiologie konnte durch 10 Minuten lange optogenetische Stimulation ausgeschlossen werden. Für eine therapeutische Anwendung sollten jedoch längere Versuche dieser Art durchgeführt werden, z.B. 60 Minuten, 1 Woche, 1 Monat, 1 Jahr und länger. Für solche langen optischen Stimulationen werden implantierte LEDs am oder im Herz benötigt. Bei einem Kleintiermodell wie der Maus ist das über einen entsprechend langen Zeitraum ein komplizierter Eingriff. Dafür sind größere Säugetiere wie Hunde oder Schweine sinnvoller. Für solche Versuche muss jedoch zuerst die AAV-Transduktion mit ChR2-mCherry bei dem entsprechenden Tiermodell untersucht und etabliert werden.

Bei einer Therapie muss eine unbewusste, ungewollte oder auch unkontrollierte Expression eines Transgens, in einem nicht anvisierten Gewebe, vermieden werden. Daher ist es notwendig die Expressionsaktivierung und den Tropismus des Vektors genauestens zu erforschen und so gut wie möglich anzupassen. Beim AAV-Gentransfer gibt es Möglichkeiten eine rein myokardiale Expression des Transgens zu realisieren. Eine Möglichkeit ergibt sich aus der Wahl eines optimalen Promotors, wie eine Studie mit kardialen AAV-Gentransfer zeigte. Darin wurde der kardiospezifische *cTnT* Promotor (cardiac troponin T) zur Regulation der Expression des Reportergens Luciferase verwendet (Prasad et al., 2011a). Das Hauptaugenmerk der Studie war jedoch der Tropismus Vergleich der AAV Serotypen 1-9. Die Kombination des AAV2/9 Vektors und des *cTnT* Promotors zeigte in der Studie die stärkste Luciferase Aktivität in Herzmuskelzellen nach einer intramyokardialen Injektion in den linken Ventrikel, bei acht bis zehn Wochen alten, männlichen C57BL/6 Mäusen. Da die Expression des Fusionsproteins Chr2-mCherry in dieser Arbeit vom ubiquitären CAG Promoter (Hitoshi et al., 1991) kontrolliert wurde, bestand die Möglichkeit einer ungewollten Expression in Leber, Skelettmuskeln, Lunge und Gehirn (Inagaki et al., 2006). Die histologischen Analysen dieser Organe zeigte neben einigen mCherry positiven Skelettmuskelzellen im Diaphragma, wenige mCherry Signale einzelner Leberzellen (Kapitel 4.2.9, Abbildung 34). Der Tropismus des rekombinanten AAV2/9 Vektors erreichte somit in der vorliegenden Arbeit ein außerordentlich gutes Ergebnis hinsichtlich der myokardialen Spezifität. Für noch selektiveren Tropismus des Vektors bietet die wachsende Zahl an unterschiedlichen Adeno-assoziierten Virusvektoren das Potential verschiedene Zell-, Gewebetypen und Organe zu transduzieren (Tabelle 3). Um die Expression eines Transgens möglichst auf Kardiomyozyten zu beschränken ist eine Veränderung der Gewebeaffinität des Vektors notwendig. Die Gewebeaffinität wird durch die Zusammensetzung der Kapside bestimmt. Die Transkapsidierung, die Kombination von Kapsiduntereinheiten unterschiedlicher AAV Serotypen, führte zu neuen veränderten Gewebetropismen (Kapitel 1.5). Beispiele hierfür wurden in dieser Arbeit eingesetzt (AAV2/1 und AAV2/9). Weiterhin zeigten Pulicherla et al. und Shen et al., dass genetische Veränderungen bzw. Anpassungen der Proteinstruktur des Kapsids zu einer angepassten Affinität des Vektors für bestimmten Zelltypen und Gewebe führen kann (Pulicherla et al., 2011; Shen et al., 2012). Pulicherla et al. zeigte, dass durch ungerichtete Mutagenese zwei Variationen des AAV9 Kapsids, AAV9.45 durch N498V und AAV9.61 durch W503R, ohne Leberaffinität erzeugt wurden. Die Fähigkeit kardiale und skelettale Muskelzellen zu transduzieren blieb in diesen Variationen weiterhin erhalten.

Die Ergebnisse zur systemischen Injektion von AAV2/9-CAG-Chr2-mCherry zeigen, dass die optische Stimulation des Herzens einer nativen Maus *in vivo* möglich ist und Potential für eine optische Herzschrittmachertherapie bietet. Zur weiteren Einordnung des Potentials von AAV für eine Herzinsuffizienztherapie wird im Folgenden auf die klinische Studienreihe CUPID eingegangen.

5.5 CUPID Phase 1 - Klinische Studien zur Therapie von Herzinsuffizienz mit AAV-Vektoren

Die ersten Studienreihe in der AAV2/1-SERCA2a zur Therapie von Herzinsuffizienz bei Menschen eingesetzt wurde war CUPID (Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease). Der übergeordnete primäre Endpunkt der CUPID Studien war die Überwachung der Sicherheit, während die sekundären Endpunkte Verbesserungen der körperlichen Aktivität und der Wirksamkeit umfassten. Hierzu wurden folgende klinischen Parameter untersucht: 1. der symptomatische Status der Patient*innen (NYHA-Funktionsklasse, Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire; MLWHFQ), 2. Der funktionelle Status der Patient*innen (maximale Sauerstoffaufnahme – VO₂max, 6-Minuten Geh-Test), 3. ein Blut-Biomarker-Spiegel (n-terminales pro Brain Natriuretisches Peptid, NT-proBNP), und 4. die linksventrikuläre Funktion und das Remodeling (Ejektionsfraktion und end-systolisches Volumen) (Jessup et al., 2011).

Die Phase 1 von CUPID wurde als entblindete und dosiseskalierende Studie an multiplen Studienzentren durchgeführt (Jaski et al., 2009). Es nahmen 12 Personen mit Herzinsuffizienz an der Phase 1 Studie teil und sie erhielten einzelne intrakoronare Injektionen von AAV1/SERCA2a. Dabei wurden die Dosisstufen $1,4 \times 10^{11}$ gc, 6×10^{11} gc und 3×10^{12} gc (*genome copies*) von AAV1/SERCA2a mit Placebo verglichen (Jaski et al., 2009). Die Auswahl der Patient*innen erfolgte unabhängig von der Ätiologie der Herzinsuffizienz, wobei alle der NYHA-Klasse III – IV angehörten und bei allen die derzeitigen pharmakologischen Therapien bereits ausgeschöpft waren. Bei mehreren Patient*innen wurde schon 6 Monate nach der Injektion eine Verbesserung der Symptome sowie der Struktur und Funktion des linken Ventrikels festgestellt. Zwei Patient*innen sprachen nicht auf die Therapie an und es wurde berichtet, dass sie neutralisierende Antikörper (NAb) gegen AAV1 hatten (Jaski et al., 2009). Nach 12 Monaten war das Ergebnis der Studie, dass die intrakoronare Injektion von AAV1/SERCA2a ein akzeptables Sicherheitsprofil für Personen mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz aufwies und eine deutliche Verbesserung der Symptome nachgewiesen wurde (Jaski et al., 2009). Der Erfolg der Phase 1 Studie führte zur zweiten Phase der CUPID Studie.

Die Phase 2 von CUPID war eine randomisierte, placebokontrollierte, multizentrische Doppelblindstudie (Jessup et al., 2011; Zsebo et al., 2014). Es wurden 39 Personen mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz ausgewählt, die dem NYHA-Stadium III – IV zugeordnet waren, sowie eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion ≤ 35 %, eine maximale Sauerstoffaufnahme (VO₂max) ≤ 20 ml/kg pro Minute und einen implantierten Defibrillator (ICD) hatten (Jessup et al., 2011). Weiterhin wurden die Studienteilnehmenden auf neutralisierenden Antikörper gegen AAV1 geprüft und es konnte bei den zugelassenen Personen keine nachgewiesen werden. Die intrakoronaren Injektionen

enthielten entweder Placebo oder eine der drei Dosisstufen 6×10^{11} gc, 3×10^{12} gc oder 1×10^{13} gc von AAV-SERCA2a. Die ersten 12 Monate nach der Injektion wurden die Patient*innen aktiv beobachtet und jede Veränderung der Symptomatik und Funktionsveränderung des Herzens festgehalten. Bereits innerhalb dieses Zeitraums wurde bei den Patient*innen mit der "hohen" Behandlungsdosis im Vergleich zur Placebogruppe eine deutliche Verbesserung der NYHA-Funktionsklasse, sowie des NT-proBNP Spiegels und der linksventrikulären Funktion festgestellt (Jessup et al., 2011). Zudem zeigte sich bei allen AAV1/SERCA2a-Gruppen eine signifikante Verlängerung der Zeit bis zu einem kardialen Ereignis (Jessup et al., 2011). Die folgenden 2 Jahren galten als Nachbeobachtungszeit, in der weiterhin das Risiko für wiederkehrende Herzrhythmusstörungen beobachtet wurde. Die Überlebenswahrscheinlichkeit für Patient*innen in allen AAV1/SERCA2a-Gruppen war im Vergleich zur Placebogruppe tendenziell höher, insbesondere in der Hochdosisgruppe. Die letztgenannte Gruppe zeigte im Vergleich zur Placebogruppe eine 82 %ige Risikoreduktion für wiederkehrende Herzrhythmusstörungen oder einem tödlichem Ereignis (Zsebo et al., 2014). Somit unterstützten die Daten aus der Langzeitbeobachtung die Ergebnisse aus der 12-monatigen aktiven Beobachtungsphase. Die Studienergebnisse zeigten ein günstiges Sicherheits- und Wirksamkeitsprofil für die Behandlung mit 1×10^{13} gc AAV1/SERCA2a.

Die eben genannten klinischen Studien zeigten erste positive Daten für den Einsatz von AAV zur Therapie von Herzinsuffizienz auf Basis der Überexpression von SERCA2a. Im folgenden Kapitel wird auf Folgestudien der eben beschriebenen CUPID Studien eingegangen. Die Ergebnisse dieser CUPID Phase 2 Studien wurden nach dem Ende dieser Arbeit veröffentlicht.

5.6 CUPID Phase 2 Studien

Die Ergebnisse der Phase 1 CUPID Studien führten zu drei Phase 2 Studien in denen AAV1/SERCA2a zur Therapie von menschlicher Herzinsuffizienz eingesetzt wurde: CUPID 2, AGENT-HF und SERCA-LVAD (Greenberg et al., 2014, 2016; Hulot et al., 2016, 2017).

Die CUPID 2 Studie war eine randomisierte, placebokontrollierte und multizentrische Doppelblindstudie, die an insgesamt 67 klinischen Zentren durchgeführt wurde (Greenberg et al., 2014, 2016). Für CUPID 2 wurden Personen mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz nicht nur aus den USA, sondern auch aus Europa und Israel rekrutierte. An der Phase 2b Studie nahmen insgesamt 250 Patient*innen teil, die der NYHA-Klasse II – IV angehörten und eine linksventrikuläre Ejektionsfraktion $\leq 35\%$ hatten. Die Patient*innen erhielten eine intrakoronare Injektion mit entweder 1×10^{13} gc AAV1/SERCA2a oder Placebo. Ein Jahr nach den Injektionen zeigten die Ergebnisse von CUPID 2 weder eine Reduktion der rezidivierenden Herzinsuffizienzereignisse noch der terminalen Ereignisse durch

AAV1/SERCA2a, im Vergleich zum Placebo (Greenberg et al., 2014, 2016). Dieses Ergebnis stand im klaren Gegensatz zu dem der CUPID 1 Studien. Mögliche Gründe für das neutrale Ergebnis von CUPID 2 und Implikationen für den AAV-Gentransfer von Chr2 werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit diskutiert.

Die AGENT-HF Studie war eine monozentrische, randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie, die in Frankreich durchgeführt wurde (Hulot et al., 2017). Bei der AGENT-HF wollte man im Besonderen den Einfluss der AAV1/SERCA2a Therapie auf das linksventrikuläre, endsystolische Volumen (LVESV) der erkrankten Personen untersuchen. Dafür wurde das LVESV der Patient*innen vor Behandlungsbeginn und während der Therapie durch eine kardiale Computertomographie (Kardio CT) gemessen. Zur AGENT-HF Studie wurden Patient*innen im NYHA-Stadium III - IV mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion $\leq 35\%$ zugelassen. Die Studie wurde mit 44 Teilnehmenden geplant, um ein signifikantes Ergebnis zu ermitteln (Hulot et al., 2017). Jedoch erhielten lediglich 9 Studienteilnehmer*innen eine intrakoronare Injektion, wovon 5 AAV1/SERCA2a (1×10^{13} gc) und 4 Placebo Injektionen waren. Aufgrund des nicht positiven Studienergebnisses der CUPID 2 Studie wurde die Rekrutierung und Verteilung von Studienteilnehmern bei AGENT-HF gestoppt. Die Teilnehmer*innen, die bereits die Injektion erhalten hatten wurden jedoch weiterhin untersucht. Als primärer Endpunkt der Studie wurde die Veränderung des LVESV 6 Monate nach der Injektion gemessen. Die Auswertung nach diesem Zeitraum ergab, dass die AAV1/SERCA2a-Gruppe mit 4,4 % im Vergleich zur Placebo-Gruppe mit nur 1,6 % eine stärkere Volumenvergrößerung der LVESV hatte (Hulot et al., 2017). Einen vergleichbaren Trend zeigten auch die sekundären Endpunkte, die anhand von Veränderungen im linksventrikulären enddiastolischen Volumen, der Ejektionsfraktion, im VO_2 max Wert und der Konzentration von NT-proBNB im Blut gemessen wurden. Jedoch erreichten die Ergebnisse bei den geringen Gruppengrößen keine Signifikanz (Hulot et al., 2017).

