

**I. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technische Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
Direktor: Univ.Prof. Dr.A. Schoemig**

**Vergleich dreier Vektorsysteme für den koronaren Gentransfer  
-eine Untersuchung an Hausschweinen-**

**Philipp Andreas Sack**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation

1. Honorarprof. Dr F.-J. Neumann
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gaensbacher

Die Dissertation wurde am 19.09.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2003 angenommen.

1	Einleitung und Fragestellung	4
2	Material und Methoden	7
2.1	Vektorkonstruktion	
2.1.1	Liposomen als Vektor	7
2.1.2	Adenovirus als Vektor	7
2.1.3	Adeno-assoziiertes Virus als Vektor	8
2.2	Zellkulturmethoden	
2.2.1	Gewinnung primärer porciner glatter Muskelzellen (pSMC)	9
2.2.2	Gewinnung primärer humaner Endothelzellen (HUVEC)	10
2.2.3	Humane ECV-304	10
2.3	Transfektion vaskulärer Zellen in Kultur	
2.3.1	Transfektion mit Liposomen als Vektor	11
2.3.2	Transfektion mit Adenovirus als Vektor	12
2.3.3	Transfektion mit adeno-assoziiertem Virus als Vektor	13
2.4	Intrakoronare Transfektion bei Hausschweinen	14
2.5	Histologische Auswertung	16
3	Ergebnisse	17
3.1	Expression des Transgens in Zellkultur	
3.1.1	Expression mit Liposomen als Vektor	20
3.1.2	Expression mit Adenovirus als Vektor	20
3.1.3	Expression mit adeno-assoziiertem Virus als Vektor	20
3.2	Expression des Transgens in porcinen Koronararterien	
3.2.1	Expression mit Liposomen als Vektor	25
3.2.2	Expression mit Adenovirus als	25

3.2.3	Expression mit adeno-assoziiertem Virus als Vektor	26
3.2.4	Negativkontrollen	26
4	Diskussion	
4.1	Vektorsystem für den koronaren Gentransfer	27
4.2	Übertragbarkeit von Zellkulturergebnissen auf das Tiermodell	29
4.3	Das Tiermodell	31
4.4	Der mikroporöse Ballonkatheter	32
5		
5.1	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	34
5.2	Ausblick	35
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>36</b>

## **1 Einleitung und Fragestellung**

Das Auftreten von Restenose nach perkutaner transluminaler coronarer Angioplastie (PTCA) ist ein bisher ungelöstes Problem der interventionellen Kardiologie (1). Die Langzeitergebnisse nach Intervention werden bei etwa 30-50% der Patienten durch klinisch relevante Restenosen beeinträchtigt, und verursachen eine erhebliche Morbidität und Kosten.

Die Art der Restenose hängt vom gewählten Verfahren ab: Bei Verwendung von Stents kommt es durch Proliferation glatter Muskelzellen und Einlagerung extrazellulärer Matrix zu einer Neointimabildung, während nach Angioplastie alleine vor allem elastische Rückstellkräfte, und das sog. vaskuläre „remodeling“, die vaskuläre Schrumpfung als Pathomechanismus im Vordergrund stehen.

Die bislang angewandten Behandlungsstrategien zur Verminderung der Restenoserate waren nur teilweise erfolgreich. In experimentellen Studien wurden verschiedene zelluläre und molekulare Behandlungsansätze identifiziert. Medikamentöse Behandlungsversuche erzielten jedoch keinen entscheidenden Behandlungserfolg (2). Die lokale Konzentration aktiver Metabolite nach systemischer Anwendung blieb zu niedrig, oder nach lokaler Anwendung zu kurzfristig, um wesentliche Effekte zu erzielen. Tierexperimentell erprobte Ansätze waren an Patienten nicht effektiv und bestätigen, dass Tierexperimente kaum eine Übertragbarkeit auf die klinische Situation erlauben. Deshalb werden neue Ansätze gesucht, um die neointimale Proliferation nach interventioneller Revaskularisierung zu verhindern.

Vaskuläre Gentherapie ist ein interessanter Ansatz um die Initiation der Restenose zu beeinflussen. Das wurde durch erfolgreiche antiproliferative Strategien mit Genen des Zellzyklus gezeigt, mit denen es gelang die Reaktion auf Gefäßwandverletzungen in Tierexperimenten zu vermindern (3, 4).

Neben der Wahl des geeigneten Transgens ist die Wahl des geeigneten Vektors entscheidend. Im Rahmen der Entwicklung einer lokalen vaskulären Gentherapie wurden in der vorliegenden Untersuchung drei verschiedene Vektoren verglichen:

Liposomaler Gentransfer, Adenovirus (AdV) und adeno-assoziiertes Virus (AAV) als Vektoren in verschiedenen Zelltypen, die für die Gefäßbiologie relevant sind.

Mit Hilfe eines mikroporösen Ballonkatheters wurden diese Vektoren in Koronararterien von Schweinen eingebracht und die erreichte Expressionseffizienz mit den Resultaten in der Zellkultur verglichen.

Der bisher meist verwandte Vektor, das Adenovirus, besitzt den Nachteil eines relevanten immunogenen Potentials (5).

Adeno-assoziiertes Virus besitzt einige theoretische Vorteile (6): Es verursacht eine latente Infektion durch Integration des Vektorgenoms in die chromosomale DNA, und eine daraus resultierende lang anhaltende Expression des Transgens (7). Eine Pathogenität für den Menschen wurde bislang nicht beschrieben.

Es wurde eine Genexpression über Monate nach Applikation von adeno-assoziiertem Virus in verschiedenen Tiermodellen beobachtet (8-11), wenn auch der Beginn der Expression erheblich variiert.

Nur wenige Untersuchungen des Gentransfers haben sich bislang mit der Übertragbarkeit der Ergebnisse von Zellkulturen auf das Tiermodell beschäftigt (12, 13), trotz Transfektion desselben Zelltyps *in vitro* und *in vivo* variieren die erzielten Transfektionsraten erheblich.

Bisherige Untersuchungen zur gentherapeutischen Hemmung der neointimalen Proliferation erfolgten überwiegend an peripheren Gefäßen, der Art. carotis comunis oder isolierten Gefäßsegmenten (14-16). Durch nahezu beliebig lange Inkubation der Gefäßabschnitte mit einer Suspension mit dem eingesetzten Vektor wurden die Effizienzen zwar verbessert, doch dürfte diese Methode für die klinische Anwendung bedeutungslos sein (17).

Die Verwendung intrakoronarer Applikationsformen bringen das Problem der temporären Okklusion des Gefäßes mit sich. Die effektive Applikationszeit des Gentransfers ist je nach gewähltem Verfahren kurz, will man doch relevante Myokardischämien vermeiden. Erfolgreiche Transfektion in eine Koronararterie am Schweinemodell wurden bislang insbesondere mit dem sogenannten Infiltrationskatheter erreicht (18-20), ein Verfahren das aufgrund des dabei

entstehenden Penetrationsschadens der Gefäßwand ebenfalls klinisch kaum anwendbar sein dürfte.

French et al. 1994 benutzten einen Katheter mit einem porösen Ballon um rekombinante Adenoviren in Koronararterien von Schweinen einzubringen, fanden aber nur eine geringe Zahl transfizierter Zellen (21).

Der weiterentwickelte mikroporöse Ballon könnte aber eine attraktive Alternative darstellen, weil unter Druck in kurzer Zeit die Vektorsuspension in die Koronargefäßwand eingebracht werden kann.

Ziel der Untersuchung war es, einen geeigneten Vektor für den koronaren Gentransfer mit dem mikroporösen Ballon zu finden, um eine Voraussetzung für die Entwicklung antiproliferativer Strategien nach interventioneller Revaskularisierung zu schaffen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Vektorkonstruktion**

#### **2.1.1 Liposomen als Vektor**

Für den liposomalen Gentransfer benutzten wir ein Expressionsplasmid (pCMV $\beta$ , Clontech

Laboratories) mit lacZ als Reportergen, unter der Kontrolle eines Cytomegalie „immediate-early“ Promotors, 1  $\mu$ g/ml, und das liposomale Transfektionsreagenz Superfect® (Fa. Qiagen).

Für die Experimente im Tiermodell wurden 50  $\mu$ g Plasmid DNA in 2ml physiologischer Kochsalzloesung für den liposomalen Gentransfer verwendet, ebenfalls als Plasmid-Liposomen Komplex.

#### **2.1.2 Adenovirus als Vektor**

Es wurde ein E1a-deletiertes, replikationsdefizientes rekombinantes Adenovirus vom Serotyp A (AdCMV- $\beta$ -GAL) verwendet mit dem für  $\beta$ -Galactosidase kodierende Reportergen unter Kontrolle eines humanen Cytomegalievirus Promotors. Das Virus wurde durch Kotransfektion subkonfluenten HEK 293 T-Zellen nach der Calcium-Phosphat-Kopräzipitationsmethode gewonnen wurde, und in HEK 293 T-Zellen propagiert (27).

Die in den Zellkulturexperimenten verwandte Konzentrationen lagen bei  $5 \times 10^7$  plaque forming units (pfu) pro 1 ml, es resultierte eine multiplicity of infection (moi) von 100.

Für die Versuche mit Adenovirus im Tiermodell wurden ebenfalls  $5 \times 10^7$  plaque forming units pro 1 ml verwendet.

### 2.1.3 Adeno-assoziiertes Virus als Vektor

Rekombinante adeno-assoziierte Viruspartikel wurden durch Kotransfektion epithelialer Zellen (293 T) mit AAV-Vektorplasmid mit dem lacZ Gen und dem packaging plasmid pDG produziert. (Grimm, et al. 1998, 22)

Das Helfer-Plasmid pDG, das die *rep* und *cap* Sequenzen enthält, wurde mit der Calcium-Phosphat Kopräzipitationsmethode mit dem das Reportergen lacZ enthaltenden Vektor-Plasmid kotransfiziert (23).

Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden bei 35°C und 3% CO<sub>2</sub>, wurden die Zellen für eine weitere Periode von 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in mit D-MEM Medium und 10% fetalem Kälberserum-Zusatz (GIBCO BRL) inkubiert.

Nach Ablösen und Sammeln wurden die Zellen durch standardisiertes Einfrieren und Auftauen desintegriert, so dass nach einem Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm der Überstand mit den viralen Partikeln gewonnen werden konnte und der Zelldetritus verworfen wurde (24).

Eine Konzentrierung von AAV-β-GAL wurde durch Säulenchromatographie auf sulfonierter Zellulose erreicht (Fa. Amicon). Anschließend wurden die viralen Partikel durch Zentrifugation bei 12000 rpm über 10 Min. durch ein Saccharose-Kissen (30/50%) gereinigt (25). Es wurden Konzentrationen zwischen 10<sup>9</sup>-10<sup>10</sup> transduzierender Partikel pro 1 ml erreicht .

Die Zahl der transduzierenden Partikel wurde durch eine C-12 Hybridom Zelllinie in einer Blot-Hybridisierung mit einer Digoxigenin markierten Sonde für den Cytomegalie-virus „immediate early“ Promotor bestimmt (26).

Die verwendete Konzentration lag bei den Versuchen in Zellkultur in einer Größenordnung von 5x10<sup>7</sup> transduzierenden viralen Partikeln pro ml, und im Tierversuch etwa 10<sup>7</sup> transduzierender Partikel.

## 2.2 Methoden der Zellkultur

### 2.2.1 Gewinnung primärer glatter Muskelzellen vom Schwein

Porcine glatte Muskelzellen (pSMC) wurden durch enzymatische Digestion mit Kollagenase Typ1 aus einer aus Hausschweinen explantierten Aorta gewonnen (28):

1. Spülen der Schweineaorta mit sterilem NaCl 0.9%, um Blut zu entfernen.
2. Herstellen der Enzymlösung: 50 ml Medium 199
  - + 10 mg Trypsin
  - + 50 mg Elastase
  - + 100 mg Kollagenase

#### 3. pSMC - Gewinnung:

Je nach Größe des Aortenexplantates in vier gleich große (2-4 cm<sup>2</sup>) Stücke zerteilen und feuchthalten. Danach oberste endoluminale Zellschicht abschaben und wegspülen, zur Entfernung des meisten Endothels.

Mit Storchenschnabel-Pinzette Media-Schicht durchdringen und abheben, danach

mit normaler Pinzette Media streifenweise abziehen und diese in Petrischalen (10 cm) mit Medium M 199 (Fa. Clonetics) einlegen.

Das Medium entfernen und mit 12.5 ml Enzymlösung versetzen.

Die Petrischale mit Parafilm versiegeln und 3-5 Stunden im Schüttel - Wasserbad bei 37°C inkubieren.

Inaktivierung der Enzymlösung durch Zugabe von 2 ml 10 % fetalem Kälberserum

pSMC in Suspension aufnehmen, und in 15 ml Falcon-Röhrchen überführen.

Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes, Resuspension und Auslegen in 25 cm<sup>2</sup> Flaschen, Zugabe von 5ml SMC-Wachstumsmedium (SmBm-Medium, Fa. Gibco BRL), Inkubation im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C.

24 Std später sind wachstumsfähige SMC adhärirt, avitale Zellen werden mit Phosphat-gepufferter- Kochsalzlösung (PBS) abgspuelt, und frisches Wachstumsmedium hinzugegeben.

Propagiert wurden die pSMC in SmBm-Medium (Gibco BRL), das 20% fetales Kälberserum enthält, bei 5% CO<sub>2</sub> und 37<sup>o</sup> C.

Charakterisiert wurden die Zellen durch Immunofloureszenz-Färbung für Muskelzell-Aktin.(DAKO-Carpinteria,CA).

Für die Experimente in Zellkultur wurden Zellen in der 2.-5. Passage verwandt.

### **2.2.2 Gewinnung primärer Endothelzellen aus humaner Nabelschnur**

Human umblical vein endothelial cells (HUVEC) wurden aus humaner Nabelschnur durch die Kollagenase-Digestionsmethode gewonnen, wie beschrieben (29). Propagiert wurden sie bei 37<sup>o</sup>C und 5% CO<sub>2</sub> in EBM-Medium (Fa.Clonetics) mit folgenden Zusätzen:

- je 500.0 ml EBM-Medium
- + 0.5 mg/ml h-EGF
- + 0.5 mg/ml Hydrocortison
- + 0.5 mg/ml Gentamycin/Amphotericin
- + 2.0 mg/ml bovines Hirnextrakt
- + 25.0 mg/ml fetales Kälberserum

### **2.2.3 Die humane Endothelzelllinie ECV-304**

h-ECV-304, die bisher als immortalisierte humane Endothelzelllinie galt, wurde vor kurzem als Abkömmling einer humanen Blasenepithelzelllinie T24 neu beschrieben (30); trotz dieser Unsicherheit verblieb diese Zelllinie in der Studie, weil die Oberflächenantigene, z.B. ICAM-1, denen von Endothelzellen entsprechen.

Propagiert wurden ECV-304 Zellen mit Medium 199 (Biofluids; Rockville, MD) bei 37<sup>o</sup>C, und 5% CO<sub>2</sub>.

## 2.3 Transfektionsversuche vaskulärer Zellen in Kultur

### 2.3.1 Transsfektionsversuche vaskulärer Zellen in Kultur mit Liposomen als Vektoren

Für liposomalen Gentransfer in ECV-304 Zellen, pSMC-Zellen und HUVEC-Zellen wurde Plasmid DNA in serumfreie Zellkultur-Medium verdünnt und anschließend Liposomen hinzugefügt, wie im folgenden Protokoll beschrieben. Nach 5-10 minütiger Inkubation wurde die Mischung mit Zellkultur-Nährmedien auf 1µg/ml verdünnt.

Diese Plasmid-Liposomenkomplex Suspension wurde den drei Zelllinien für je zwei Stunden zur Inkubation hinzugefügt, und anschließend durch serumhaltiges Medium in geeigneter Konzentration ersetzt (47).

Im Einzelnen sah das Versuchsprotokoll folgende Schritte vor:

1. 24 Stunden vor Transfektion wurden  $2-8 \times 10^5$  Zellen pro 60 mm Vertiefung in 5ml Wachstumsmedium ausgelegt, unter Zusatz von Serum und Antibiotika.
2. Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, so dass eine Konfluenz von 60%-70% erreicht wurde.
3. Verdünnung von 1µg DNA mit EDTA-Puffer (pH 7.4) zu einem Volumen von 150 µl. Zusatz von 8 ml Enhancer und 1 sec durchmischen.
4. Inkubation bei 20-25°C, 2-5 min.
5. Zusatz von 25 µl „Effectene“ Transfektionsreagens zu dieser Mischung, 10 sec. Vortex
6. Inkubation bei 20 - 25 °C zur Liposomen-Komplexformation
7. In dieser Zeit Abziehen des Wachstumsmediums von der 60 mm Vertiefung, und waschen der Zellen mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS). Hinzugabe von frischem Wachstumsmedium 4 ml.
8. Zugabe von 1 ml Wachstumsmedium zur Suspension der Komplexe. Vorsichtige Resuspension. Aufnahme der Transfektionskomplexe und Pipettierung auf die Zellen in den 60 mm Vertiefungen. Auf gleichmässige Verteilung durch vorsichtiges Schwenken achten.
9. Inkubation der Zellen mit den Komplexen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter mikroskopischer Kontrolle, nach 24 Stunden Beginn der Expression.

Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität durch Hinzufügung des chromogenen Substrates X-Gal evaluiert:

1. Fixierung der Zellen mit 2% Formaldehyd und 0,2 % Glutaraldehyd.
2. Zweimaliges waschen der Zellen mit PBS
3. Färben mit 3 mmol/L  $K_4Fe(CN)_6$ , 3 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$ , 15mmol/L NaCl und 1 mg/mL X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-4-galactopyranoside) in 44 mmol/L HEPES.
4. Inkubation 2 Stunden, anschließende mikroskopische Auszählung der spezifisch blau gefärbten Zellen, was eine Einschätzung der Transfektionsrate erlaubt.

### **2.3.2 Transfektionsversuche vaskulärer Zellen in Kultur mit Adenovirus (AdV) als**

#### **Vektor**

Für die Transfektionsversuche wurden humane ECV-304, humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC) sowie pSMC in 6 well-Platten ausgelegt, etwa  $5 \times 10^5$  pro Vertiefung, und bei 36°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Eine subkonfluente Zelllage mit einer Zelldichte von 60%-70% wurde nach 36 Stunden erreicht.

Transfiziert wurde durch zweistündige Inkubation mit Adenovirus (AdV) als Vektor, mit Hilfe des jeweiligen spezifischen Zellmediums, ohne Zusatz von fetalem Kälberserum.

Anschließend wurde serumhaltiges Medium hinzugefügt und dieses nach 24 Std. ausgetauscht.

Medien der Zellkultur:

h-ECV-Zellen: 500.0 ml Medium 199  
+ 10.0 ml PBS  
+ 1,3 mg/ml L-Glutamin  
+ 20.0 mg/ml FCS  
+ 10.0 mg/ml Penicillin/Streptomycin



SMC-Zellen:     500.0 ml Wachstumsmedium SmBm (Fa GIBCO)  
+ 1.0 mg/ml Penicillin/Streptomycin  
+ 1.0 mg/ml Amphotericin B  
+ 50.0 mg/ml fetales Kälberserum (FCS)

#### HUVEC-Zellen

500.0 ml EBM-Medium (Fa Clonetics)  
0.5 mg/ml h-EGF  
0.5 mg/ml Gentamycin/Amphotericin  
25.0 mg/ml FCS

## **2.4 Intrakoronare Transfektion am Schwein**

Tierpflege und Behandlung wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz unter Aufsicht eines Veterinärmediziners durchgeführt.