Die SERCA-LVAD Studie in Großbritannien war die dritte der Phase 2 Studien des AAV1/SERCA2a Programms. Diese war ebenfalls eine randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie, zu der Personen mit einer chronischen Herzinsuffizienz zugelassen wurden. Ein besonderes Kriterium zur Teilnahme an dieser Studie war, dass die Patienten*innen ein linksventrikuläres Kreislaufunterstützungssystem (LVAD) implantiert haben mussten. Das ist eine mechanische Förderpumpe, die Herzen mit einer zu schwachen Pumpleistung unterstützen. Das Ziel der SERCA-LVAD Studie war zu bestätigen, dass die AAV1/SERCA2a Therapie eine Steigerung der Ca^{2+} Konzentration im Sarkoplasmatischen Retikulum von LVAD Patient*innen bewirkte. Der Expression des exogenen AAV1/SERCA2a wurde durch RT-qPCR (quantitative Reverse-Transkription PCR, auch qPCR) von der vektorbasierten SERCA2a mRNA nachgewiesen. Dafür wurden kardiale Gewebebiopsien durchgeführt, bzw. Gewebeproben von transplantierten Herzen von an der Studie teilnehmenden

Personen entnommen. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob sich die ventrikuläre Pumpfunktion insoweit verbessern ließe, sodass eine LVAD Therapie nicht mehr notwendig wäre (Lyon et al., 2020). Die Hypothese beruhte auf Daten von Terracciano et al., die zeigten, dass Veränderungen in der Erregungs-Kontraktions-Kopplung (elektromechanische Kopplung) von Kardiomyozyten spezifisch mit der klinischen Erholung nach LVAD in Verbindung stehen (Terracciano et al., 2004). Die Veränderungen der Erregungs-Kontraktions-Kopplung in Terraccianos Arbeit wiesen darauf hin, dass der Ca^{2+} -Transfer entlang der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums eine wichtige funktionelle Determinante bei Patienten mit Herzinsuffizienz ist (Terracciano et al., 2004). Die SERCA-LVAD Studie wurde mit 24 Teilnehmenden geplant, die in einem Verhältnis von 2:1 zwischen AAV1/SERCA2a und Placebo randomisiert werden sollten (Lyon et al., 2020). Zum Zeitpunkt der Bekanntgabe des Ergebnisses der CUPID 2 Studie hatten lediglich 5 Personen eine intrakoronare Injektion erhalten. Davon waren 4 Patient*innen mit AAV1/SERCA2a (1×10^{13} gc) und 1 Patient*in mit Placebo injiziert. 6 Monate nach der Injektion zeigten PCR Analysen, dass vektorbasierte SERCA2a mRNA Gene in den Herzen exprimiert wurde (Lyon et al., 2020). Weiterhin zeigten histologische Untersuchungen transplanteder Herzen von AAV1/SERCA2a Patient*innen keine entzündungsfördernden Infiltrationen und nur wenig Fibrose (Lyon et al., 2020). Im Gegensatz zu den anderen AAV1/SERCA2a Studien wurden bei dieser Studie ELISPOT Analysen durchgeführt, um neutralisierende AAV1 Antikörper zu detektieren. Diese Analysen wurden vor der Injektion, sowie 3 und 6 Monate nach der 1×10^{13} gc AAV-Injektion durchgeführt. Dadurch zeigte sich, dass zu Beginn der Studie keine spezifischen AAV1 Antikörper im Serum der untersuchten Patient*innen war. Bei 2 teilnehmenden Personen wurden 3 Monate nach der Injektion und bei einem dieser Teilnehmenden ebenso nach 6 Monaten neutralisierende AAV1 Antikörper festgestellt (Lyon et al., 2020). Die Ergebnisse dieser Studie beruhten aufgrund des frühzeitigen Abbruchs auf einer kleinen Gruppengröße was zu einer Einschränkung in der Interpretation der Ergebnisse und deren Aussagekraft aufgrund mangelnder statistischer Analysen führte.

Ein Hauptziel aller klinischen Studien mit AAV1/SERCA2a war es zu zeigen, dass die Gentherapie mit dem AAV-Vektor sicher ist. Auch bei der SERCA-LVAD Studie gab es keine klinischen oder labortechnischen Anomalien, die auf die Verabreichung des AAV1/SERCA2a-Vektors in der untersuchten Dosis zurückzuführen waren (Lyon et al., 2020).

Aufgrund des niedrigen Expressionslevels von SERCA2a verglichen Lyon et al. qPCR Daten aus den vorhergehende AAV1/SERCA2a Studien mit der eigenen Studie. Sie stellten fest, dass die Menge der gemessenen viralen Genkopien in einem ähnlichen Bereich lag (Lyon et al., 2020). Bei CUPID 2 wurden $<10 - 192$ ssDNA gc/ μg menschlicher DNA gefunden (aus Biopsien von 7 Patient*innen) (Greenberg et al., 2016). In der Agent-HF Studie wurde bei der einzigen myokardialen Gewebeprobe, 18 Monate nach der Injektion, durch qPCR keine AAV1/SERCA2a DNA nachgewiesen (Hulot et al., 2017). Bei der LVAD

Studie wurden 23 – 80 ssDNA gc/ μ g menschlicher DNA nachgewiesen (aus einer endomyokardialen Gewebebiopsieprobe bei der Nachuntersuchung und aus einer Gewebeanalyse eines explantierten Herzens, von 2 Studienteilnehmenden) (Lyon et al., 2020). Lyon et al. bemerkte, dass in präklinischen Klein- und Großtiermodellen für Herzversagen höhere Werte mit 8000 – 42000 ssDNA gc/ μ g DNA festgestellt wurden (Lyon et al., 2020). Ein Grund für ein höheres Expressionslevel kann eine höhere Injektionsdosis sein. Bei weiteren klinischen Studien zur Behandlung monogener Krankheiten wurde die AAV-Dosis in Relation zum Körpergewicht des Patienten verabreicht. Für einen beispielhaften Patienten der CUPID Phase-2 Studien, mit einem Gewicht von 60 kg, hätte die verabreichte Dosis von 1×10^{13} gc AAV1/SERCA2a eine Konzentration von $1,7 \times 10^{11}$ gc/kg gehabt. Die Konzentration der CUPID Phase-2 Studien ist geringer als beispielsweise in folgenden klinischen Studien, die alle einen therapeutischen Effekt nachweisen konnten: Hämophilie B Faktor IX Gentherapie (5×10^{11} gc/kg Körpergewicht) (George et al., 2017), Hämophilie B Faktor VIII-Gentherapie (6×10^{12} gc/kg – 6×10^{13} gc/kg Körpergewicht) (Rangarajan et al., 2017) und Spinale Muskelatrophie Typ 1 SMA1 Gentherapie ($6,7 \times 10^{13}$ gc – $2,0 \times 10^{14}$ gc/kg Körpergewicht) (Mendell et al., 2017). Dies führt zu dem Schluss, dass die AAV1/SERCA2a Gentherapie-Studien nicht effektiv verabreicht wurden. Die niedrige AAV1-SERCA2a-Vektorkonzentration war ein Grund für die geringe SERCA2a Expression im Myokard (Greenberg et al., 2016).

Die CUPID Phase-2 Studien zeigen, dass der Einsatz von AAVs als Vektor prinzipiell bei Patienten möglich ist. Weiterhin zeigen Sie, dass für eine wirksame Expressionsstärke unbedingt die minimale Konzentration ermittelt werden sollte.

5.7 Maximale Obergrenze der AAV-Vektor Konzentration

Um ein notwendiges Expressionslevel eines Proteins zu erreichen ist die Erhöhung der Vektor DNA-Konzentration eine mögliche Schlussfolgerung. Studien von Hinderer et al. und Hordeaux et al. zeigen jedoch, dass es eine toxische Obergrenze für die AAV-Vektor Konzentration zu geben scheint (Hinderer et al., 2018; Hordeaux et al., 2018). Hinderer et al. verabreichte AAVhu68, eine AAV9 Variante, systemisch an 14 Monate alte Rhesusaffen ($n = 3$) und an bis zu 30 Tage alte Mikro-Yucatan-Schweine ($n = 3$). Allen Tieren wurde 2×10^{14} gc/kg von AAVhu68 systemisch injiziert (Hinderer et al., 2018). In der Studie wurde das humane SMN Gen (SMN, survival of motor neuron) vom AAVhu68-Vektor transportiert (Hinderer et al., 2018), dessen Genprodukt in mehreren grundlegenden zellulären homöostatischen Prozessen, darunter beim Aufbau des Spleißosoms (RNA-Proteinkomplex, dass den RNA-Spleißvorgang katalysiert) und der Biogenese von weiteren Ribonukleoproteinen involviert ist (Chaytow et al., 2018). Die erste wichtige Bedeutung des SMN Proteins wurde durch eine Mutation in seinem kodierenden Gen SMN1 entdeckt, da es mit der neuromuskulären Krankheit Spinale

Muskelatrophie (SMA) in Verbindung gebracht wurde (Lefebvre et al., 1995). Die Spinale Muskelatrophie ist einer der häufigsten genetischen Ursachen für der Kindersterblichkeit (Lefebvre et al., 1995). Hinderer et al. zeigen in ihrer Studie, dass in spinalen Motoneuronen von heranwachsenden Rhesusaffen und Ferkeln eine potentiell therapeutische Expression von SMN erreicht werden kann (Hinderer et al., 2018). Es traten jedoch bei beiden Modeltieren unerwartete Toxizitäten auf. Ein Affe musste am fünften Tag nach der AAV-Injektion eingeschläfert werden, da er Anzeichen eines Schocks zeigte, darunter Atemnot und erweiterte Pupillen. Das Blutbild wies eine ausgeprägte Transaminasenerhöhung (Anzeichen für Leberzellschäden) im Zusammenhang mit systemischer Entzündung auf (Hinderer et al., 2018). Histologische Untersuchungen bestätigten die ausgedehnte Nekrose in der Leber. Weiterhin wurden Anzeichen für eine disseminierte intravaskuläre Gerinnung mit ausgedehnten Blutungen im Bauchraum festgestellt (Hinderer et al., 2018). Die anderen zwei Primaten waren während der gesamten Studie klinisch unauffällig. Ihr Blutbild wies an Tag 5 nach der Injektion eine Thrombozytopenie auf (Mangel an Blutplättchen), wobei der Wert an Tag 14 normalisiert war (Hinderer et al., 2018). Die Blutuntersuchungen waren während des Verlaufs der Studie unauffällig. Am 28. Studientag wurden beide Tiere eingeschläfert, um histologische Analysen durchzuführen. In der Leber wurde bei beiden Affen eine minimale multifokale hepatozelluläre Nekrose nachgewiesen (Hinderer et al., 2018). Weiterhin wurde eine minimale bis leichte Degeneration der Neuronen des Rückenmarks und der peripheren Nerven beobachtet (Hinderer et al., 2018). Bei der AAV-Injektion der Mikroschweine war ein Tier 7 Tage und die anderen zwei 30 Tage alt. Das jüngere Tier wurde am 14. Studientag aufgrund von fortschreitenden neurologischen Störungen eingeschläfert (Hinderer et al., 2018). Das Ferkel entwickelte eine Ataxie der Hintergliedmaßen, die durch einen schwankenden Gang mit intermittierendem Knicken und Überkreuzen der Hintergliedmaßen gekennzeichnet war (Hinderer et al., 2018). Dieses Ferkel entwickelte auch eine Atemnot, aber die Auskultation aller Lungenfelder war innerhalb normaler Grenzen (Hinderer et al., 2018). Die anderen beiden Ferkel entwickelten am 11. und 12. Untersuchungstag ähnliche neurologische Symptome wie das erste Ferkel, jedoch wurde bei ihnen keine Dyspnoe beobachtet. Beide Ferkel wurden am 13. Untersuchungstag aufgrund des Fortschreitens der neurologischen Symptome eingeschläfert (Hinderer et al., 2018). In der Studie von Hordeaux et al. wurde adulten Rhesusaffen AAV9 und AAV-PHP.B systemisch verabreicht. AAV-PHP.B ist eine weitere AAV9 Variante, die bei Mäusen einen hohen Tropismus für Neuronen des zentralen Nervensystems gezeigt hat (Hordeaux et al., 2018). Hordeaux et al. verabreichten vier Affen AAV-Vektoren, die das GFP Gen transportierten. Einer der Affen erhielt den AAV9-Vektor in einer Konzentration von 2×10^{13} gc/kg. Der zweite Affe erhielt den AAV9-Vektor mit $7,5 \times 10^{13}$ gc/kg. Dem dritten Affen wurde der AAV-PHP.B-Vektor mit 2×10^{13} gc/kg injiziert und der vierte Affe erhielt den AAV-PHP.B-Vektor mit $7,5 \times 10^{13}$ gc/kg (Hordeaux et al., 2018). Alle Vektoren führten in beiden Konzentrationen zu einer niedrigen Expression

von GFP in den Neuronen des Zentralen Nervensystems (Hordeaux et al., 2018). In Organen, die nicht von der Bluthirnschranke geschützt sind, wie dem dorsalen Spinalganglion, Leber und Skelettmuskeln wurde eine deutliche GFP Expression festgestellt (Hordeaux et al., 2018). Im Besonderen führte die Transduktion durch AAV-PHP.B zu einer mindestens 4-fach höheren Expression von GFP in der Leber als mit dem AAV9-Vektor (Hordeaux et al., 2018). In den Skelettmuskelzellen bewirkte die Transduktion durch AAV9 mit $7,5 \times 10^{13}$ gc/kg die höchste Expression von GFP, gefolgt von der Transduktion mit 2×10^{13} gc/kg des AAV-PHP.B-Vektors (Hordeaux et al., 2018). Die beiden Affen mit der niedrigen Vektordosis (AAV9 und AAV-PHP.B mit 2×10^{13} gc/kg) vertrugen die Vektoren gut ohne klinische Folgen oder Laboranomalien, mit Ausnahme erhöhter Alanin-Aminotransaminasen (ALT) Werte ab Tag 14 (Hordeaux et al., 2018). Steigende Werte der Transaminasen im Blutserum sind Anzeichen für Leberzellnekrosen. Die Autoren vermuten, dass dies hier auf eine T-Zellen-Reaktion hinsichtlich des transgenen GFPs zurückzuführen war (Hordeaux et al., 2018). Ebenso hat der Affe mit der $7,5 \times 10^{13}$ gc/kg AAV9 Injektion den Vektor gut vertragen, ohne klinische Folgen oder Laboranomalien bis auf eine deutliche Erhöhungen der Aspartat-Aminotransaminase (AST) und der Alanin-Aminotransaminase (ALT) ab Tag 7 (Hordeaux et al., 2018). Die hohe Dosis des AAV-PHP.B-Vektors ($7,5 \times 10^{13}$ gc/kg) führte bei dem Affen innerhalb der ersten 5 Tage zu einer deutlichen Erhöhung beider Serumtransaminasen (ALT und AST), sowie einer ausgeprägten Thrombozytopenie (Mangel an Blutplättchen) und diffusen Blutungen (Hordeaux et al., 2018). Der Affe wurde an Tag 5 aufgrund der toxischen Entwicklung der Laborwerte eingeschläfert.

Die Studien von Hinderer et al. und Hordeaux et al. verdeutlichen, dass es eine toxische Obergrenze für die AAV-Vektor Konzentration zu geben scheint. In den Studien wurden diese toxischen Effekte durch Varianten des AAV9-Vektors ab einer Konzentration von $7,5 \times 10^{13}$ gc/kg verursacht. Was der Grund der Toxizität ist können die Autoren dieser Studien nicht beantworten (Hinderer et al., 2018; Hordeaux et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit war die höchste eingesetzte Konzentration $5,6 \times 10^{12}$ gc/kg (2×10^{11} gc pro Maus). Die histologischen Untersuchungen der transgenen Herzen in dieser Arbeit zeigten bei den lokal injizierten Versuchen eine Infiltration von Immunzellen (CD 45 positive Zellen) im Bereich der Einstichstelle der Injektionsnadel (Kapitel 4.1.3 - 4.1.5). Es ist anzunehmen, dass die AAV Konzentration in der direkten Umgebung der Injektionsnadel so hoch war, dass sie wie in den Studien von Hinderer et al und Hordeaux et al. eine Immunantwort in Gang setzte. In den transgenen Herzen der systemischen Injektionsversuche waren keine auffällig hohen Immunzellhäufungen festzustellen. Weiterhin wurden bei den systemischen Injektionsversuchen der vorliegenden Arbeit der AAV9-Vektor verwendet. Die AAV9 Versuche in der Studie von Hordeaux et al. hatten keine klinischen Folgen und Laboranomalien für die Versuchstiere zur Folge.

Die präklinischen Studien an Primaten und Schweinen zeigen, dass die maximale Konzentration für AAV-Vektoren geprüft werden sollte, damit toxische Effekte vermieden werden.

5.8 Aussichten für eine mögliche klinische Anwendung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, wie das Channelrhodopsin-2 (ChR2) Gen mithilfe von Adeno-assoziierten Virusvektoren (AAV-Vektoren) in die Herzmuskelzellen eines nativen Organismus eingebracht werden kann und dass die Expression des transgenen ChR2 im nativen Mausherz eine optische Stimulation ermöglicht. Mit Blick auf eine medizinische Anwendung von ChR2 wurden in der vorliegenden Arbeit zum einen die lokale Injektion und zum anderen die systemische Injektion von AAV-Vektoren als mögliche Applikationswege untersucht (Kapitel 4.1 und 4.2).

Die lokale Injektion von AAV-Vektoren führte zu einer Transduktion einzelner, begrenzter Bereiche mit AAV-ChR2-mCherry. Der wichtigste Vorteil gegenüber der systemischen Injektion ist die direkte Injektion ins Zielgewebe, wodurch der Expressionsbereich bestimmt werden kann. Weiterhin kann die Belastung anderer Organe durch den Virusvektor reduziert und die Wahrscheinlichkeit einer Expression des eingebrachten Gens in einem anderen Teil des Körpers minimiert werden. Während der Implantationsoperation eines zukünftigen, optischen Stimulationssystems könnte die Injektion der AAV-Vektoren lokal am Herzen erfolgen. Ein Nachteil der lokalen Injektion ist die starke Immunreaktion, die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit innerhalb von zwei bis drei Wochen zum Verlust der optischen Stimulierbarkeit und zur Fibrose großer Bereiche des Ventrikelmyokards geführt hat. Wie bereits in Kapitel 1.5 beschrieben, zeigen Literaturdaten, dass auch beim Menschen neutralisierende Antikörper (NAB) die Expression von AAV transportierten Genen verhindern können (Calcedo et al., 2009; Greenberg et al., 2015). Demnach muss für eine medizinische Therapie ein passender AAV-Vektor gefunden oder durch gezielte Mutagenese kreiert werden, für den keine neutralisierenden Antikörper vorhanden sind.

Die zweite Injektionsmethode, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde war die systemische Injektion von AAV über eine Vene. Der Serotyp AAV2/9 zeigte in dieser Arbeit einen sehr spezifischen Tropismus für murine Kardiomyozyten. Einen entsprechenden Serotyp für die systemische Anwendung am Menschen zu finden oder zu entwickeln wäre ein Thema für zukünftige Arbeiten. Wie lange das Transgen nach einer systemischen AAV-Injektion in ausreichender Weise exprimiert, wurde in dieser Arbeit im Mausmodell mit bis zu 16 Monaten beantwortet. In einer Studie von Dutta und Sengupta wurde das Verhältnis von Maus- und Menschenalter in den unterschiedlichen Lebensabschnitten berechnet (Dutta and Sengupta, 2016). Laut dieser Studie sind 3,65 Tage einer adulten Maus äquivalent mit einem Jahr eines adulten Menschen. Demnach sind 16 Monate einer adulten Maus

gleichzusetzten mit rund 130 Jahren eines erwachsenen Menschen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass eine systemisch verabreichte AAV Therapie auch beim Menschen zu einer lang andauernden Expression führen würde. Für eine zukünftige therapeutische AAV Anwendung am Menschen könnte die Injektion zu einer Art Impfung oder Infusion weiterentwickelt werden.

Die transgenen, murinen Herzen dieser Arbeit konnten bereits ab $< 0,2 \text{ mW/mm}^2$ Lichtintensität optisch zu Extrasystolen stimuliert werden (Kapitel 4.2.5., Abbildung 29). Diese hohe Sensitivität hatte den Vorteil, dass die $1,5 \text{ mW/mm}^2$ Lichtintensität für die 10 Minuten langen optischen Schrittmacherstimulation keine störende Hitzeentwicklung bewirkte. Dies hätte physiologische Parameteränderungen wie z.B. einen höheren Puls hervorgerufen, was nicht der Fall war. Die hohe Sensitivität der transgenen, murinen Herzen warf jedoch hinsichtlich der optischen Impulse die Frage auf, ob die Herzmuskelzellen durch die Hautschichten von externen Lichtquellen zu Extrasystolen angeregt werden können. Die Lichtintensitätsmessung hinter Hautlappen mit Fell von Mäusen zeigte, dass 99,8 % der applizierten Lichtintensität absorbiert wurde (Kapitel 4.2.10). Eine externe Lichtquelle, die ausreichend Lichtintensität zur Erregungsaktivierung durch das Hautgewebe hätte, ist im normalen Alltag mit Sicherheit nicht anzutreffen.

Aufgrund der erfolgreichen systemischen AAV Transduktion und der optischen Stimulierbarkeit der murinen Herzen wurden nach Beendigung dieser Arbeit weitere Versuche hinsichtlich optogenetischer Defibrillation durchgeführt (Bruegmann et al., 2016, 2018), die nicht Teil dieser Promotion sind. Es wurde gezeigt, dass Arrhythmien der Ventrikel (Bruegmann et al., 2016) und der Atrien (Bruegmann et al., 2018) nach systemischer AAV-ChR2 Injektion durch optische Stimuli gestoppt werden können. Arrhythmien der Herzkammern wie ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern sind krankhafte Herzrhythmusstörungen. Sie sind durch schnelle und unkoordinierte elektrische Erregungen des Herzmuskels gekennzeichnet und können zu einem Pumpversagen und zum plötzlichen Herztod führen (Bruegmann et al., 2016). Arrhythmien in den Atrien, sogenanntes Vorhofflattern bzw. Vorhofflimmern, sind die häufigsten Herzrhythmusstörungen mit erheblichen Auswirkungen auf Morbidität und Mortalität sowie zunehmender Inzidenz und Prävalenz (Bruegmann et al., 2018; Lip et al., 2012). Die derzeit modernste Therapie für diese ventrikulären Herzrhythmusstörungen ist die Defibrillation durch Abgabe von hochenergetischen elektrischen Schocks (Bruegmann et al., 2016). Die Elektroschocks erfordern jedoch hohe elektrische Ströme, die erhebliche Schmerzen und Unannehmlichkeiten für den Patient*in verursachen und das Herz schädigen können (Bruegmann et al., 2018). Aus diesem Grund wird die elektrische Defibrillation von Vorhofflimmern unter Kurznarkose durchgeführt damit der Patient keine Schmerzen wahrnimmt. Der Vorteil der optogenetischen Defibrillation hierbei wäre eine schmerzlose Anwendung, da die Stimulation durch Licht erfolgt und nicht durch elektrische Impulse. Somit würden Schmerzrezeptoren nicht durch elektrische Stimuli

angeregt werden. Ein weiterer wichtiger Vorteil der optogenetische Stimulation im Vergleich zur elektrischen Defibrillation ist die Möglichkeit einer konstanten Depolarisation von ChR2 positiven Kardiomyozyten durch kontinuierliche Beleuchtung (Sasse et al., 2019). Dabei wird die beleuchtete Region des Myokards in absoluter Refraktärität gehalten und eine (Wieder-) Erregung verhindert (Sasse et al., 2019). Eine solche Blockierung der Reizleitung löscht die arrhythmische Wellenfront aus, wenn die Reizleitung durch die beleuchtete Region für die Aufrechterhaltung der Arrhythmie wesentlich ist (Bruegmann et al., 2016; Sasse et al., 2019).

Für eine mögliche medizinische Anwendung als implantierter Schrittmacher oder Defibrillator muss eine Lichtquelle gefunden werden, die in den Körper transplantiert und am Herz befestigt werden kann. Eine solche Lösung stellen Xu et al. anhand eines künstlichen, biegsamen Integuments vor (Xu et al., 2014). Dieses Integument ist flexibel und wird dem lebenden Herz auf- oder umgelegt. Das Besondere an diesem Integument ist, dass es Elektroden für EKG-Ableitungen, Sensoren zur pH- und Temperatur- Messung, sowie Micro-LEDs (μ -iLED) enthält (Xu et al., 2014). Die Elastizität dieser Membran erlaubt es, dass alle Sensoren gleichzeitig die Herzoberfläche berühren (Xu et al., 2014). Bei einer medizinischen Anwendung kann das EKG gleichzeitig von verschiedenen Bereichen des Herzens gemessen werden, wodurch Störungen der Reizweiterleitung direkt erkannt werden können. Die im Integument vorhandenen μ -iLEDs (*inorganic light-emitting diodes*, anorganische LEDs) könnten das Herz von allen Seiten optisch über das Epikard stimulieren (Xu et al., 2014). Ein solches Integument hat das Potential ein defektes Reizweiterleitungssystem durch optische Stimulation zu imitieren. Es ist vorstellbar, dass unterschiedliche Arrhythmien in Echtzeit erkannt und durch entsprechend individuelle, optische Stimulationsmuster therapiert werden könnten.

Die optische Stimulation muss nicht als endgültige Therapielösung für gesehen werden. Der medizinische Nutzen von ChR2 zur optischen Stimulation des Herzens kann für Patient*in als Zwischenlösung dienen bis diese ein gesundes Transplantationsherz erhalten. Dies gilt für die lokale, sowie auch für die systemische Injektion von AAV-ChR2.

5.9 Fazit

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Transfer des ChR2 Gens in das native Mausherz durch Adeno-assoziierte Virusvektoren möglich ist. Zudem wurde ChR2 ausreichend Menge exprimiert, sodass das Herz optisch stimulierbar war. Als Applikationswege wurden die lokale und die systemische Injektion verglichen. Die lokale Injektion von AAV2/1-ChR2 ermöglichte lediglich eine über 1 bis 2 Wochen andauernde optische Stimulierbarkeit. Der Grund für diesen Zeitraum war nachweislich eine Immunreaktion. Die systemische Injektion direkt in die Blutbahn durch Punktion einer Halsvene führte

zur Transduktion der Kardiomyozyten in allen Bereichen des Herzens. Hierdurch konnte das Herz durch optische Stimulation unterschiedlicher Stellen des Perikards zu Extrasystolen erregt werden. Selbst 16 Monate nach der Injektion war die Expression des ChR2 vergleichbar stark zu früheren Messzeitpunkten (2 und 8 Monate), sodass die Lichtintensität für eine optische Stimulation nicht erhöht werden musste.