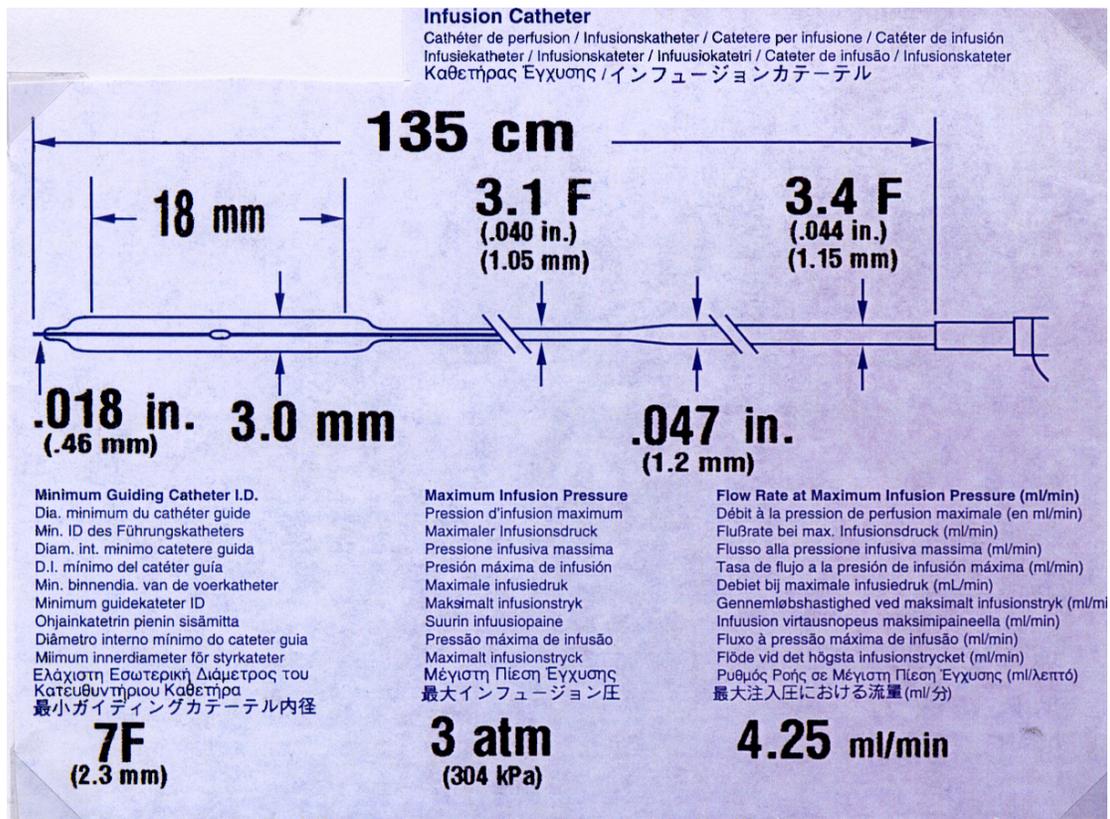
Männliche Hausschweine mit einem Gewicht von ca. 30 - 35 kg wurden mit Ketamin 10 mg/kg intramuskulär, sowie Atropin 0.5 mg/kg prämediziert. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit Narcobabital intravenös.

Nach endotrachealer Intubation wurde die Anästhesie mit 1% Isoflurangas erhalten und gesteuert. Den ganzen Eingriff hindurch wurde eine kontinuierliche Fentanylinfusion (0.025 mg/kg) beibehalten, sowie eine pulsoxymetrische und EKG-Überwachung durchgeführt.

Nach einem initialen Heparinbolus von 5000 IU, wurden über die A. carotis com. die Koronararterien mit einem Standard 7 F Guiding Katheter dargestellt.

In zwei Koronararterien wurde ein möglichst gerades Segment ohne Seitenabgaenge für die Vektorapplikation gewählt; diese Segmente wurden mit Standard Angioplastie Kathetern und einem Druck von 10 atm vordilatiert, „ballon-to-vessel-ratio“ von 1.3. Anschließend wurde der Standard Angioplastie Ballonkatheter gegen den Infusionskatheter mit mikroporösem Ballon ausgetauscht. (Infusionskatheter „Crescendo“, Cordis Cooperation)

## Schematische Darstellung eines Infusionskatheters:



Es wurde 1.5 ml vektorhaltige Suspension mit einem Druck von 3 atm über 60 Sekunden appliziert.

Die Vektorlösungen wurden in jeweils in zwei Koronararterien appliziert, die dritte diente als unbehandelte Negativkontrolle für die anschließende histologische Auswertung.

Nach Applikation der Suspension wurde der mikroporöse Ballonkatheter zurückgezogen und der Zugang an der Art. carotis com. liegt.

So wurden insgesamt 18 Koronararterien behandelt und untersucht, während 9 als unbehandelte Negativkontrollen dienten.

Die Opferung der Versuchstiere erfolgte unter Vollnarkose, mit einer schnell infundierten Überdosis Kaliumchlorid zu folgenden Zeitpunkten: Je drei Tiere nach 24 Stunden, sieben Tagen und 14 Tagen.

Zu diesen Zeitpunkten lagen dann folgende Transfektionen vor:

Zum Zeitpunkt 24 Std.: 2 Koronararterien transfiziert mit: Liposomen als Vektor  
2 Koronararterien transfiziert mit: Adenovirus als Vektor  
2 Koronararterien transfiziert: adeno-assoziiertem Virus

Zum Zeitpunkt 7 Tage: 2 Koronararterien transfiziert mit Liposomen als Vektor  
2 Koronararterien transfiziert mit Adenovirus als Vektor  
2 Koronararterien transfiziert mit adeno-assoziiertem Virus

Zum Zeitpunkt 14 Tage: 2 Koronararterien transfiziert mit Liposomen als Vektor  
2 Koronararterien transfiziert mit Adenovirus als Vektor  
2 Koronararterien transfiziert mit adeno-assoziiertem Virus

Ein Tier wurde erst nach drei Wochen geopfert, weil nach 14 Tagen keine Genexpression bei adeno-assoziiertem Virus gefunden wurde.

Unmittelbar nach Explantation wurden die behandelten Koronararterien in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bis zur histologischen Auswertung bei -30o C gelagert.

## **2.5 Histologische Auswertung mit Hilfe des X-Gal Assays**

Die Gefäßsegmente wurden nativ gefriereschnitten und auf Objektträger aufgetragen, seriell in 5 µm Abständen von proximal nach distal entlang der physiologischen Flussrichtung.

Der Anteil der transfizierten Zellen wurde durch X-Gal Färbung festgestellt: Nach gleichem Vorgehen wie in der Zellkultur erfolgte die Färbung mit 3 mmol/L  $K_4Fe(CN)_6$ , 3 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$ , 1 mmol/L  $MgCl_2$ , 15 mmol/L NaCl und 1mg/ml X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-4-Galactopyranosid) in 44 mmol/L HEPES. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden konnte die spezifische Blaufärbung makroskopisch erkannt werden, und in mikroskopischer Übersichtsvergrößerung die gefärbten/transfizierten Zellen bestimmt werden.

Die nativen Gefrierschnitte der Koronargefäße wurden wie die Zellkultur fixiert, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Da die genaue Zahl der möglichen Zielzellen im behandelten Koronarsegment unbekannt ist, ist eine Quantifizierung in Prozentangaben wie in der Zellkultur nicht möglich.

Deshalb wurde im Nativgewebe eine semiquantitative Einteilung vorgenommen, mit Bezug auf den Gefaessumfang folgende Einstufungen : geringe, mäßige und hohe Expression

Dies erwies sich als ausreichend genau und gut durchführbar.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Expression des Transgens beta-Galactosidase in der Zellkultur**

Im Vergleich mit der porcinen glatten Muskelzelle (pSMC) wurden humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC), sowie h-ECV-304 untersucht.

Adenovirus auf pSMC (Abb. 1a) erreichte 85-95 % Expression, zum Teil Abloesung des des Zellkultur-monolayer.

Adenovirus auf HUVEC (Abb. 1b) erreichte 85-95% Expression, zum Teil Abloesung des Zellkultur-Monolayers.

Adenovirus auf h-ECV -304 erreichte 85-95% Expression.

Adeno-assoziiertes Virus auf pSMC erreichte 45-55% Expression, MOI von 1000 notwendig.

Adeno-assoziiertes Virus auf HUVEC erreichte 45-55% Expression, MOI von 1000 notwendig.

Adeno-assoziiertes Virus auf h-ECV-304 erreichte keine Expression. Nach Zugabe von Adenovirus Subtyp 5 als Helfervirus 90% Expression. (Abb. 1c)

Liposomaler Gentransfer auf p-SMC 5-10% Expression.

Liposomaler Gentransfer auf HUVEC 5-10% Expression.