Folgende Themen sollten für eine medizinischen Anwendung beim Patient*in weiter erforscht werden:

1. Jeder Organismus hat ein individuelles Immunsystem. Es kann davon ausgegangen werden, dass Patient*innen für unterschiedliche Viruskapside neutralisierende Antikörper (NABs) haben werden, die eine Immunreaktion hervorrufen können. Eine erfolgreiche Therapie ist dann unwahrscheinlich. Vor jeder Anwendung von AAV-Vektoren sollte das Vorhandensein von entsprechenden neutralisierenden Antikörpern geprüft werden. Intensive Forschung kann Viruskapside mit ähnlichem Tropismus hervorbringen, die vom Immunsystem nicht wahrgenommen werden. Weiterhin kann Forschung auf diesem Gebiet Viruskapside mit spezifischeren Gewebetropismen finden oder kreieren. Dadurch würde die Spezifität bestimmte Zielzellen zu transduzieren erhöht und die biologische Sicherheit weiter verbessert werden.
2. Die Wahl eines zell- bzw. gewebespezifischen Promotors ist obligatorisch. Zum einen fördert ein solcher Promotor die biologische Sicherheit, indem die Expression auf bestimmte Zielzellen begrenzt werden kann. Zum anderen ist die richtige Wahl des Promotors notwendig um eine ausreichend hohe und stabile Expression des gewünschten Gens zu gewährleisten.
3. Eine Besonderheit der optogenetischen Stimulation von Muskelzellen ist, dass keine Schmerzen hervorgerufen werden können, da keine Neurone aktiviert werden. Dies soll durch einen passenden AAV-Vektor und zell- bzw. gewebespezifischen Promotors ermöglicht werden.
4. Die Konzentration der AAV-Vektoren ist äußerst wichtig bei einer medizinischen Anwendung. Die Konzentration des Transportvektors darf nicht zu niedrig sein, damit der gewünschte therapeutische Effekt erreicht wird. Gleichzeitig darf die Konzentration nicht zu hoch sein, da sonst toxische Effekte auftreten können.

Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit bilden die Basis für den Transfer von Channelrhodopsin-2 in das native Herz und der optischen Stimulation desselben. Die optogenetische Stimulation des Herzens kann als Alternative zu den konventionellen, elektrischen Herzschrittmachern oder Defibrillatoren weiterentwickelt werden und eine schmerzlose Therapie von Arrhythmien darstellen.

6 Zusammenfassung

Die Optogenetik ist eine innovative Methode, die die transgene Expression von lichtsensitiven Proteinen verwendet zur elektrophysiologischen oder biochemischen Stimulation von Zellen durch Beleuchtung. Das Beleuchten mit blauem Licht der Wellenlänge von $\lambda = 470$ nm löst in lichtsensitiven Kardiomyozyten, die den Kationenkanal Channelrhodopsin-2 (ChR2) exprimieren, eine Depolarisation mit anschließendem Aktionspotential aus (Boyden et al., 2005; Nagel et al., 2003). Dies ermöglicht eine optogenetische Stimulation von Herzen, was zuvor *in vivo* im transgenen Zebrafisch-Embryo und in der adulten Maus gezeigt wurde, wobei in diesen transgenen Tiermodellen alle Kardiomyozyten das ChR2 Protein exprimierten (Arrenberg et al., 2010; Bruegmann et al., 2010). Der nächste Schritt zu einer medizinischen Therapie als optogenetischer Herzschrittmacher oder Defibrillator, ist daher der Gentransfer von Channelrhodopsin-2 in ein natives, nicht transgenes Herz.

Die vorliegende Arbeit untersuchte zwei Applikationswege für Adeno-assoziierte Virusvektoren, um eine stabile Expression von ChR2 im Mauserz zu erreichen: 1. Die lokale Injektion direkt in das Myokard und 2. die systemische Injektion über die Blutbahn durch Punktion einer Vene. Beide Methoden resultierten in Genexpression von ChR2 im nativen Herzen und erfolgreicher optischer Stimulierbarkeit.

Die lokale Injektion von AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry ermöglichte im Bereich der Injektionsstelle die optische Stimulation des Myokards. Die Stimulierbarkeit des Herzens dauerte jedoch nur drei Wochen an. Darüber hinaus wurde neben dem Verlust der optischen Stimulierbarkeit auch ein Verlust von ventrikulären Myokardgewebe festgestellt. Durch histologische Analysen wurde im Bereich der Injektionsstelle eine Infiltration von Leukozyten nachgewiesen und fibrotisches Narbengewebe gefunden.

Die systemische Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry ermöglichte die optische Stimulation des Herzens über beide Ventrikel und über das rechte Atrium. Durch die Fluoreszenz des mit ChR2 fusionierten mCherry Proteins wurde die Expression von ChR2-mCherry in allen Bereichen des Herzens in 58 % der Herzmuskelzellen nachgewiesen. Die optische Stimulierbarkeit wurde bereits 4 Wochen nach der Injektion von 2×10^{11} gc AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry festgestellt und hielt nachweislich bis zu 16 Monate an. In histologischen Analysen dieser Herzen wurden keine Anzeichen für negative Immunreaktionen oder Narbengewebe gefunden. Durch *in vivo* und *ex vivo* Stimationsanalysen wurden die unteren Grenzwerte der Lichtintensität ermittelt, die für eine optische Stimulation notwendig waren. Weiterhin war eine zehn Minuten andauernde Stimulation durch Lichtimpulse ohne Aussetzer des Herzschlags möglich. Der künstlich beschleunigte Herzrhythmus kehrte nach der

Lichtstimulation sofort zum normalen Sinusrhythmus zurück. Die optische Stimulation hatte somit keinen negativen Einfluss auf die kardiale Elektrophysiologie.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die optische Herzstimulation nach Gentransfer von ChR2 ein großes Potential für eine therapeutische Anwendung als optogenetischer Herzschrittmacher hat.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μW	Mikrowatt
Å	Ångström
a.u.	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheit)
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AAVR	AAV Rezeptor
ADA	<i>Adenosine deaminase deficiency</i> (Adenosin-Desaminase-Mangel)
AdV	Adenovirus
AED	automatisierter externer Defibrillator
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATR	All- <i>trans</i> -Retinal
AV-Block	Atrioventrikulärer Block
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
Ba	Barium
bp	<i>Base pairs</i> (Basenpaare)
BPEG	<i>British Pacing and Electrophysiology Group</i>
bpm	<i>beats per minute</i> (Schläge pro Minute)
BR	Bakteriorhodopsin
Ca	Kalzium
CAG	<i>Cytomegalovirus Enhancer, Chicken β-Actin, Rabbit β-Globulin</i> Promotor
cap Gene bzw. Cap Proteine	Virales Kapsidgen bzw. virales Kapsidprotein
CnChR1	Chrimson; <i>Chlamydomonas noctigama</i> Channelrhodopsin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cs	Caesium
cTnT	cardiac troponin T (kardiales Troponin T)
CUPID	<i>Calcium UpRegulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease</i>
Cx43	Connexin43
d	Impulsdauer
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
eCM	embryonale Kardiomyozyten
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor)
EKG	Elektrokardiogramm
e ^x	Exponent von (x)
eYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>
F _c	Schwere Kette beim Antikörper
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor 1</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor-1)
G	Gauche

Abkürzungsverzeichnis

gc	<i>genome copies</i>
H	Wasserstoff
h	<i>hour(s)</i>
hChr2 (Chr2)	Humanes Channelrhodopsin-2
HCN-Kanal	hyperpolarisationsaktivierter und zyklische Nukleotid-bindender Kanal
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGFR	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
HR	Halorhodopsin
HSPG	Heparansulfat Proteoglykane
HSV	<i>Herpes simplex Virus</i>
I	Lichtintensität
i.m.	intramyokardial
ICa ²⁺ _L	Kalziumionen Einwärtsstrom an spannungsgesteuerten L-Typ Kanal – depolarisierend
ICD	<i>implantable cardioverter defibrillator</i>
ICR	Interkostalraum
I _f	Kationeneinstrom; Schrittmacherkanal, <i>funny channel</i> , HCN-Kanal – depolarisierend
IK ⁺ ₁	steter Kaliumionen Auswärtsstrom der das Ruhemembranpotential in der Arbeitsmyokardzelle erhält
IK ⁺ _{R,S}	Kaliumionen Auswärtsstrom an spannungsgesteuerten Kaliumkanal, r: <i>rapid</i> , s: <i>slow</i> - repolarisierend
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
INa ⁺	Natriumionen Einwärtsstrom an spannungsgesteuerten Na ⁺ Kanal – depolarisierend
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
K	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LacZ Gen	Teil des <i>lac</i> -Operons, codiert für das Enzym β-Galactosidase
LamR	Lamininrezeptor
LED	<i>Light-emitting diode</i>
Li	Lithium
ln(x)	Natürliche Logarithmus von x
L-Typ	<i>long-lasting</i>
LVAD	<i>Left ventricular assist device</i> , Linksventrikuläres Unterstützungssystem
Lys	Lysin
m	Meter
MDP	Maximal diastolisches Potential
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimol
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MNP	<i>Magnetic nanoparticles</i>
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
mW	Milliwatt
n.s.	nicht signifikant
N ₂ O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)
Na	Natrium
NAB	<i>Neutralizing antibody</i> (Neutralisierenden Antikörper)
NASPE	<i>North American Society of Pacing and Electrophysiology</i>
NBG-Code	<i>NASPE/BPEG Generic Pacemaker Code</i>
NH ₃	Ammoniak
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
nM	Nanomol
nm	Nanometer
NT-proBNB	n-terminales pro Brain Natriuretisches Peptid
O ₂	Sauerstoff, als Molekül
ORF	<i>Open reading frame</i>
ORI	<i>Origin of replication</i>
pAAV/Ad	Helferplasmid mit Bestandteilen des Adenovirus zur AAV-Vektorproduktion
pAAV/no-tr	Helferplasmid mit Teilen des AAV2 Genoms zur AAV-Vektorproduktion
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Natriumchlorid Lösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
pg	Pikogramm
rAAV	Rekombinanter Adeno-assoziiertes Virusvektor
Rb	Rubidium
RBE	<i>Rep binding elements</i>
rep Gene bzw. Rep Proteine	Virales Replikationsgen bzw. Virales Replikationsprotein
Rh	Rheobase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RSBH	Retinal Schiffsche Base
RyR2	Ryanodinrezeptor, Kalziumkanal, Subtyp 2
s	Sekunde
SERCA	<i>Sarcoplasmatic endoplasmatic reticulum calcium-transporting ATPase</i>
ShChR	Chronos; <i>Stigeoclonium helveticum</i> Channelrhodopsin
SR	Sarkoplasmatische Retikulum
Sr	Strontium
SV15	<i>Simian adenovirus 15</i>

Abkürzungsverzeichnis

TCU	Tandem cell unit
TM	Transmembranhelix bzw. Transmembrandomäne
TRS	<i>terminal resolution sites</i>
TU	<i>transducing units</i>
vg	<i>viral genome</i>
Vol.-%	Volumenprozent
WPPE	Woodchuck Hepatitis Virus (WHP) Posttranscriptional Regulatory Element
WT	Wildtyp
Zn	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem
λ	„Lambda“, Wellenlänge
τ	„Tau“, Reizzeitkonstante

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herz, Erregungsleitungssystem.....	2
Abbildung 2: Aktionspotentiale einer Schrittmacherzelle und einer Arbeitsmyokardzelle.....	4
Abbildung 3: Elektrokardiogramm (EKG)	6
Abbildung 4: all- <i>trans</i> -Retinal, 13- <i>cis</i> -Retinal, sowie die jeweiligen Schiffischen Basen an Lysin gebunden	17
Abbildung 5: Channelrhodopsin-2, ein lichtsensitiver Kationenkanal	18
Abbildung 6: Photozyklusmodell.....	19
Abbildung 7: Anordnung der Gene im Adeno-assoziierten Virus (AAV) und im AAV-Vektor	26
Abbildung 8: AAV Plasmide 2/1, 2/9 und hChR2-mCherry	41
Abbildung 9: Expression des Fusionsproteins hChR2-mCherry nach lokaler Injektion des rekombinanten AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry Virusvektors in das Myokard des Mausherzes in der Nähe des Apex.....	54
Abbildung 10: Aufnahmen eines Stimulationsexperimentes.....	56
Abbildung 11: Ergebnisse der Lichtstimulationsexperimente, eine Woche nach lokaler Injektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry.....	58
Abbildung 12: Reizzeit-Intensitäts-Diagramm des einzigen stimulierbaren Mausherzens zwei Wochen nach lokaler Injektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	59
Abbildung 13: Übersicht der analysierten Mausherzen nach lokaler Infektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry.....	60
Abbildung 14: Infiltration von Immunzellen nach lokaler Injektion von 2×10^{11} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry.....	61
Abbildung 15: Ergebnisse der Lichtstimulationsexperimente, zwei Wochen nach lokaler Injektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	63
Abbildung 16: Ergebnisse der Lichtstimulationsexperimente, drei Wochen nach lokaler Injektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry.....	64