Liposomaler Gnetransfer auf h-ECV-304 5-10% Expression (Abb. 1d)

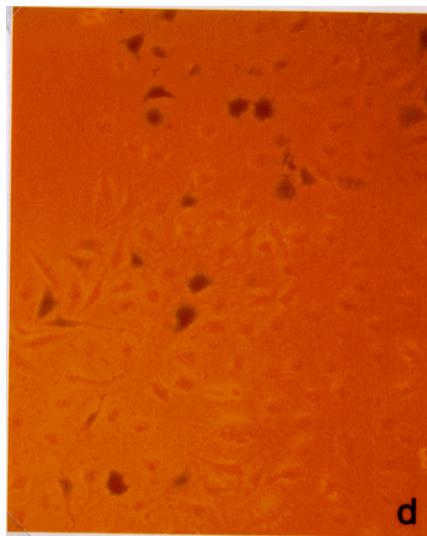
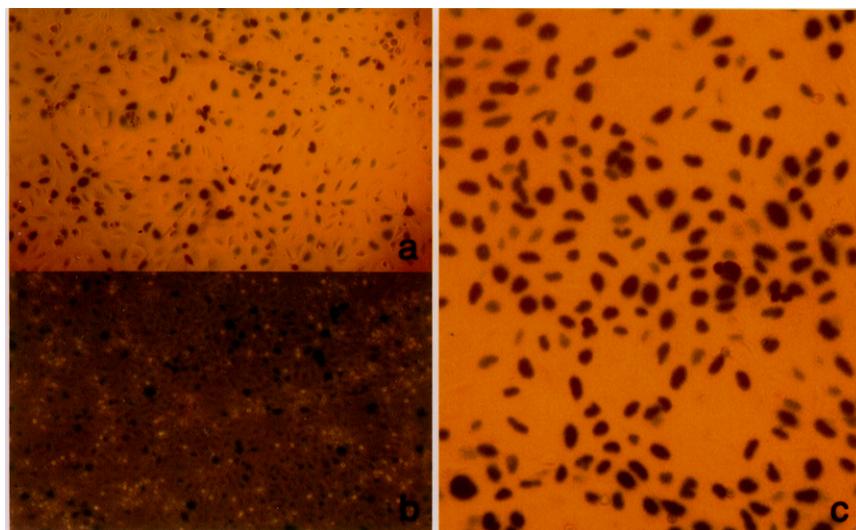
Abbildung 1:  $\beta$ -Galactosidase Färbung nach 48-stündiger Inkubation mit dem Vektor, in h-ECV-304 Zellen

(a) Adenoviraler Gentransfer (AdCMV- $\beta$ -Gal) bei MOI von 100, hohe Transfektionsrate

(b) Beginnender zytopathischer Effekt, über MOI von 100, mit Ablösung von Zellen einhergehend

(c) Adeno-assoziiierter viraler Gentransfer (AAV- $\beta$ -Gal) bei moi von 100, hohe Transduktionsrate, kein zytopathischer Effekt

(d) Liposomaler Gentransfer, geringe Transfektionsrate



### **3.1.1 Expression des Transgens beta-Galactosidase in der Zellkultur mit Liposom als Vektor**

Liposomaler Gentransfer führte zu geringen Transfektionsraten von 5%-10% nach 24-36 Stunden, in allen Zellkulturexperimenten, mit Superfect® (Fa. Qiagen) als Transfektionsreagens. (Abb. 1d)

### **3.1.2 Expression des Transgens beta-Galactosidase in der Zellkultur mit Adenovirus als Vektor**

Adenovirus führte zu hohen Transfektionsraten von 85% - 95% innerhalb von 48 Stunden. Ab einer „multiplicity of infection“ von 50 kam es zu einer Ablösung der Zellen bei HUVEC Zellen und pSMC (Abb. 1a u. 1b).

Die immortalisierten h-ECV-304 zeigten erst ab einer moi von 100 Zeichen der Ablösung.

### **3.1.3 Expression des Transgens beta-Galactosidase in der Zellkultur mit adeno-assoziiertem Virus als Vektor**

Mit adeno-assoziiertem Virus als Vektor wurden mäßige Transfektionsraten von 45%-55% in 48-72 Stunden bei pSMC, und HUVEC-Zellen erreicht (Abb. 4a+b). Es bedurfte allerdings einer sehr hohen „multiplicity of infection“ von etwa 1000, die nur durch eine Verminderung der Zahl der Zellen in Kultur erreichbar war.

Abbildung 4:  $\beta$ -Galactosidase Färbung nach 48 -72 stündiger Inkubation mit adeno-assoziertem Virus als Vektor

(a) Adeno-assoziertes Virus in pSMC

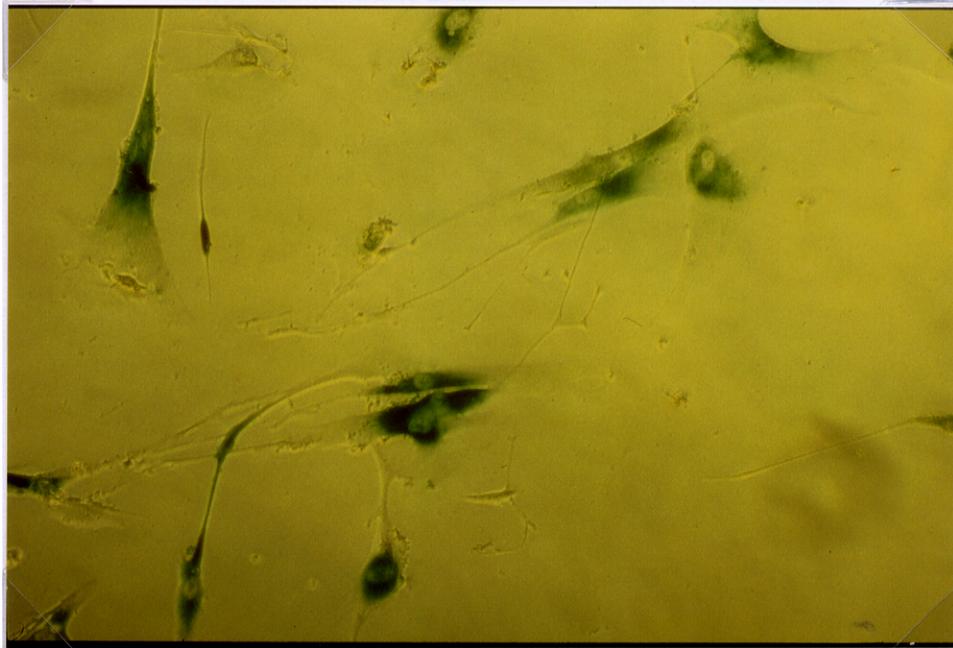
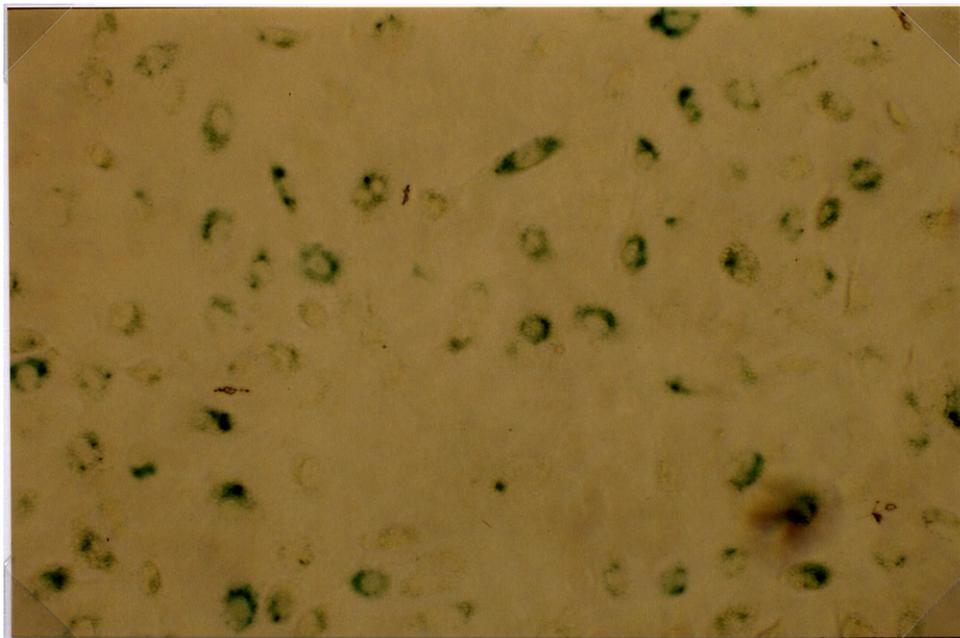


Abb. 4b: Adeno-assoziertes Virus in HUVEC



In der h-ECV-304 Zelllinie blieb eine Expression zunächst aus.

Die Zugabe von Adenovirus Subtyp 5 als Helfervirus in einer niedrigen  $MOI$  von 10, resultierte dann in einer hohen Expressionrate von 85-95% (Abb. 1c).

Mit adeno-assoziiertem Virus zeigten sich in keinem Zelltyp Zeichen der Zytotoxizität.

Der Einsatz von Helfervirus hatte keine Auswirkung auf die Transfektionsrate bei pSMC und HUVEC.

### **3.2 Expression des Transgens beta-Galactosidase in porcinen Koronararterien**

Übersicht Nummer 2: Expression des Transgens beta-Galactosidase in porcinen Koronararterien:

Adenoviraler Vektor in Endothel (Abb 2a): Hohe Expression nach 24 Std., 7 Tagen, 14 Tagen.

Adenoviraler Vektor in Media: keine Expression.

Adenoviraler Vektor in umliegenden Myokard (Abb 3): Expression im angrenzenden Myokard.

Adeno-assoziiertes Virus in Endothel: Keine Expression nach 24 Std., 7 Tagen, und 14 Tagen.

Adeno-assoziiertes Virus in Media: Keine Expression nach 24 Std., 7 und 14 Tagen. Nach 21 Tagen schwache Expression (Abb 2 b).

Adeno-assoziiertes Virus in umliegenden Myokard: Keine Expression.

Liposomaler Komplex in Endothel: Expression nach 24 Std. Keine Expression nach 7 und 14 Tagen mehr.

Liposomaler Komplex in Media: Expression nach 24 Std, gesamter Gefaessumfang (Abb 2c + d). Keine Expression nach 7 und 14 Tagen.

Liposomalre Vektor in umliegenden Myokard: keine Expression.

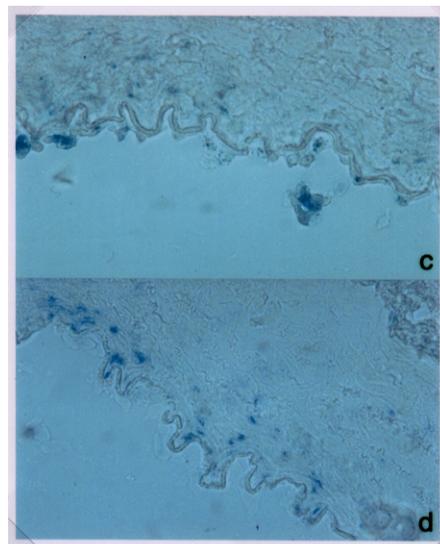
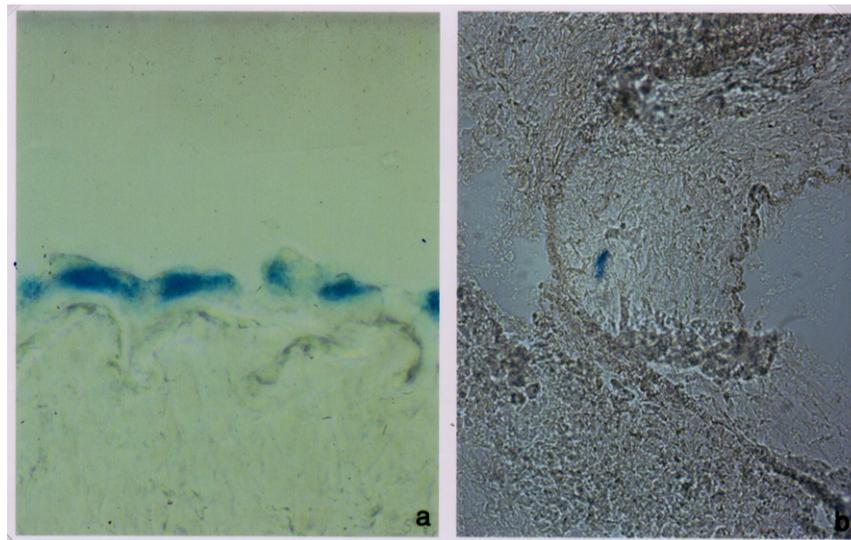
Negativkontrolle: Keinerlei Faerbung zu keinem Zeitpunkt, weder in Endothel, Media noch umliegenden Myokard.

Abbildung 2  $\beta$ -Galactosidase-Färbung nach Gentransfer in porcine Koronararterien

(a) 24 Std. nach adenoviralem Gentransfer (AdVCMV- $\beta$ -Gal)  $10^7$  plaque-forming units (pfu). Gute Transfektionsergebnisse in der Endothelzellschicht.

(b) Drei Wochen nach adeno-assoziiertem viralen Gentransfer (AAV- $\beta$ -Gal)  $10^7$  plaque forming units (pfu). Schwaches Signal in der vaskulären Media

(c, d ) 24 Stunden nach liposomalem Gentransfer. Mäßige Transfektionsrate in der vaskulären Media



### **3.2.1 Expression des Transgens beta-Galactosidase in der porcinen Koronararterie mit Liposomen als Vektor**

Der liposomale Gentransfer führte zu einer geringen Genexpression in der Gefäß-Media sowie in den luminalen Endothelzellen. Diese nach 24 Stunden nachweisbare Expression verschwand innerhalb von Tagen, so dass weder nach sieben, noch nach 14 Tagen eine Färbung nachzuweisen war.  $\beta$ -Gal positive vaskuläre Media war gleichmäßig verteilt über den ganzen Kreisumfang der querschnittenen Gefäßwand nachzuweisen (Abb. 2c,d). In den gefäßumgebenden Strukturen wie Adventitia und Myokard waren keine Signale nachweisbar.

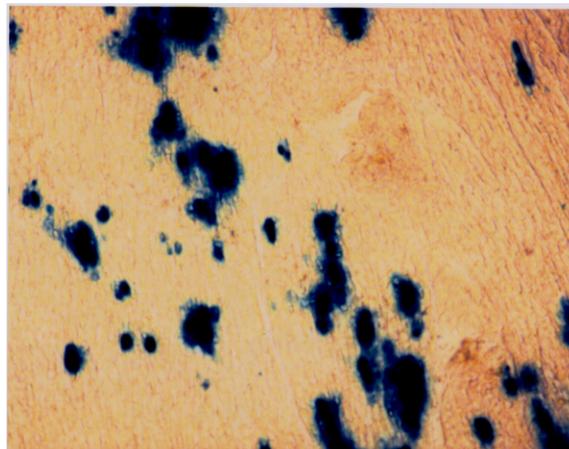
### **3.2.2 Expression des Transgens beta-Galactosidase in der porcinen Koronararterie mit Adenovirus als Vektor**

Die Verwendung von Adenovirus als Vektor führte zu hohen Expressionsraten in der Endothelzellschicht der koronaren Gefäßwand nach 24 Stunden und nach sieben Tagen (Abb. 2a). Nach 14 Tagen war keine Expression mehr nachweisbar. Ferner ließ sich eine deutliche  $\beta$ -Gal Färbung in dem der Koronarie angrenzenden Myokard nachweisen (Abb. 3).

Kein Nachweis erfolgte in der Gefäßmedia.

Abbildung 3  $\beta$ -Galactosidase-Färbung des an die Koronararterie angrenzenden Myokards

Nach adenoviralem Gentransfer (AdCMV- $\beta$ -Gal)



### **3.2.3 Expression des Transgens lacZ in porcinen Koronararterien mit adeno-assoziertem Virus als Vektor**

Mit adeno-assoziertem Virus als Vektor konnte nach Transfektion zunächst keine  $\beta$ -Gal Färbung nachgewiesen werden, weder nach 24 Stunden noch nach 7 oder 14 Tagen. Erst nach einer Verlängerung der Standzeit eines Versuchstieres auf drei Wochen gelang der Nachweis einer niedrigen Expression des Transgens in der vaskulären Media ( Abb. 2b).

### **3.2.4 Negativkontrollen**

Die gleichzeitig an denselben Versuchstieren durchgeführten Negativkontrollen an unbehandelten Koronargefäßen wiesen keine Färbereaktion auf.

## 4 Diskussion

### 4.1 Welches ist das geeignetste Vektorsystem für den koronaren Gentransfer ?

Lokale Gentherapie ist ein attraktiver Ansatz zur Hemmung der neointimalen Proliferation nach Angioplastie und Stentimplantation.

Es sind drei Voraussetzungen, die die optimalen Bedingungen erfüllen müssen um einen Fortschritt in der vaskulären Gentherapie zu erreichen:

1. Die Wahl des richtigen Genproduktes zur Hemmung der Neointimabildung.
2. Die Wahl des optimalen Vektors der ausreichend früh und anhaltend das Transgen exprimiert und
3. Die Wahl der Applikationsmethode in das Zielgewebe.

Mit dem **Plasmid-Liposomen Komplex** ließ sich eine Genexpression bis in tiefe Schichten der Media nachweisen, was im Gegensatz zur Aussage früherer Arbeiten steht, in denen das Transgen auf Endothel und Adventitia beschränkt blieb (31). Die Expression war bereits nach 24 Stunden nachweisbar, und erfasste die gesamte Zirkumferenz des Zielgefäßes. Ein Vorteil gegenüber anderen Vektoren, die eher zu punktueller Expression führten. Allerdings hielt die Expression nicht bis zum 7. oder 14. Tag an.

**Adenovirus** als Vektor hingegen gelangte nicht über die Lamina elastica interna, die eine natürliche Barriere für Partikel von einer Größe über 100 nm hinaus darzustellen scheint (32). Zwar hatten Feldman, Steg et al. 1995 (33) über eine erfolgreiche adenovirale Transfektion der vaskulären Media berichtet, allerdings nach 20 minütiger Inkubation des isolierten Gefäßsegmentes. Das Endothel kann sehr effektiv sowohl mit Liposomen als auch Adenovirus erreicht werden, nahezu alle Endothelzellen waren positiv für X-Gal Nachweis.

Die kleineren **adeno-assoziierten viralen Partikel** sollten theoretisch eher in der Lage sein diese natürliche Barriere zu überwinden, was aber in unseren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden konnte. Es kam nur zu einer geringen

Reporterexpression nach außerprotokollarisch verlängerter Standzeit (21 Tage) des Versuchstieres.

Andere Autoren hatten berichtet, dass Vorverletzung durch Angioplastie vier Tage vor Applikation des adeno-assoziierten Virus die Transduktionsrate verbessert werden konnte (34). Sie spekulierten dass die Zahl der dann proliferierenden Zielzellen erhöht würde. Diese Annahme wird durch Untersuchungsergebnisse an Zellkulturen gestützt. Zwar transduziert adeno-assoziiertes Virus grundsätzlich ruhende und proliferierende Zellen, doch das erreichbare Ausmaß der Genexpression hängt wesentlich von deren Wachstumszustand ab. In der S-Phase des Zellzyklus transduziert adeno-assoziiertes Virus in weit höherem Maße als das bei ruhenden Zellen beschrieben wurde (6, 35).

Im Gegensatz dazu berichteten Maeda et al. 1997 (38), dass selbst nach Denudation des Endothels nur eine sehr geringe Expression in der Adventitia nachzuweisen war, und keine in den vaskulären glatten Muskelzellen. In dieser und anderen Studien wurden isolierte Gefäßabschnitte inkubiert (36-39). Die Resultate solcher Experimente mit 0.5-30 stündigen Inkubationszeiten eines isolierten Gefäßsegments sind nicht auf die Situation in der Koronararterie eines lebenden Säugetiers übertragbar, weil die Kontaktzeit wesentlich kürzer gehalten werden muss, um einen Myokardinfarkt zu vermeiden.

In Kultur primärer Zellen, die ein weit besseres Modell darstellen als immortalisierte Zelllinien, waren die benötigten Virustiter  $10^7$  / ml transduzierender Partikel. Die Virustiter sind so hoch, dass sie vermutlich *in vivo* im Gefäßsegment lokal nicht zu erreicht werden, und die Resultate daher nicht übertragbar sind.

Ein Konzentrationsverlust kommt dadurch zustande, dass bei koronarer Applikation mit dem Ballonkatheter eine große Menge an Substrat nach distal verloren geht, auch wenn mit angiografischer Kontrolle möglichst seitenabgangsfreie Gefäßsegmente gewählt worden waren. Von den applizierten 1.5 ml Suspension ging vermutlich ein wesentlicher Volumenanteil systemisch verloren.