Abbildung 17: Übersicht der analysierten Mausherzen nach lokaler Infektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	65
Abbildung 18: Immunzellinfiltration nach Injektion von 2×10^{10} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	66
Abbildung 19: Übersicht der analysierten Mausherzen zwei Wochen nach lokaler Injektion von 2×10^{09} gc AA2/1-CAG-hChR2-mCherry	67
Abbildung 20: Immunzellinfiltration nach Injektion von 2×10^{09} gc AAV2/1-CAG-hChR2-mCherry	68
Abbildung 21: Makroskopische Aufnahmen nach lokaler Injektion von 10 μ l PBS-Lösung in der Nähe des Apex – Kontrollexperiment	68
Abbildung 22: Histologische Analyse nach lokaler Injektion von 10 μ l PBS in der Nähe des Apex	70
Abbildung 23: Systemische Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry über die <i>Vena jugularis</i>	73
Abbildung 24: Isolierte Kardiomyozyten transduzierter Herzen	74
Abbildung 25: mCherry Expressionsanalysen: Stimulationsfähigkeit, Anteil mCherry positiver Kardiomyozyten	75
Abbildung 26: Ergebnisse der <i>in vivo</i> Lichtstimulationsversuche 1, 2, 8 und 16 Monate nach systemischer Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry	77
Abbildung 27: Rheobase, Chronaxie und QRS Analysen der <i>in vivo</i> Versuche in Bezug zu den Beleuchtungsflächen	78
Abbildung 28: Rheobase, Chronaxie, QRS Analyse und Korrelation zwischen mCherry Fluoreszenz und minimaler Lichtintensität	79
Abbildung 29: Reizzeit-Intensitäts-Kurven der <i>ex vivo</i> Stimulationsversuche nach systemischer Injektion von AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry, <i>ex vivo</i>	81
Abbildung 30: Visuelle Darstellung des Vergleichs von <i>in vivo</i> und <i>ex vivo</i> Lichtintensitätswerten, nach systemischer AAV-Injektion (AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry)	84
Abbildung 31: Schrittmacherfunktion durch optische Stimulation in unterschiedlichen Herzbereichen	85
Abbildung 32: EKG Aufnahme von der optischen Stimulation des rechten Atriums	86

Abbildung 33: Effekte der optogenetischen Langzeitstimulation <i>in vivo</i> , nach systemischer Adeno-assoziiierter Virusvektordinjektion, AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry	87
Abbildung 34: Analyse der mCherry Expression in Nicht-Kardiomyozyten im Herz, Diaphragma, Leber, Lunge, Niere, Milz und Gehirn, zwei Monate nach systemischer Adeno-assoziiierter Virusvektordinjektion, AAV2/9-CAG-hChR2-mCherry	89

9 Literaturverzeichnis

- Adán, V., and Crown, L.A. (2003). Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. *American Family Physician* 67, 1725–1732. .
- Akache, B., Grimm, D., Pandey, K., Yant, S.R., Xu, H., and Kay, M.A. (2006). The 37/67-Kilodalton Laminin Receptor Is a Receptor for Adeno-Associated Virus Serotypes 8, 2, 3, and 9. *Journal of Virology* 80, 9831–9836. <https://doi.org/10.1128/JVI.00878-06>.
- Ali, N., National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, Keene, D., National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, Arnold, A., National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, Shun-Shin, M., National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, Whinnett, Z.I., National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, et al. (2018). His Bundle Pacing: A New Frontier in the Treatment of Heart Failure. *Arrhythmia & Electrophysiology Review* 7, 103. <https://doi.org/10.15420/aer.2018.6.2>.
- Alter, J., Lou, F., Rabinowitz, A., Yin, H.F., Rosenfeld, J., Wilton, S.D., Partridge, T.A., and Qi, L.L. (2006). Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nature Medicine* 12, 175–177. <https://doi.org/10.1038/nm1345>.
- Aquilina, O. (2006). A brief history of cardiac pacing. *Images in Paediatric Cardiology* 8, 17–81. .
- Arnold, A.D., Shun-Shin, M.J., Keene, D., Howard, J.P., Sohaib, S.M.A., Wright, I.J., Cole, G.D., Qureshi, N.A., Lefroy, D.C., Koa-Wing, M., et al. (2018). His Resynchronization Versus Biventricular Pacing in Patients With Heart Failure and Left Bundle Branch Block. *Journal of the American College of Cardiology* 72, 3112–3122. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.09.073>.
- Arrenberg, A.B., Stainier, D.Y.R., Baier, H., and Huisken, J. (2010). Optogenetic control of cardiac function. *Science (New York, N.Y.)* 330, 971–974. <https://doi.org/10.1126/science.1195929>.
- Asokan, A., Hamra, J.B., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2006). Adeno-Associated Virus Type 2 Contains an Integrin 5 1 Binding Domain Essential for Viral Cell Entry. *Journal of Virology* 80, 8961–8969. <https://doi.org/10.1128/JVI.00843-06>.
- Asokan, A., Conway, J.C., Phillips, J.L., Li, C., Hegge, J., Sinnott, R., Yadav, S., DiPrimio, N., Nam, H.-J., Agbandje-McKenna, M., et al. (2010). Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nature Biotechnology* 28, 79–82. <https://doi.org/10.1038/nbt.1599>.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149, 754–755. <https://doi.org/10.1126/science.149.3685.754>.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1966). Electron microscopy of adenovirus-associated virus (AAV) in cell cultures. *Virology* 29, 353–357. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90045-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90045-6).
- Bantel-Schaal, U., and zur Hausen, H. (1984). Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 134, 52–63. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90271-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90271-X).
- Becerra, S.P., Rose, J.A., Hardy, M., Baroudy, B.M., and Anderson, C.W. (1985). Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82, 7919–7923. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.23.7919>.

- Berns, K.I. (1990). Parvovirus replication. *Microbiological Reviews* 54, 316–329. .
- Berns, K.I., and Linden, R.M. (1995). The cryptic life style of adenoassociated virus. *BioEssays* 17, 237–245. <https://doi.org/10.1002/bies.950170310>.
- Bernstein, A.D., Daubert, J.-C., Fletcher, R.D., Hayes, D.L., Luderitz, B., Reynolds, D.W., Schoenfeld, M.H., and Sutton, R. (2002). The Revised NASPE/BPEG Generic Code for Antibradycardia, Adaptive-Rate, and Multisite Pacing. *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* 25, 260–264. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9592.2002.00260.x>.
- Blackburn, S.D., Steadman, R.A., and Johnson, F.B. (2006). Attachment of adeno-associated virus type 3H to fibroblast growth factor receptor 1. *Archives of Virology* 151, 617–623. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0650-6>.
- Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., et al. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science (New York, N.Y.)* 270, 475–480. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>.
- Boineau, J.P., Schuessler, R.B., Hackel, D.B., Miller, C.B., Brockus, C.W., and Wylds, A.C. (1980). Widespread distribution and rate differentiation of the atrial pacemaker complex. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 239, H406—H415. .
- Borek, P.P., and Wilkoff, B.L. (2008). Pacemaker and ICD leads: Strategies for long-term management. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology* 23, 59–72. <https://doi.org/10.1007/s10840-008-9249-7>.
- Bossert, F.-P., and Vogedes, K. (2019). *Elektrotherapie, Licht- und Strahlentherapie: Grundlagen für Physiotherapeuten und Masseur* (München: Elsevier, Urban & Fischer).
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature Neuroscience* 8, 1263–1268. <https://doi.org/10.1038/nn1525>.
- Boyett, M.R., Honjo, H., and Kodama, I. (2000). The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovascular Research* 47, 658–687. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(00\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(00)00135-8).
- Bromberg, B.I., Hand, D.E., Schuessler, R.B., and Boineau, J.P. (1995). Primary negativity does not predict dominant pacemaker location: Implications for sinoatrial conduction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 269, H877—H887. .
- Bruegmann, T., Malan, D., Hesse, M., Beiert, T., Fuegemann, C.J., Fleischmann, B.K., and Sasse, P. (2010). Optogenetic control of heart muscle in vitro and in vivo. *Nature Methods* 7, 897–900. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1512>.
- Bruegmann, T., Boyle, P.M., Vogt, C.C., Karathanos, T.V., Arevalo, H.J., Fleischmann, B.K., Trayanova, N.A., and Sasse, P. (2016). Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. *The Journal of Clinical Investigation* 126, 3894–3904. <https://doi.org/10.1172/JCI88950>.
- Bruegmann, T., Beiert, T., Vogt, C.C., Schrickel, J.W., and Sasse, P. (2018). Optogenetic termination of atrial fibrillation in mice. *Cardiovascular Research* 114, 713–723. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx250>.

- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2005). Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung humaner Adeno-assoziiierter Viren und AAV-abgeleiteter Vektoren.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2006). Bekanntmachung der Arbeit der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit im Jahr 2005 (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit).
- Cakulev, I., Efimov, I.R., and Waldo, A.L. (2009). Cardioversion: Past, Present, and Future. *Circulation* *120*, 1623–1632. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.865535>.
- Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J.M. (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *The Journal of Infectious Diseases* *199*, 381–390. <https://doi.org/10.1086/595830>.
- Chardack, W.M. (1981). Recollections-1958-1961. Pacing and Clinical Electrophysiology: *PACE* *4*, 592–596. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.1981.tb06234.x>.
- Chaytow, H., Huang, Y.-T., Gillingwater, T.H., and Faller, K.M.E. (2018). The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cell Mol Life Sci* *75*, 3877–3894. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2849-1>.
- Copenhaver, W.M., and Truex, R.C. (1952). Histology of the atrial portion of the cardiac conduction system in man and other mammals. *The Anatomical Record* *114*, 601–625. <https://doi.org/10.1002/ar.1091140406>.
- Daya, S., and Berns, K.I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clinical Microbiology Reviews* *21*, 583–593. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>.
- Deisseroth, K., Feng, G., Majewska, A.K., Miesenböck, G., Ting, A., and Schnitzer, M.J. (2006). Next-Generation Optical Technologies for Illuminating Genetically Targeted Brain Circuits. *Journal of Neuroscience* *26*, 10380–10386. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3863-06.2006>.
- Di Pasquale, G., Davidson, B.L., Stein, C.S., Martins, I., Scudiero, D., Monks, A., and Chiorini, J.A. (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nature Medicine* *9*, 1306–1312. <https://doi.org/10.1038/nm929>.
- Dominski, Z., and Kole, R. (1993). Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8673>.
- Donaldson, R.M., Fox, K., and Rickards, A.F. (1983). Initial experience with a physiological, rate responsive pacemaker. *British Medical Journal* *286*, 667–671. <https://doi.org/10.1136/bmj.286.6366.667>.
- Du, L., Kido, M., Lee, D.V., Rabinowitz, J.E., Samulski, R.J., Jamieson, S.W., Weitzman, M.D., and Thistlethwaite, P.A. (2004). Differential Myocardial Gene Delivery by Recombinant Serotype-Specific Adeno-associated Viral Vectors. *Molecular Therapy* *10*, 604–608. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.06.110>.
- Dutta, S., and Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences* *152*, 244–248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>.

Efimov, I.R. (2009). Naum Lazarevich Gurvich (1905-1981) and his contribution to the history of defibrillation. *Cardiol J* 16, 190–193. .

Entcheva, E. (2013). Cardiac optogenetics. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 304, H1179–H1191. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00432.2012>.

Ernst, O.P., Murcia, P.A.S., Daldrop, P., Tsunoda, S.P., Kateriya, S., and Hegemann, P. (2008). Photoactivation of Channelrhodopsin. *Journal of Biological Chemistry* 283, 1637–1643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708039200>.

Fedorov, V.V., Schuessler, R.B., Hemphill, M., Ambrosi, C.M., Chang, R., Voloshina, A.S., Brown, K., Hucker, W.J., and Efimov, I.R. (2009). Structural and functional evidence for discrete exit pathways that connect the canine sinoatrial node and atria. *Circulation Research* 104, 915–923. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.193193>.

Fedorov, V.V., Glukhov, A.V., Chang, R., Kosteki, G., Aferol, H., Hucker, W.J., Wuskell, J.P., Loew, L.M., Schuessler, R.B., Moazami, N., et al. (2010). Optical mapping of the isolated coronary-perfused human sinus node. *Journal of the American College of Cardiology* 56, 1386–1394. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.03.098>.

Fedorov, V.V., Glukhov, A.V., and Chang, R. (2012). Conduction barriers and pathways of the sinoatrial pacemaker complex: Their role in normal rhythm and atrial arrhythmias. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 302, H1773-83. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00892.2011>.

Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., and Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7413–7417. <https://doi.org/10.1073/PNAS.84.21.7413>.

Fleming, I., and Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284, R1–R12. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00323.2002>.

Foster, K.W., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T., and Nakanishi, K. (1984). A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. *Nature* 311, 756. <https://doi.org/10.1038/311756a0>.

Fricchione, G.L., Olson, L.C., and Vlay, S.C. (1989). Psychiatric syndromes in patients with the automatic internal cardioverter defibrillator: Anxiety, psychological dependence, abuse, and withdrawal. *American Heart Journal* 117, 1411–1414. .

Friedman-Einat, M., Grossman, Z., Mileguir, F., Smetana, Z., Ashkenazi, M., Barkai, G., Varsano, N., Glick, E., and Mendelson, E. (1997). Detection of Adeno-Associated Virus Type 2 Sequences in the Human Genital Tract. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 8. .

Ganz, L.I., and Friedman, P.L. (1995). Supraventricular Tachycardia. *New England Journal of Medicine* 332, 162–173. <https://doi.org/10.1056/NEJM199501193320307>.

Gao, G.-P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 11854–11859. <https://doi.org/10.1073/pnas.182412299>.