Bei Verwendung von Adenovirus wurden in weiten Bereichen des angrenzenden Myokards Genexpression nachgewiesen, was den Nachweis einer systemischen Exposition darstellt. Warum dies nur mit Adenovirus beobachtet wurde ist nicht zu erklären, da ein Verlust von Vektorsuspension nach distal zwangsläufig auch bei den anderen beiden Vektoren stattfand.

Diese systemische virale Dissemination außerhalb des Zielbereichs gab Anlass zu Sicherheitsbedenken und möglicher Nebenwirkungen adenoviraler Vektoren.

So scheint keines der getesteten Vektorsysteme für den lokalen koronaren Gentransfer geeignet, weil die erzielbare Genexpression zu kurzzeitig, zu spät, oder zu schwach war, um die Initiation der Restenose nach PTCA und Stenting zu antagonisieren.

#### **4.2 Inwieweit sind Resultate aus der Zellkultur übertragbar ?**

Wir untersuchten primäre humane und porcine Zellen in Kultur, die etablierte Modelle zur Untersuchung der Gefäßbiologie sind.

Wir gingen von der Vorstellung aus, dass die in Zellkultur für die jeweiligen Vektorsysteme permissiven Zellen dies im Organismus des Säugetieres ebenfalls sein würden. Nur wenige Untersuchungen haben sich die Frage der Übertragbarkeit von Zellkulturergebnissen auf das Tiermodell zum Gegenstand gemacht. Kass-Eisler, et al. 1993 (12) beschrieben erstaunlicherweise mit Adenovirus bessere Resultate am intakten Rattenherz als in der Myozytenkultur, bei gleichen viralen Konzentrationen. Kirshenbaum, et al. 1993 (13) fanden Transfektionsraten in Zellkultur von 90%-95% unter Verwendung von sehr hohem Virustiter, ein Ergebnis dem unsere Resultate gleichen.

**Liposomaler** Gentransfer führte zu geringen Transfektionsraten in Zellkultur.

Was die Zeitdauer der liposomalen Genexpression betrifft, ließen die Zellkultur-Experimente nur bedingt auf das Tiermodell übertragbare Aussagen zu. Die nur nach 24 Stunden, nicht aber nach 7 oder 14 Tagen nachweisbare liposomale Expression im Tiermodell war nicht vorherzusagen, weil zuvor in der Zellkultur eine durchaus bis zu 7 Tage lange Expression über 2.-5. Passagen beobachtet worden war.

**Adenovirus** erzielte zwar hohe Transfektionsraten in der eingesetzten Konzentrationen bis zu einer multiplicity of infection von 100, führte jedoch in höheren Konzentrationen zu einem deutlichen zytopathischen Effekt, was in einer

Ablösung des Zellrasens und morphologischen Veränderungen deutlich wurde. Der zytopathische Effekt von Adenovirus ist von Zheng, et al. 2000 (40) systematisch untersucht worden, wobei sie eine substantielle Wachstumsverzögerung ab einer MOI von 50 für adenovirale Vektoren belegen konnten die ein cytoplasmatisches Reportergen enthielten.

**Adeno-assoziiertes Virus (AAV)** zeigte in h-ECV-304 Zellen zunächst vielversprechende Transfektionsraten: Mit adeno-assoziiertem Virus transduzierte h-ECV-304 konnten über Wochen propagiert werden. Allerdings ohne eine Zunahme des Anteils positiver Zellen, die aufgrund der Integration in das Wirtsgenom und die folgenden Zellteilungen eigentlich zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise überwiegen extrachromosomale Plasmidformen die sich dann nicht wie chromosomale DNA bei der Zellteilung verdoppeln.

Die Ergebnisse an h-ECV-304 ließen sich in primären Zellkulturen, z.B. glatten Muskelzellen aus Schweineaorten nicht mehr reproduzieren. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Resultaten an humanen Fibroblasten durch Russel et al. 1995 (35) und Halbert et al. 1995 (41) die primäre Epithelzellen mit der Epithelzelllinie IB3, welche durch eine Adenovirus/SV 40 Chimäre immortalisiert worden war, verglichen. Sie fanden eine 60-fach höhere Transfektionsrate in den immortalisierten Zellen gegenüber den primären Zelllinien. Das unterstreicht die Bedeutung der Verwendung von Primärzellkulturen um möglichst valide Resultate zu erzielen, die sich eher auf die Situation am Gesamtorganismus eines Säugetiers extrapolieren lassen.

Hohe Konzentrationen von adeno-assoziiertem Virus sind weiterhin nur mit sehr großem Aufwand zu erreichen. Die nicht ausreichend hohen Konzentrationen für die hohe Anzahl möglicher Zielzellen im Zellverband eines Gefäßsegmentes ist eine mögliche Erklärung dafür, dass sich die guten Ergebnisse der Zellkultur nicht auf das Tiermodell übertragen ließen.

### 4.3 Das Tiermodell

Bei Verwendung von **Liposomen** als Vektor, war 7 Tage nach Intervention keinerlei Genexpression in den porcinen Koronararterien mehr nachweisbar. Diese Resultat bestaetigt den nur transienten Charakter des liposomalen Gentransfers.

Bei **adenoviralem Gentransfer**, der ebenso nicht zu einer stabilen Integration in das Genom der Wirtszelle führt, wurde eine Genexpression bis zu 14 Tagen im Tiermodell beobachtet. Eine Beobachtung, die mit einer Veröffentlichung von Vasall et al. 1999 im Einklang steht (42).

Bei **adeno-assoziiertem Virus (AAV)** scheint die Genexpression sehr spät zu beginnen, weil in den ersten 14 Tagen nach Intervention keine Genexpression nachweisbar war. Erst nach 21 Tagen wurde eine schwache Expression in der Gefäßmedia nachgewiesen, was auf spät beginnende Genexpression hinweisen könnte.

Das steht zwar im Einklang mit den Resultaten von Maeda Y et al. (38), die Gentransfer mit adeno-assoziiertem Virus in vaskuläre Zellkulturmodelle und explantierte Rattenaorten untersucht hatten, und ebenfalls eine langfristige Expression des Transgens bis zu 28 Tagen beschrieben. Allerdings zeigte sich auch in den Arbeiten von Maeda et al (38) bereits nach 3-5 Tagen ein Maximum an Expression in der Zellkultur, ein Ergebnis das sich nicht auf das Tiermodell übertragen ließ.

So bleibt nur die Schlussfolgerung, dass zumindest in diesem Zusammenhang, Zellkultur-experimente einen äußerst geringen Vorhersagewert für die Resultate von Tierexperimenten besitzen.

### 4.4 Einbringung von Genen in Koronargefäße mit dem mikroporösen Ballonkatheter

Die meisten bisher zum vektorvermitteltem Gentransfer am Tiermodell durchgeführten kathetergestuetzten Applikationen fanden an peripheren Gefäßen statt,

deren vorübergehende Okklusion keinen vital gefährdenden ischämischen Gewebeschaden nach sich zog.

Eine komplette Okklusion der Koronararterie durch beispielsweise einen Doppelballonkatheter erreicht durch relativ lange Inkubation zwar signifikanten Gentransfer, verursacht aber Myokardischämie im Versorgungsbereich des Gefäßes (43).

Der Helischkompartimentballon mit zentralem Lumen erlaubt zwar ein Mindestmaß an Perfusion, aber ein großer Anteil des eingesetzten Vektorvolumens geht distal der lokalen Applikationsstelle verloren und wird unerwünschterweise systemisch disseminiert (44).

Die Verwendung des Nadel-Injektions-Katheters durch andere Gruppen geht mit einem zwangsläufigen Penetrationsschaden der Gefäßwand einher, weshalb dieses Modell wohl keine klinische Verwendung finden kann (19).

Ziel muss eine Methode des vaskulären Gentransfers sein, die klinische anwendbar ist.

Der mikroporöse Ballonkatheter ermöglicht schnelle, kurzdauernde Applikationen unter Druck, ohne dass es zu einem nennenswerten Gefäßschaden kommt. Im direkten Vergleich von Kathetersystemen zur lokalen Einbringung von Medikamenten erwies sich der mikroporöse Ballon dem Hydrogel-beschichteten Modell und dem sog. Helischkompartimentballon als überlegen, bezüglich der Vergleichsparameter Volumen und Penetrationstiefe (45).

Allerdings geht auch die Verwendung des mikroporösen Ballonkatheters mit Okklusion der Koronarie einher, so dass die Inkubationszeit des gewählten Koronarsegmentes nur von kurzer Dauer sein kann. Nach etwa zweiminütiger Okklusion zeigten sich ST- Streckenhebungen im EKG-Monitor, als Hinweis auf eine beginnende myokardiale Ischämie. *In vivo* am Koronargefäß ist die Inkubationszeit der Zielzellen also wesentlich kürzer als in Zellkultur oder explantierten peripheren Gefäßen (46).

Die Inkubationszeit der Zielzellen ist wohl die wesentlichste Determinante für das Ausmaß eines effizienten Gentransfers.

Die porcinen Gefaesswandzellen werden mit dem mikroporösen Ballon nicht ausreichend transfiziert, möglicherweise weil der maximale Infusionsdruck von 3 atm nicht ausreichend ist. Die nur kleine Zahl transfizierter Zellen dürfte die neointimale Proliferation kaum wirksam antagonisieren.

Ferner war eine relevante myokardiale Genexpression im Versorgungsbereich der behandelten Koronararterien peripher der Applikationsstelle nachweisbar, die den Anspruch des nur lokalen vaskulaeren Behandlungsansatzes kompromitiert.

Verschiedene Methoden der lokalen Applikation von Genen in die koronare Gefäßwand müssten mit einem zuverlässigen Vektor systematisch verglichen werden. Die vorliegende Arbeit wurde erstellt, um zunächst einmal den geeigneten Vektor zu etablieren. Ein Vergleich der kathetergestützten Applikationsmöglichkeiten würde sich im Anschluss anbieten.