- Gao, G.-P., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *Journal of Virology* 78, 6381–6388. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6381-6388.2004>.
- George, L.A., Sullivan, S.K., Giermasz, A., Rasko, J.E.J., Samelson-Jones, B.J., Ducore, J., Cuker, A., Sullivan, L.M., Majumdar, S., Teitel, J., et al. (2017). Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. <Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa1708538> <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708538>.
- Gonçalves, M.A.F.V. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology Journal* 2, 43. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-43>.
- Greenberg, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K.M., Butler, J., Felker, G.M., Voors, A.A., Rudy, J.J., Wagner, K., and Hajjar, R.J. (2014). Design of a Phase 2b Trial of Intracoronary Administration of AAV1/SERCA2a in Patients With Advanced Heart Failure. *JACC: Heart Failure* 2, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2013.09.008>.
- Greenberg, B., Butler, J., Felker, G.M., Ponikowski, P., Voors, A.A., Pogoda, J.M., Provost, R., Guerrero, J.L., Hajjar, R.J., and Zsebo, K.M. (2015). Prevalence of AAV1 neutralizing antibodies and consequences for a clinical trial of gene transfer for advanced heart failure. *Gene Therapy* 23, 313. .
- Greenberg, B., Butler, J., Felker, G.M., Ponikowski, P., Voors, A.A., Desai, A.S., Barnard, D., Bouchard, A., Jaski, B., Lyon, A.R., et al. (2016). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): A randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *The Lancet* 387, 1178–1186. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00082-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00082-9).
- Gunaydin, L.A., Yizhar, O., Berndt, A., Sohal, V.S., Deisseroth, K., and Hegemann, P. (2010). Ultrafast optogenetic control. *Nature Neuroscience* 13, 387. <https://doi.org/10.1038/nn.2495>.
- Gurvich, N.L., and Makarychev, V.A. (1967). Defibrillation of the heart with biphasic electric impulsion. *Kardiologija* 7, 109–112. .
- Gurvich, N.L., and Yuniev, G.S. (1939). Restoration of normal function in fibrillating heart of warm-blooded animals by condenser discharge. *Bull Experiment Biol Med* 8, 55–58. .
- Guzman, R.J., Lemarchand, P., Crystal, R.G., Epstein, S.E., and Finkel, T. (1992). Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circulation Research* 73, 1202–1207. <https://doi.org/10.1161/01.RES.73.6.1202>.
- Hadri, L., Bobe, R., Kawase, Y., Ladage, D., Ishikawa, K., Atassi, F., Lebeche, D., Kranias, E.G., Leopold, J.A., Lompré, A.-M., et al. (2010). SERCA2a gene transfer enhances eNOS expression and activity in endothelial cells. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 1284–1292. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.77>.
- Hajjar, R.J., Zsebo, K.M., Deckelbaum, L., Thompson, C., Rudy, J.J., Yaroshinsky, A., Ly, H.Q., Kawase, Y., Wagner, K., Borow, K., et al. (2008). Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *Journal of Cardiac Failure* 14, 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2008.02.005>.
- Handa, A., Muramatsu, S.-I., Qiu, J., Mizukami, H., and Brown, K.E. (2000). Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-

based vectors. *Journal of General Virology* 81, 2077–2084. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-2077>.

Haupts, U., Tittor, J., Bamberg, E., and Oesterhelt, D. (1997). General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer (IST) Model. *Biochemistry* 36, 2–7. <https://doi.org/10.1021/bi962014g>.

Hauser, R.G. (2005). The growing mismatch between patient longevity and the service life of implantable cardioverter-defibrillators. *Journal of the American College of Cardiology* 45, 2022–2025. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.02.077>.

Hegemann, P. (1997). Vision in microalgae. *Planta* 203, 265–274. <https://doi.org/10.1007/s004250050191>.

Hegemann, P., Ehlenbeck, S., and Gradmann, D. (2005). Multiple Photocycles of Channelrhodopsin. *Biophysical Journal* 89, 3911–3918. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.069716>.

Hermonat, P.L., and Muzyczka, N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81, 6466–6470. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.20.6466>.

Hinderer, C., Katz, N., Buza, E.L., Dyer, C., Goode, T., Bell, P., Richman, L.K., and Wilson, J.M. (2018). Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN. *Human Gene Therapy* 29, 285–298. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.015>.

Hitoshi, N., Ken-ichi, Y., and Jun-ichi, M. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193–199. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90434-D](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90434-D).

Hofland, H.E.J., Nagy, D., Liu, J.-J., Spratt, K., Lee, Y.-L., Danos, O., and Sullivan, S.M. (1997). In vivo gene transfer by intravenous administration of stable cationic lipid/DNA complex. *Pharmaceutical Research* 14, 742–749. .

Hoggan, M.D. (1965). PRESENCE OF SMALL VIRUS-LIKE PARTICLES IN VARIOUS ADENOVIRUS TYPE 2 5 7 AND 12 PREPARATIONS. In *FEDERATION PROCEEDINGS, (FEDERATION AMER SOC EXP BIOL 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998)*, p. 248.

Hoggan, M.D., Blacklow, N.R., and Rowe, W.P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 55, 1467–1474. <https://doi.org/10.1073/pnas.55.6.1467>.

Hordeaux, J., Wang, Q., Katz, N., Buza, E.L., Bell, P., and Wilson, J.M. (2018). The Neurotropic Properties of AAV-PHP.B Are Limited to C57BL/6J Mice. *Mol Ther* 26, 664–668. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.01.018>.

Hulot, J.-S., Ishikawa, K., and Hajjar, R.J. (2016). Gene therapy for the treatment of heart failure: promise postponed. *Eur Heart J* 37, 1651–1658. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw019>.

Hulot, J.-S., Salem, J.-E., Redheuil, A., Collet, J.-P., Varnous, S., Jourdain, P., Logeart, D., Gandjbakhch, E., Bernard, C., Hatem, S.N., et al. (2017). Effect of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a on ventricular remodelling in patients with advanced systolic heart failure: results from the AGENT-HF randomized phase 2 trial. *European Journal of Heart Failure* 19, 1534–1541. <https://doi.org/10.1002/ejhf.826>.

- Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T.A., Gibson, G.A., Mctiernan, C.F., Kay, M.A., and Nakai, H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: Efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 14, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.03.014>.
- Ishizuka, T., Kakuda, M., Araki, R., and Yawo, H. (2006). Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci. Res.* 54, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.10.009>.
- James, T.N. (1963). The connecting pathways between the sinus node and A-V node and between the right and the left atrium in the human heart. *American Heart Journal* 66, 498–508. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(63\)90382-X](https://doi.org/10.1016/0002-8703(63)90382-X).
- Jaski, B.E., Jessup, M.L., Mancini, D.M., Cappola, T.P., Pauly, D.F., Greenberg, B., Borow, K., Dittrich, H., Zsebo, K.M., and Hajjar, R.J. (2009). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *Journal of Cardiac Failure* 15, 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2009.01.013>.
- Jedeikin, L. (1962). Glycogen and phosphorylase distribution throughout the walls of the heart and conduction system. *Biochemical Pharmacology* 9, 193–198. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(62\)90027-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(62)90027-8).
- Jessup, M.L., Greenberg, B., Mancini, D.M., Cappola, T.P., Pauly, D.F., Jaski, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K.M., Dittrich, H., and Hajjar, R.J. (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 124, 304–313. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.022889>.
- Kaludov, N., Brown, K.E., Walters, R.W., Zabner, J., and Chiorini, J.A. (2001). Adeno-Associated Virus Serotype 4 (AAV4) and AAV5 Both Require Sialic Acid Binding for Hemagglutination and Efficient Transduction but Differ in Sialic Acid Linkage Specificity. *Journal of Virology* 75, 6884–6893. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6884-6893.2001>.
- Kashiwakura, Y., Tamayose, K., Iwabuchi, K., Hirai, Y., Shimada, T., Matsumoto, K., Nakamura, T., Watanabe, M., Oshimi, K., and Daida, H. (2005). Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Journal of Virology* 79, 609–614. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.1.609-614.2005>.
- Kateriya, S. (2005). Identification, expression and characterization of archaeal-type opsins of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Hochschulschrift der Universität Regensburg (Dissertation)*. Universität Regensburg.
- Kato, H.E., Zhang, F., Yizhar, O., Ramakrishnan, C., Nishizawa, T., Hirata, K., Ito, J., Aita, Y., Tsukazaki, T., Hayashi, S., et al. (2012). Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. *Nature* 482, 369. <https://doi.org/10.1038/nature10870>.
- Kawase, Y., Ly, H.Q., Prunier, F., Lebeche, D., Shi, Y., Jin, H., Hadri, L., Yoneyama, R., Hoshino, K., Takewa, Y., et al. (2008). Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 51, 1112–1119. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.12.014>.

Kay, M.A., Manno, C.S., Ragni, M.V., Larson, P.J., Couto, L.B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A.J., J Tai, S., Herzog, R.W., et al. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature Genetics* 24, 257–261. <https://doi.org/10.1038/73464>.

Kay, M.A., Glorioso, J.C., and Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics.

Keith, A., and Flack, M. (1907). The Form and Nature of the Muscular Connections between the Primary Divisions of the Vertebrate Heart. *Journal of Anatomy and Physiology* 41, 172–189. .

Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Müller, O.J., Wobus, C.E., Bettinger, K., Von der Lieth, C.-W., King, J.A., and Kleinschmidt, J.A. (2003). Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids. *Journal of Virology* 77, 11072–11081. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.20.11072-11081.2003>.

Kessler, P.D., Podsakoff, G.M., Chen, X., McQuiston, S.A., Colosi, P.C., Matelis, L.A., Kurtzman, G.J., and Byrne, B.J. (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 14082–14087. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.14082>.

Kindermann, M., Schwaab, B., Berg, M., and Fröhlig, G. (2001). Longevity of Dual Chamber Pacemakers: Device and Patient Related Determinants. *Pacing and Clinical Electrophysiology: PACE* 24, 810–815. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9592.2001.00810.x>.

Klapoetke, N.C., Murata, Y., Kim, S.S., Pulver, S.R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y.K., Morimoto, T.K., Chuong, A.S., Carpenter, E.J., Tian, Z., et al. (2014). Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature Methods* 11, 338. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2836>.

Kodama, I., Shibata, N., Sakuma, I., Mitsui, K., Iida, M., Suzuki, R., Fukui, Y., Hosoda, S., and Toyama, J. (1994). Aftereffects of high-intensity DC stimulation on the electromechanical performance of ventricular muscle. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 267, H248–H258. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.1.H248>.

Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–165. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3).

Lin, J.Y. (2011). A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments. *Experimental Physiology* 96, 19–25. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.051961>.

Lin, H., Parmacek, M.S., Morle, G., Bolling, S., and Leiden, J.M. (1990). Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA. *Circulation* 82, 2217–2221. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.82.6.2217>.

Lin, J.Y., Lin, M.Z., Steinbach, P., and Tsien, R.Y. (2009). Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics. *Biophysical Journal* 96, 1803–1814. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.034>.

Lin, J.Y., Knutsen, P.M., Muller, A., Kleinfeld, D., and Tsien, R.Y. (2013). ReaChR: A red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nature Neuroscience* 16, 1499–1508. <https://doi.org/10.1038/nn.3502>.

- Ling, C., Lu, Y., Kalsi, J.K., Jayandharan, G.R., Li, B., Ma, W., Cheng, B., Gee, S.W.Y., McGoogan, K.E., Govindasamy, L., et al. (2010). Human hepatocyte growth factor receptor is a cellular coreceptor for adeno-associated virus serotype 3. *Human Gene Therapy* 21, 1741–1747. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.075>.
- Lip, G.Y., Tse, H.-F., and Lane, D.A. (2012). Atrial fibrillation. *The Lancet* 379, 648–661. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61514-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61514-6).
- Lock, M., Alvira, M., Vandenberghe, L.H., Samanta, A., Toelen, J., Debyser, Z., and Wilson, J.M. (2010). Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale. *Human Gene Therapy* 21, 1259–1271. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.055>.
- Louis Jeune, V., Joergensen, J.A., Hajjar, R.J., and Weber, T. (2013). Pre-existing anti-adeno-associated virus antibodies as a challenge in AAV gene therapy. *Human Gene Therapy Methods* 24, 59–67. <https://doi.org/10.1089/hgtb.2012.243>.
- Lyon, A.R., Sato, M., Hajjar, R.J., Samulski, R.J., and Harding, S.E. (2008). Gene therapy: Targeting the myocardium. *Heart (British Cardiac Society)* 94, 89–99. <https://doi.org/10.1136/hrt.2007.116483>.
- Lyon, A.R., MacLeod, K.T., Zhang, Y., Garcia, E., Kanda, G.K., Lab, M.J., Korchev, Y.E., Harding, S.E., and Gorelik, J. (2009). Loss of T-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 6854–6859. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809777106>.
- Lyon, A.R., Bannister, M.L., Collins, T., Pearce, E., Sepehripour, A.H., Dubb, S.S., Garcia, E., O’Gara, P., Liang, L., Kohlbrenner, E., et al. (2011). SERCA2a gene transfer decreases sarcoplasmic reticulum calcium leak and reduces ventricular arrhythmias in a model of chronic heart failure. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 4, 362–372. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.110.961615>.
- Lyon, A.R., Babalis, D., Morley-Smith, A.C., Hedger, M., Suarez Barrientos, A., Foldes, G., Couch, L.S., Chowdhury, R.A., Tzortzis, K.N., Peters, N.S., et al. (2020). Investigation of the safety and feasibility of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with chronic heart failure supported with a left ventricular assist device – the SERCA-LVAD TRIAL. *Gene Therapy* 27, 579–590. <https://doi.org/10.1038/s41434-020-0171-7>.
- Madigan, V.J., and Asokan, A. (2016). Engineering AAV receptor footprints for gene therapy. *Current Opinion in Virology* 18, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.05.001>.
- Mager, T., Lopez de la Morena, D., Senn, V., Schlotte, J., D’Errico, A., Feldbauer, K., Wrobel, C., Jung, S., Bodensiek, K., Rankovic, V., et al. (2018). High frequency neural spiking and auditory signaling by ultrafast red-shifted optogenetics. *Nature Communications* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04146-3>.
- Markewitz, A. (2012). Jahresbericht 2010 des Deutschen Herzschrittmacher- und Defibrillator-Registers. *Herzschrittmachertherapie & Elektrophysiologie* 4, 305–352. <https://doi.org/10.1007/s00399-012-0241-7>.
- Matsuno-Yagi, A., and Mukohata, Y. (1977). Two possible roles of bacteriorhodopsin; a comparative study of strains of *Halobacterium halobium* differing in pigmentation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 78, 237–243. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)91245-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)91245-1).
- Mays, L.E., and Wilson, J.M. (2011). The Complex and Evolving Story of T cell Activation to AAV Vector-encoded Transgene Products. *Molecular Therapy* 19, 16–27. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.250>.