## 5.1 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Bei Applikation mit dem mikroporösen Ballonkatheter ergab der Vergleich dreier Vektoren, dass keine ausreichende Expressionseffizienz erreicht werden konnte.

Es fehlt bisher ein zuverlässiges Vektorsystem für vaskuläre Gentherapie, die eine therapeutische Option zur Verhinderung einer Restenose nach interventioneller Revaskularisierung aufzeigen könnte.

**Liposomaler Gentransfer** führte zu einer transienten, auf wenige Tage begrenzten, mäßigen Genexpression in der Gefäßmedia und, wie Adenovirus, zu einer hohen Expression im Endothel. Die kurze Expressionszeit ist ein bedeutender Nachteil dieses Vektors, so dass eine länger anhaltende Beeinflussung der Neointimaproliferation bei Restenose unwahrscheinlich ist.

Mit **adenoviralem Vektor** wurde eine deutliche, unbeabsichtigte, myokardiale anstatt einer vaskulären Expression des Reportergens lacZ beobachtet, die zu Sicherheitsbedenken bei der Verwendung von Adenovirus Anlaß gibt.

**Adeno-assoziiertes Virus** führte im Verlauf von 14 Tagen zu keiner nachweisbaren Expression, lediglich nach verlängerter Standzeit eines Versuchstiere von 21 Tagen konnte eine schwache Expression in der Gefäßmedia beobachtet werden. Die beobachtete Genexpression ist zu spät und sicher zu schwach um den nach Gefäßverletzung einsetzenden Mechanismus der Neointimaproliferation zu antagonisieren.

Die **Übertragbarkeit** der Zellkulturexperimente mit Primärzellkulturen auf das Tiermodell erwies sich als gering.

Möglicherweise ist die Transfektionsempfänglichkeit der Zielzellen im Gesamtzellverband am lebenden Säugetier vor allem deshalb geringer als am Monolayer der Zellkultur, weil die Expositionszeit der zu transfizierenden vaskulären Zellen im Tiermodell geringer ist. Sie wird durch die maximal tolerierbare Okklussionszeit der Koronarie begrenzt.

Desweiteren geht in erheblichem Maße Vektorsuspension nach distal verloren, so dass die lokale Vektorkonzentration verringert wird. Sehr hohe Vektorkonzentrationen

von  $10^7$  / ml adeno-assoziiertes viraler Partikel über zwei Stunden waren zur Transfektion primärer Zellkulturen notwendig, die im Tiermodell nicht erreicht werden konnten.

Der mikroporöse Ballonkatheter ist ein zur lokalen Einbringung von Substanzen geeignetes Instrument. Allerdings kann der Verlust von eingebrachtem Substrat nach distal dennoch zu einer Belastung des Gesamtorganismus führen.

## Literaturverzeichnis

- [1] Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995;77:445-465.
- [2] Lefkovits J, Topol EJ. Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;40:141-158.
- [3] Gunn J, Holt CM, Francis SE, Shepherd L, Grohmann M, Newman CM et al. The effect of oligonucleotides to c-myc on vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after porcine coronary angioplasty. *Circ Res* 1997;80:520-531.
- [4] Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1995;96:2260-2268.
- [5] Molinier-Frenkel V, Boulaire CL, Gal FA, Gahery-Segard H, Tursz T, Guillet JG et al. Longitudinal follow-up of cellular and humoral immunity induced by recombinant adenovirus-mediated gene therapy in cancer patients. *Hum Gene Ther* 2000;11:1911-1920.
- [6] Samulski RJ, Mitch S, Muzyczka N. Adeno-associated viral vectors. In: Friedman T, editor. *The Development of Human Gene Therapy*. New York: Cold Spring Harbour, 1999: 131-172.
- [7] Ponnazhagan S, Mukherjee P, Yoder MC, Wang XS, Zhou SZ, Kaplan J. Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice. *Gene* 1997;190:203-210
- [8] Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA et al. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14082-14087.
- [9] Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996;70:8098-8108.
- [10] Kaplitt MG, Xiao X, Samulski RJ, Li J, Ojamaa K, Klein IL et al. Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1669-1676.
- [11] Hanazono Y, Brown KE, Handa A, Metzger ME, Heim D, Kurtzman GJ et al. In vivo marking of rhesus monkey lymphocytes by adeno-associated viral vectors: direct comparison with retroviral vectors. *Blood* 1999;94:2263-2270.
- [12] Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, Rivera J, Buttrick PM, Wittenberg BA et al. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11498-11502.
- [13] Kirshenbaum LA, MacLellan WR, Mazur W, French BA, Schneider MD. Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1993;92:381-387.

- [14] Palasis M, Luo Z, Barry JJ, Walsh K. Analysis of adenoviral transport mechanisms in the vessel wall and optimization of gene transfer using local delivery catheters. *Hum Gene Ther* 2000;11:237-246.
- [15] Aoki M, Morishita R, Muraishi A, Moriguchi A, Sugimoto T, Maeda K et al. Efficient in vivo gene transfer into the heart in the rat myocardial infarction model using the HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) liposome method. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:949-959.
- [16] Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1995;96:2260-2268.
- [17] Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ et al. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science* 1994;265:781-784.
- [18] Varenne O, Pislaru S, Gillijns H, Van Pelt N, Gerard RD, Zoldhelyi P et al. Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs. *Circulation* 1998;98:919-926.
- [19] Morishige K, Shimokawa H, Yamawaki T, Miyata K, Eto Y, Kandabashi T et al. Local adenovirus-mediated transfer of C-type natriuretic peptide suppresses vascular remodeling in porcine coronary arteries in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1040-1047.
- [20] Varenne O, Sinnaeve P, Gillijns H, Iung B, Laurysens V, Meurrens K et al. Percutaneous gene therapy using recombinant adenoviruses encoding human herpes simplex virus thymidine kinase, human PAI-1, and human NOS3 in balloon-injured porcine coronary arteries. *Hum Gene Ther* 2000;11:1329-1339.
- [21] French BA, Mazur W, Ali NM, Geske RS, Finnigan JP, Rodgers GP et al. Percutaneous transluminal in vivo gene transfer by recombinant adenovirus in normal porcine coronary arteries, atherosclerotic arteries, and two models of coronary restenosis. *Circulation* 1994;90:2402-2413.
- (22) Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 1998;2745-2760.
- [23] Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987;7:2745-2752.
- [24] Tamayose K, Hirai Y, Shimada T. A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography. *Hum Gene Ther* 1996;7:507-513.
- [25] Ruffing M, Zentgraf H, Kleinschmidt JA. Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol* 1992;66:6922-6930.
- [26] Clark KR, Voulgaropoulou F, Johnson PR. A stable cell line carrying adenovirus-inducible rep and cap genes allows for infectivity titration of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 1996;3:1124-1132.
- [27] Lieber A, Sandig V, Strauss M. A mutant T7 phage promoter is specifically transcribed by T7-RNA polymerase in mammalian cells. *Eur J Biochem* 1993;217:387-394.

- [28] Clowes MM, Lynch CM, Miller AD, Miller DG, Osborne WR, Clowes AW. Long-term biological response of injured rat carotid artery seeded with smooth muscle cells expressing retrovirally introduced human genes. *J Clin Invest* 1994;93:644-651.
- [29] Hoshi H, McKeehan WL. Isolation, growth requirements, cloning, prostacyclin production and life-span of human adult endothelial cells in low serum culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986;22:51-56.
- [30] MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer* 1999;83:555-563.
- [31] Cable DG, O'Brien T, Schaff HV, Pompili VJ. Recombinant endothelial nitric oxide synthase-transduced human saphenous veins: gene therapy to augment nitric oxide production in bypass conduits. *Circulation* 1997;96:II-8.
- [32] Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983;49:327-333.
- [33] Feldman LJ, Steg PG, Zheng LP, Chen D, Kearney M, McGarr SE et al. Low-efficiency of percutaneous adenovirus-mediated arterial gene transfer in the atherosclerotic rabbit. *J Clin Invest* 1995;95:2662-2671.
- (34) Lynch CM, Hara PS, Leonard JC, Williams JK, Dean RH, Geary RL. Adeno-associated virus vectors for vascular gene delivery. *Circ Res* 1997;80:497-505
- [35] Russell DW, Alexander IE, Miller AD. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5719-5723.
- [36] Lee SW, Trapnell BC, Rade JJ, Virmani R, Dichek DA. In vivo adenoviral vector-mediated gene transfer into balloon-injured rat carotid arteries. *Circ Res* 1993;73:797-807.
- [37] Gnatenko D, Arnold TE, Zolotukhin S, Nuovo GJ, Muzyczka N, Bahou WF. Characterization of recombinant adeno-associated virus-2 as a vehicle for gene delivery and expression into vascular cells. *J Investig Med* 1997;45:87-98.
- [38] Maeda Y, Ikeda U, Ogasawara Y, Urabe M, Takizawa T, Saito T et al. Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Cardiovasc Res* 1997;35:514-521.
- [39] Schulick AH, Newman KD, Virmani R, Dichek DA. In vivo gene transfer into injured carotid arteries. Optimization and evaluation of acute toxicity. *Circulation* 1995;91:2407-2414.
- (40) Zheng C, Goldsmith CM, O'Connell BC, Baum BJ. Adenoviral vector cytotoxicity depends in part on the the transgene encoded. *Biochem Res Commun* 2000;274:767-771.
- [41] Halbert CL, Alexander IE, Wolgamot GM, Miller AD. Adeno-associated virus vectors transduce primary cells much less efficiently than immortalized cells. *J Virol* 1995;69:1473-1479.
- [42] Vassalli G, Agah R, Qiao R, Aguilar C, Dichek DA. A mouse model of arterial gene transfer: antigen-specific immunity is a minor determinant of the early loss of adenovirus-mediated transgene expression. *Circ Res* 1999;85:e25-e32.