Melnick, J.L., Mayor, H.D., Smith, K.O., and Rapp, F. (1965). Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses. *Journal of Bacteriology* *90*, 271–274. .

Mendell, J.R., Al-Zaidy, S., Shell, R., Arnold, W.D., Rodino-Klapac, L.R., Prior, T.W., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Church, K., et al. (2017). Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa1706198](http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1706198) <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>.

Mendelson, E., Trempe, J.P., and Carter, B.J. (1986). Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide. *Journal of Virology* *60*, 823–832. .

Meyer, M., Schillinger, W., Pieske, B., Holubarsch, C., Heilmann, C., Posival, H., Kuwajima, G., Mikoshiba, K., Just, H., and Hasenfuss, G. (1995). Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* *92*, 778–784. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.4.778>.

Mietzsch, M., Broecker, F., Reinhardt, A., Seeberger, P.H., and Heilbronn, R. (2014). Differential adeno-associated virus serotype-specific interaction patterns with synthetic heparins and other glycans. *Journal of Virology* *88*, 2991–3003. <https://doi.org/10.1128/JVI.03371-13>.

Mirowski, M., Mower, M.M., Staewen, W.S., Tabatznik, B., and Mendeloff, A.I. (1997-07). Standby automatic defibrillator. An approach to prevention of sudden coronary death. *Arch. Intern. Med.* *126*, 158–161. .

Mölling, K. (2015). *Supermacht des Lebens : Reisen in die erstaunliche Welt der Viren* (München: Beck).

Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., and Kanda, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* *330*, 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.012>.

Müller, M., Bamann, C., Bamberg, E., and Kühlbrandt, W. (2011). Projection Structure of Channelrhodopsin-2 at 6 Å Resolution by Electron Crystallography. *Journal of Molecular Biology* *414*, 86–95. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.09.049>.

Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A.M., Bamberg, E., and Hegemann, P. (2002). Channelrhodopsin-1: A light-gated proton channel in green algae. *Science (New York, N.Y.)* *296*, 2395–2398. <https://doi.org/10.1126/science.1072068>.

Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 13940–13945. <https://doi.org/10.1073/pnas.1936192100>.

Nagel, G., Szellas, T., Kateriya, S., Adeishvili, N., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2005a). Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochemical Society Transactions* *33*, 863–866. <https://doi.org/10.1042/BST0330863>.

Nagel, G., Brauner, M., Liewald, J.F., Adeishvili, N., Bamberg, E., and Gottschalk, A. (2005b). Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Current Biology : CB* *15*, 2279–2284. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.032>.

Narula, O.S. (1977). Longitudinal dissociation in the His bundle. Bundle branch block due to asynchronous conduction within the His bundle in man. *Circulation* *56*, 996–1006. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.56.6.996>.

- Nelson, G.D. (1993). A brief history of cardiac pacing. *Texas Heart Institute Journal* 20, 12–18. .
- Oesterhelt, D., and Stoeckenius, W. (1971). Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature New Biology* 233, 149. <https://doi.org/10.1038/newbio233149a0>.
- Pacak, C.A., Mah, C.S., Thattaliyath, B.D., Conlon, T.J., Lewis, M.A., Cloutier, D.E., Zolotukhin, I., Tarantal, A.F., and Byrne, B.J. (2006). Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo. *Circulation Research* 99. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000237661.18885.f6>.
- Padeletti, L., Pieragnoli, P., Ricciardi, G., Innocenti, L., Checchi, L., Padeletti, M., Michelucci, A., Picariello, F., and Valsecchi, S. (2016). Simultaneous His Bundle and Left Ventricular Pacing for Optimal Cardiac Resynchronization Therapy Delivery: Acute Hemodynamic Assessment by Pressure–Volume Loops. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 9. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.115.003793>.
- Palomeque, J., Chemaly, E.R., Colosi, P., Wellman, J.A., Zhou, S., del Monte, F., and Hajjar, R.J. (2007). Efficiency of eight different AAV serotypes in transducing rat myocardium in vivo. *Gene Therapy* 14, 989–997. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302895>.
- Pape, H.-C., Kurtz, A., and Silbernagl, S. (2014). *Physiologie* (Stuttgart: Georg Thieme Verlag).
- Pianca, N., Zaglia, T., and Mongillo, M. (2017). Will cardiac optogenetics find the way through the obscure angles of heart physiology? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 482, 515–523. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.104>.
- Pillay, S., Meyer, N.L., Puschnik, A.S., Davulcu, O., Diep, J., Ishikawa, K., Jae, L.T., Wosen, J.E., Nagamine, C.M., Chapman, M.S., et al. (2016). An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature* 530, 108–112. <https://doi.org/10.1038/nature16465>.
- Pillay, S., Zou, W., Cheng, F., Puschnik, A.S., Meyer, N.L., Ganaie, S.S., Deng, X., Wosen, J.E., Davulcu, O., Yan, Z., et al. (2017). AAV serotypes have distinctive interactions with domains of the cellular receptor AAVR. *Journal of Virology* 91, JVI.00391-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00391-17>.
- Ponnazhagan, S., Wang, X.-S., Woody, M.J., Luo, F., Kang, L.Y., Nallari, M.L., Munshi, N.C., Zhou, S.Z., and Srivastava, A. (1996). Differential expression in human cells from the p6 promoter of human parvovirus B19 following plasmid transfection and recombinant adeno-associated virus 2 (AAV) infection: human megakaryocytic leukaemia cells are non-permissive for AAV infection. *The Journal of General Virology* 77 (Pt 6), 1111–1122. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-6-1111>.
- Prasad, K.-M.R., Smith, R.S., Xu, Y., and French, B.A. (2011a). A single direct injection into the left ventricular wall of an adeno-associated virus 9 (AAV9) vector expressing extracellular superoxide dismutase from the cardiac troponin-T promoter protects mice against myocardial infarction. *The Journal of Gene Medicine* 13, 333–341. <https://doi.org/10.1002/jgm.1576>.
- Prasad, K.-M.R., Xu, Y., Yang, Z., Acton, S.T., and French, B.A. (2011b). Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: in vivo gene delivery follows a Poisson distribution. *Gene Therapy* 18, 43–52. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.105>.
- Pulicherla, N., Shen, S., Yadav, S., Debbink, K., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Asokan, A. (2011). Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer. *Molecular Therapy* 19, 1070–1078. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.22>.

Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V., and Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature Medicine* 5, 71–77. <https://doi.org/10.1038/4758>.

Raatikainen, M.J.P., Arnar, D.O., Merkely, B., Camm, A.J., and Hindricks, G. (2016). Access to and clinical use of cardiac implantable electronic devices and interventional electrophysiological procedures in the European Society of Cardiology Countries: 2016 Report from the European Heart Rhythm Association. *EP Europace* 18, iii1–iii79. <https://doi.org/10.1093/europace/euw244>.

Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R.J. (2002). Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *Journal of Virology* 76, 791–801. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.2.791-801.2002>.

Rangarajan, S., Walsh, L., Lester, W., Perry, D., Madan, B., Laffan, M., Yu, H., Vettermann, C., Pierce, G.F., Wong, W.Y., et al. (2017). AAV5–Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. <http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMoa1708483> <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708483>.

Rapti, K., Louis-Jeune, V., Kohlbrenner, E., Ishikawa, K., Ladage, D., Zolotukhin, S., Hajjar, R.J., and Weber, T. (2012). Neutralizing antibodies against AAV serotypes 1, 2, 6, and 9 in sera of commonly used animal models. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 73–83. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.177>.

Renz-Polster, H., Krautzig, S., Bätge, B., and Stoll, M. (2013). *Basislehrbuch Innere Medizin* (München: Elsevier Urban & Fischer).

Rho, R.W., and Page, R.L. (2007). The automated external defibrillator. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 18, 896–899. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2007.00822.x>.

Rickards, A.F., and Norman, J. (1981). Relation between QT interval and heart rate. New design of physiologically adaptive cardiac pacemaker. *Heart* 45, 56–61. <https://doi.org/10.1136/hrt.45.1.56>.

Rosen, M.R., Brink, P.R., Cohen, I.S., and Robinson, R.B. (2008). Cardiac Pacing: From Biological to Electronic ... to Biological? *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 1, 54–61. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.764621>.

Roth, B.J. (1995). A mathematical model of make and break electrical stimulation of cardiac tissue by a unipolar anode or cathode. *IEEE Trans Biomed Eng* 42, 1174–1184. <https://doi.org/10.1109/10.476124>.

Rutledge, E.A., Halbert, C.L., and Russell, D.W. (1998). Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2. *Journal of Virology* 72, 309–319. .

Sambelashvili, A.T., Nikolski, V.P., and Efimov, I.R. (2004). Virtual electrode theory explains pacing threshold increase caused by cardiac tissue damage. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 286, H2183–H2194. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00637.2003>.

Samulski, R.J., Chang, L.-S., and Shenk, T. (1987). A Recombinant Plasmid from Which an Infectious Adeno-Associated Virus Genome Can Be Excised In Vitro and Its Use To Study Viral Replication. *Journal of Virology* 61, 6. .

Samulski, R.J., Chang, L.-S., and Shenk, T. (1989). Helper-Free Stocks of Recombinant Adeno-Associated Viruses: Normal Integration Does Not Require Viral Gene Expression. *Journal of Virology* 63, 7. .

- Sasse, P. (2011). Optical Pacing of the Heart: The Long Way to Enlightenment. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 4, 598–600. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.965400>.
- Sasse, P., Funken, M., Beiert, T., and Bruegmann, T. (2019). Optogenetic Termination of Cardiac Arrhythmia: Mechanistic Enlightenment and Therapeutic Application? *Front. Physiol.* 10, 675. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00675>.
- Schmidt, M., Grot, E., Cervenka, P., Wainer, S., Buck, C., and Chiorini, J.A. (2006). Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. *Journal of Virology* 80, 5082–5085. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.5082-5085.2006>.
- Schmidt, M., Voutetakis, A., Afione, S., Zheng, C., Mandikian, D., and Chiorini, J.A. (2008a). Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *Journal of Virology* 82, 1399–1406. <https://doi.org/10.1128/JVI.02012-07>.
- Schmidt, M., Govindasamy, L., Afione, S., Kaludov, N., Agbandje-McKenna, M., and Chiorini, J.A. (2008b). Molecular characterization of the heparin-dependent transduction domain on the capsid of a novel adeno-associated virus isolate, AAV(VR-942). *Journal of Virology* 82, 8911–8916. <https://doi.org/10.1128/JVI.00672-08>.
- Schmidt, U., Hajjar, R.J., Helm, P.A., Kim, C.S., Doye, A.A., and Gwathmey, J.K. (1998). Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 1929–1937. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0748>.
- Schuder, J.C. (1970). Completely implanted defibrillator. *JAMA* 214, 1123. .
- Sharma, P.S., Ellison, K., Patel, H.N., and Trohman, R.G. (2017). Overcoming left bundle branch block by permanent His bundle pacing: Evidence of longitudinal dissociation in the His via recordings from a permanent pacing lead. *HeartRhythm Case Reports* 3, 499–502. <https://doi.org/10.1016/j.hrcr.2017.08.002>.
- Shen, S., Bryant, K.D., Brown, S.M., Randell, S.H., and Asokan, A. (2011). Terminal n-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus. *Journal of Biological Chemistry* 286, 13532–13540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210922>.
- Shen, S., Bryant, K.D., Sun, J., Brown, S.M., Troupes, A.N., Pulicherla, N., and Asokan, A. (2012). Glycan Binding Avidity Determines the Systemic Fate of Adeno-Associated Virus Type 9. *Journal of Virology* 86, 10408–10417. <https://doi.org/10.1128/JVI.01155-12>.
- von Skramlik, E. (1954). Die Regelung der Strömungsrichtung des Blutes. *Experientia* 10, 441–454. <https://doi.org/10.1007/BF02170395>.
- Smith, C.J., Sun, D., Hoegler, C., Roth, B.S., Zhang, X., Zhao, G., Xu, X.-B., Kobari, Y., Pritchard, K., Sessa, W.C., et al. (1996). Reduced Gene Expression of Vascular Endothelial NO Synthase and Cyclooxygenase-1 in Heart Failure. *Circulation Research* 78, 58–64. <https://doi.org/10.1161/01.RES.78.1.58>.
- Snyder, R.O., Spratt, S.K., Lagarde, C., Bohl, D., Kaspar, B., Sloan, B., Cohen, L.K., and Danos, O. (1997). Efficient and Stable Adeno-Associated Virus-Mediated Transduction in the Skeletal Muscle of Adult Immunocompetent Mice. *Human Gene Therapy* 8, 1891–1900. <https://doi.org/10.1089/hum.1997.8.16-1891>.

Stewart, M.J., Plautz, G.E., Del Buono, L., Yang, Z.Y., Xu, L., Gao, X., Huang, L., Nabel, E.G., and Nabel, G.J. (1992). Gene transfer in vivo with DNA-liposome complexes: safety and acute toxicity in mice. *Human Gene Therapy* 3, 267–275. <https://doi.org/10.1089/hum.1992.3.3-267>.

Summerford, C., and Samulski, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *Journal of Virology* 72, 1438–1445. .

Summerford, C., Bartlett, J.S., and Samulski, R.J. (1999). $\alpha V\beta 5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature Medicine* 5, 78–82. <https://doi.org/10.1038/4768>.

Svensson, E.C., Marshall, D.J., Woodard, K., Lin, H., Jiang, F., Chu, L., and Leiden, J.M. (1999). Efficient and Stable Transduction of Cardiomyocytes After Intramyocardial Injection or Intracoronary Perfusion With Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors. *Circulation* 99, 201–205. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.2.201>.

Terracciano, C.M.N., Hardy, J., Birks, E.J., Khaghani, A., Banner, N.R., and Yacoub, M.H. (2004). Clinical Recovery From End-Stage Heart Failure Using Left-Ventricular Assist Device and Pharmacological Therapy Correlates With Increased Sarcoplasmic Reticulum Calcium Content but Not With Regression of Cellular Hypertrophy. *Circulation* 109, 2263–2265. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129233.51320.92>.

Tovar, O., and Tung, L. (1992). Electroporation and recovery of cardiac cell membrane with rectangular voltage pulses. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 263, H1128–H1136. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.263.4.H1128>.

Trappe, H.-J. (2014). Dreißig Jahre Defibrillatortherapie in Deutschland (1984–2014). *Der Kardiologe* 8, 125–137. <https://doi.org/10.1007/s12181-014-0565-0>.

Trappe, H.-J. (2016). Weltweite Erfahrungen mit automatisierten externen Defibrillatoren. *Herzschrittmachertherapie & Elektrophysiologie* 27, 31–37. <https://doi.org/10.1007/s00399-016-0414-x>.

Trappe, H.-J. (2019). Bradykarde Herzrhythmusstörungen. *Intensivmedizin up2date* 15, 39–52. <https://doi.org/10.1055/a-0636-1808>.

Trappe, H.-J., and Gummert, J. (2011). Current pacemaker and defibrillator therapy. *Deutsches Arzteblatt International* 108, 372–379; quiz 380. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2011.0372>.

Tung, L., Sliz, N., and Mulligan, M.R. (1991). Influence of electrical axis of stimulation on excitation of cardiac muscle cells. *Circ Res* 69, 722–730. .

Ufberg, J.W., and Clark, J.S. (2006). Bradydysrhythmias and atrioventricular conduction blocks. *Emergency Medicine Clinics of North America* 24, 1–9, v. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2005.08.006>.

Vandenbergh, L., and Wilson, J. (2007). AAV as An Immunogen. *Current Gene Therapy* 7, 325–333. <https://doi.org/10.2174/156652307782151416>.

Vannucci, L., Lai, M., Chiappesi, F., Ceccherini-Nelli, L., and Pistello, M. (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *The New Microbiologica* 36, 1–22. .

Vassalli, G., Büeler, H., Dudler, J., von Segesser, L.K., and Kappenberger, L. (2003). Adeno-associated virus (AAV) vectors achieve prolonged transgene expression in mouse myocardium and arteries in vivo:

- a comparative study with adenovirus vectors. *International Journal of Cardiology* 90, 229–238. [https://doi.org/10.1016/S0167-5273\(02\)00554-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5273(02)00554-5).
- Vijayaraman, P., Chung, M.K., Dandamudi, G., Upadhyay, G.A., Krishnan, K., Crossley, G., Bova Campbell, K., Lee, B.K., Refaat, M.M., Saksena, S., et al. (2018). His Bundle Pacing. *Journal of the American College of Cardiology* 72, 927–947. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.06.017>.
- Vogt, C.C., Bruegmann, T., Malan, D., Ottersbach, A., Roell, W., Fleischmann, B.K., and Sasse, P. (2015). Systemic gene transfer enables optogenetic pacing of mouse hearts. *Cardiovascular Research* 106, 338–343. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv004>.
- Wagner, G., Oesterhelt, D., Krippahl, G., and Lanyi, J.K. (1981). Bioenergetic role of halorhodopsin in *Halobacterium halobium* cells. *FEBS Letters* 131, 341–345. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80399-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80399-7).
- Wahls, S.A. (1985). Sick sinus syndrome. *American Family Physician* 31, 117–124. .
- Walters, R.W., Yi, S.M.P., Keshavjee, S., Brown, K.E., Welsh, M.J., Chiorini, J.A., and Zabner, J. (2001). Binding of Adeno-associated Virus Type 5 to 2,3-Linked Sialic Acid is Required for Gene Transfer. *Journal of Biological Chemistry* 276, 20610–20616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101559200>.
- Wang, C.Y., and Huang, L. (1989). Highly Efficient DNA Delivery Mediated by pH-Sensitive Immunoliposomes. *Biochemistry* 28, 9508–9514. <https://doi.org/10.1021/bi00450a039>.
- Weirich, W.L., Gott, V.L., and Lillehei, C.W. (1957). The treatment of complete heart block by the combined use of a myocardial electrode and an artificial pacemaker. *Surgical Forum* 8, 360–363. .
- Weller, M.L., Amornphimoltham, P., Schmidt, M., Wilson, P.A., Gutkind, J.S., and Chiorini, J.A. (2010). Epidermal growth factor receptor is a co-receptor for adeno-associated virus serotype 6. *Nature Medicine* 16, 662–664. <https://doi.org/10.1038/nm.2145>.
- Williams, D.F. (1977a). Titanium as a metal for implantation. Part 1: physical properties. *J Med Eng Technol* 1, 195–198, 202 contd. .
- Williams, D.F. (1977b). Titanium as a metal for implantation. Part 2: biological properties and clinical applications. *J Med Eng Technol* 1, 266–270. .
- Williams, P.D., Ranjzad, P., Kakar, S.J., and Kingston, P.A. (2010). Development of viral vectors for use in cardiovascular gene therapy. *Viruses* 2, 334–371. <https://doi.org/10.3390/v2020334>.
- Wolff, J., Malone, R., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465. <https://doi.org/10.1126/science.1690918>.
- Wu, B., Moulton, H.M., Iversen, P.L., Jiang, J., Li, J., Li, J., Spurney, C.F., Sali, A., Guerron, A.D., Nagaraju, K., et al. (2008). Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 14814–14819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805676105>.
- Wu, Z., Miller, E., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J. (2006a). α 2,3 and α 2,6 N-Linked Sialic Acids Facilitate Efficient Binding and Transduction by Adeno-Associated Virus Types 1 and 6. *Journal of Virology* 80, 9093–9103. <https://doi.org/10.1128/JVI.00895-06>.

Wu, Z., Asokan, A., and Samulski, R.J. (2006b). Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Molecular Therapy* *14*, 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.05.009>.

Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S.C., McCullough, B., Gao, G.-P., and Wilson, J.M. (1999). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *Journal of Virology* *73*, 3994–4003. .

Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *Journal of Virology* *70*, 8098–8108. <https://doi.org/10.1109/ICETCE.2011.5776210>.

Xie, Y., Sato, D., Garfinkel, A., Qu, Z., and Weiss, J.N. (2010). So Little Source, So Much Sink: Requirements for Afterdepolarizations to Propagate in Tissue. *Biophysical Journal* *99*, 1408–1415. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.042>.

Xu, L., Gutbrod, S.R., Bonifas, A.P., Su, Y., Sulkin, M.S., Lu, N., Chung, H.-J., Jang, K.-I., Liu, Z., Ying, M., et al. (2014). 3D multifunctional integumentary membranes for spatiotemporal cardiac measurements and stimulation across the entire epicardium. *Nature Communications* *5*, 3329. <https://doi.org/10.1038/ncomms4329>.

Zaglia, T., Pianca, N., Borile, G., Da Broi, F., Richter, C., Campione, M., Lehnart, S.E., Luther, S., Corrado, D., Miquerol, L., et al. (2015). Optogenetic determination of the myocardial requirements for extrasystoles by cell type-specific targeting of ChannelRhodopsin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *112*, E4495–504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509380112>.

Zhang, F., Wang, L.-P., Boyden, E.S., and Deisseroth, K. (2006). Channelrhodopsin-2 and optical control of excitable cells. *Nature Methods* *3*, 785. <https://doi.org/10.1038/nmeth936>.

Zhang, F., Wang, L.-P., Brauner, M., Liewald, J.F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P.G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., et al. (2007). Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* *446*, 633–639. <https://doi.org/10.1038/nature05744>.

Zhang, F., Prigge, M., Beyrière, F., Tsunoda, S.P., Mattis, J., Yizhar, O., Hegemann, P., and Deisseroth, K. (2008). Red-shifted optogenetic excitation: A tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nature Neuroscience* *11*, 631–633. <https://doi.org/10.1038/nn.2120>.

Zhang, F., Vierock, J., Yizhar, O., Fenno, L.E., Tsunoda, S.P., Kianianmomeni, A., Prigge, M., Berndt, A., Cushman, J., Polle, J., et al. (2011). The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools. *Cell* *147*, 1446–1457. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.004>.

Zimetbaum, P. (2017). Atrial Fibrillation. *Annals of Internal Medicine* *166*, ITC33. <https://doi.org/10.7326/AITC201703070>.

Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular Therapy* *16*, 1073–1080. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.76>.

Zsebo, K.M., Yaroshinsky, A., Rudy, J.J., Wagner, K., Greenberg, B., Jessup, M.L., and Hajjar, R.J. (2014). Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circulation Research* *114*, 101–108. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302421>.

10 Anhang

10.1 Liste der Publikationen

10.1.1 Zeitschriften

1. Vogt, C.C., Bruegmann, T., Malan, D., Ottersbach, A., Roell, W., Fleischmann, B.K., and Sasse, P. (2015). Systemic gene transfer enables optogenetic pacing of mouse hearts. *Cardiovascular Research* 106, 338–343. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv004>
2. Bruegmann, T., van Bremen, T., Vogt, C.C., Send, T., Fleischmann, B.K., and Sasse, P. (2015). Optogenetic control of contractile function in skeletal muscle. *Nature Communications* 6, 7153. <https://doi.org/10.1038/ncomms8153>
3. Bruegmann, T., Boyle, P.M., Vogt, C.C., Karathanos, T.V., Arevalo, H.J., Fleischmann, B.K., Trayanova, N.A., and Sasse, P. (2016). Optogenetic defibrillation terminates ventricular arrhythmia in mouse hearts and human simulations. *The Journal of Clinical Investigation* 126, 3894–3904. <https://doi.org/10.1172/JCI88950>
4. Bruegmann, T., Beiert, T., Vogt, C.C., Schrickel, J.W., and Sasse, P. (2018). Optogenetic termination of atrial fibrillation in mice. *Cardiovascular Research* 114, 713–723. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx250>

10.1.2 Vorträge

1. “Optogenetic pacing of native mouse hearts using gene transfer of Channelrhodopsin 2”, Graduierten Schule THEME MedNeuro, 4. THEME Symposium 2013, Bad Honnef, Vortragspreis für eine exzellente Präsentation.
2. “Channelrhodopsin-2 expression in native mouse hearts through systemic delivery of adeno-associated viruses enables optogenetic pacing”, 93. Deutsche Physiologen Tagung 2014, Mainz
3. “Optical pacing of the native mouse heart enabled through systemic delivery of ChR2 via AAV”, 3. Symposium der Jungen Physiologen 2014, Bonn

10.1.3 Posterbeiträge

1. "Light-induced pacing of mouse hearts in vivo by gene transfer of Channelrhodopsin-2", Graduierten Schule THEME MedNeuro, 3. THEME Symposium 2012, Bad Honnef
2. "Optogenetic pacing of native mouse hearts using gene transfer of Channelrhodopsin 2", 92. Deutsche Physiologen Tagung 2013, Heidelberg
3. "Viral transfer of ChR2 into native mouse hearts enables optical pacing", Cardioslim EHRA Europace 2014, Nizza

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit hätte ich ohne die Unterstützung zahlreicher Personen in dieser Form nicht realisieren können. An dieser Stelle möchte ich mich für die vielfältige Hilfe sehr herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Philipp Saße. Vielen Dank für die Chance an diesem interessanten Thema forschen zu können. Vielen Dank für dein Engagement, deine Unterstützung und der außerordentlichen Betreuung.

Frau Professorin Kostenis, Herr Professor Fürst und Herr Professor Höhfeld danke ich für die Bereitschaft die übrigen Aufgaben der Prüfungskommission, als Fachfremdes Mitglied, Vorsitz der Prüfungskommission und 2. Gutachter anzunehmen.

Herr Professor Fleischmann möchte ich danken für die Möglichkeit am Institut für Physiologie 1 an der Uniklinik Bonn arbeiten zu können. Vielen Dank, dass Sie zu Beginn die Rolle des Doktorvaters übernommen haben und für die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie 1 der Uniklinik Bonn danke ich für eine unvergesslich schöne Zeit. Vielen Dank für das gemeinsame Durchstehen bei guten und vor Allem bei schlechten Zeiten und für die vielen Freundschaften die ich in dieser Zeit gewonnen habe. Besonders bedanken möchte ich mich hier bei Daniela Malan!

Meinen Freunden aus meiner Heimat danke ich für bereits über 20 Jahre tiefe und loyale Freundschaft. Völlig egal wo ich bin, ihr seid immer bei mir! Vielen Dank an Crispin, Lena, Meli, Möcki, Steffi, Stephan, Sven, Timo und Tine!

Mein besonderer Dank geht an meine Eltern für Ihre Liebe, Ihre Unterstützung und Ihren unerschütterlichen Glauben an mich!

Without you, Ma and Pa, I would never have been able to do this!

Christoph Vogt

Graben-Neudorf, 30.06.2022