- (43) Steg PG, Feldman LJ, Scoazec JY, Tahlil O, Barry JJ, Boulechfar S, Rugot T, Isner JM, Perricaudet M. Arterial Gene Transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of adenoviral vector. *Circulation* 1994 ;90 :1648-1656.
- [44] Tahlil O, Brami M, Feldman LJ, Branellec D, Steg PG. The Dispatch catheter as a delivery tool for arterial gene transfer. *Cardiovasc Res* 1997;33:181-187.
- [45] Alfke H, Wagner HJ, Calmer C, Klose KJ. Local intravascular drug delivery: in vitro comparison of three catheter systems. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1998;21:50-56.
- [46] Maillard L, Van Belle E, Smith RC, Le Roux A, Deneffe P, Steg G et al. Percutaneous delivery of the gax gene inhibits vessel stenosis in a rabbit model of balloon angioplasty. *Cardiovasc Res* 1997;35:536-546.
- [47] Effectene Transfection Reagent Handbook 04/98, Fa Quiagen
- [48] Remy, J-S, Sirlin, C., Vierling, P. and Behr, J-P. (1994) *Bioconjugate Chem.* %: 647-654. (FuGene 6 Transfection Reagent®, Fa. Roche; )
- [45] Alfke H, Wagner HJ, Calmer C, Klose KJ. Local intravascular drug delivery: in vitro comparison of three catheter systems. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1998;21:50-56.
- [15] Aoki M, Morishita R, Muraishi A, Moriguchi A, Sugimoto T, Maeda K., Dzau VJ, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T. Efficient in vivo gene transfer into the heart in the rat myocardial infarction model using the HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan) liposome method. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:949-959.
- [31] Cable DG, O'Brien T, Schaff HV, Pompili VJ. Recombinant endothelial nitric oxide synthase-transduced human saphenous veins: gene therapy to augment nitric oxide production in bypass conduits. *Circulation* 1997;96:II-8.
- [4] Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1995;96:2260-2268.
- [16] Chang MW, Barr E, Lu MM, Barton K, Leiden JM. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 1995;96:2260-2268.
- [23] Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987;7:2745-2752.
- [26] Clark KR, Voulgaropoulou F, Johnson PR. A stable cell line carrying adenovirus-inducible rep and cap genes allows for infectivity titration of adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 1996;3:1124-1132.
- [32] Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983;49:327-333
- [28] Clowes MM, Lynch CM, Miller AD, Miller DG, Osborne WR, Clowes AW. Long-term biological response of injured rat carotid artery seeded with smooth muscle cells expressing retrovirally introduced human genes. *J Clin Invest* 1994;93:644-651.
- [47] Effectene Transfection Reagent Handbook 04/98, Fa Quiagen

- [33] Feldman LJ, Steg PG, Zheng LP, Chen D, Kearney M, McGarr SE, Barry JJ, Dedieu JF, Perricaudet M, Isner JM. Low-efficiency of percutaneous adenovirus-mediated arterial gene transfer in the atherosclerotic rabbit. *J Clin Invest* 1995;95:2662-2671.
- [21] French BA, Mazur W, Ali NM, Geske RS, Finnigan JP, Rodgers GP, Roberts A, Raizner AE. Percutaneous transluminal in vivo gene transfer by recombinant adenovirus in normal porcine coronary arteries, atherosclerotic arteries, and two models of coronary restenosis. *Circulation* 1994;90:2402-2413.
- [37] Gnatenko D, Arnold TE, Zolotukhin S, Nuovo GJ, Muzyczka N, Bahou WF. Characterization of recombinant adeno-associated virus-2 as a vehicle for gene delivery and expression into vascular cells. *J Investig Med* 1997;45:87-98.
- (22) Grimm D, Kern A, Rittner K, Kleinschmidt JA. Novel tools for production and purification of recombinant adeno-associated virus vectors. *Hum Gene Ther* 1998;7:2745-2760.
- [3] Gunn J, Holt CM, Francis SE, Shepherd L, Grohmann M, Newman CM, Crossman DC, Cumberland DC. The effect of oligonucleotides to c-myc on vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after porcine coronary angioplasty. *Circ Res* 1997;80:520-531.
- [41] Halbert CL, Alexander IE, Wolgamot GM, Miller AD. Adeno-associated virus vectors transduce primary cells much less efficiently than immortalized cells. *J Virol* 1995;69:1473-1479.
- [11] Hanazono Y, Brown KE, Handa A, Metzger ME, Heim D, Kurtzman GJ, Donahue RE, Dunbar CE. In vivo marking of rhesus monkey lymphocytes by adeno-associated viral vectors: direct comparison with retroviral vectors. *Blood* 1999;94:2263-2270.
- [29] Hoshi H, McKeehan WL. Isolation, growth requirements, cloning, prostacyclin production and life-span of human adult endothelial cells in low serum culture medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986;22:51-56.
- [10] Kaplitt MG, Xiao X, Samulski RJ, Li J, Ojamaa K, Klein IL, Makimura H, Kaplitt MG, Strumpf RK, Diethrich EB. Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector. *Ann Thorac Surg* 1996;62:1669-1676.
- [12] Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, Rivera J, Buttrick PM, Wittenberg BA et al. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11498-11502.
- [8] Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Byrne BJ. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14082-14087.
- [13] Kirshenbaum LA, MacLellan WR, Mazur W, French BA, Schneider MD. Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 1993;92:381-387.
- [36] Lee SW, Trapnell BC, Rade JJ, Virmani R, Dichek DA. In vivo adenoviral vector-mediated gene transfer into balloon-injured rat carotid arteries. *Circ Res* 1993;73:797-807.

- [2] Lefkovits J, Topol EJ. Pharmacological approaches for the prevention of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;40:141-158.
- [27] Lieber A, Sandig V, Strauss M. A mutant T7 phage promoter is specifically transcribed by T7-RNA polymerase in mammalian cells. *Eur J Biochem* 1993;217:387-394.
- [27] Lieber A, Sandig V, Strauss M. A mutant T7 phage promoter is specifically transcribed by T7-RNA polymerase in mammalian cells. *Eur J Biochem* 1993;217:387-394.
- (34) Lynch CM, Hara PS, Leonard JC, Williams JK, Dean RH, Geary RL. Adeno-associated virus vectors for vascular gene delivery. *Circ Res* 1997;80:497-505
- [30] MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H, Drexler HG. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer* 1999;83:555-563.
- [38] Maeda Y, Ikeda U, Ogasawara Y, Urabe M, Takizawa T, Saito T, Colosi P, Kurtzman G, Shimada K, Ozawa K. Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. *Cardiovasc Res* 1997;35:514-521.
- [46] Maillard L, Van Belle E, Smith RC, Le Roux A, Deneffe P, Steg G et al. Percutaneous delivery of the gax gene inhibits vessel stenosis in a rabbit model of balloon angioplasty. *Cardiovasc Res* 1997;35:536-546.
- [5] Molinier-Frenkel V, Boulaire CL, Gal FA, Gahery-Segard H, Tursz T, Guillet JG, Farnace F. Longitudinal follow-up of cellular and humoral immunity induced by recombinant adenovirus-mediated gene therapy in cancer patients. *Hum Gene Ther* 2000;11:1911-1920.
- [19] Morishige K, Shimokawa H, Yamawaki T, Miyata K, Eto Y, Kandabashi T, Yogo K, Higo T, Egashira K, Takeshita A. Local adenovirus-mediated transfer of C-type natriuretic peptide suppresses vascular remodeling in porcine coronary arteries in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:1040-1047.
- [17] Ohno T, Gordon D, San H, Pompili VJ, Imperiale MJ, Nabel GJ, Nabel EG. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science* 1994;265:781-784.
- [14] Palasis M, Luo Z, Barry JJ, Walsh K. Analysis of adenoviral transport mechanisms in the vessel wall and optimization of gene transfer using local delivery catheters. *Hum Gene Ther* 2000;11:237-246.
- (7) Ponnazhagan S, Mukherjee P, Yoder MC, Wang XS, Zhou SZ, Kaplan J. Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice. *Gene* 1997;190:203-210.
- [48] Remy, J-S, Sirlin, C., Vierling, P. and Behr, J-P. (1994) *Bioconjugate Chem.* %: 647-654. (FuGene 6 Transfection Reagent®, Fa. Roche; )
- [25] Ruffing M, Zentgraf H, Kleinschmidt JA. Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol* 1992;66:6922-6930.
- [35] Russell DW, Alexander IE, Miller AD. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:5719-5723.
- [6] Samulski RJ, Mitch S, Muzyczka N. Adeno-associated viral vectors. In: Friedman T, editor. *The Development of Human Gene Therapy*. New York: Cold Spring Harbour, 1999: 131-172.

- [39] Schulick AH, Newman KD, Virmani R, Dichek DA. In vivo gene transfer into injured carotid arteries. Optimization and evaluation of acute toxicity. *Circulation* 1995;91:2407-2414.
- [1] Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995;77:445-465.
- (43) Steg PG, Feldman LJ, Scoazec JY, Tahlil O, Barry JJ, Boulechfar S, Rugot T, Isner JM, Perricaudet M. Arterial Gene Transfer to rabbit endothelial and smooth muscle cells using percutaneous delivery of adenoviral vector. *Circulation* 1994 ;90 :1648-1656
- [44] Tahlil O, Brami M, Feldman LJ, Branellec D, Steg PG. The Dispatch catheter as a delivery tool for arterial gene transfer. *Cardiovasc Res* 1997;33:181-187.
- [24] Tamayose K, Hirai Y, Shimada T. A new strategy for large-scale preparation of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors by using packaging cell lines and sulfonated cellulose column chromatography. *Hum Gene Ther* 1996;7:507-513.
- [18] Varenne O, Pislaru S, Gillijns H, Van Pelt N, Gerard RD, Zoldhelyi P, Van de Werf F, Collen D, Janssens SP. Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs. *Circulation* 1998;98:919-926.
- [18] Varenne O, Pislaru S, Gillijns H, Van Pelt N, Gerard RD, Zoldhelyi P, Bout B, Valerio D, Collen D, Janssens SP, Gerard RD. Local adenovirus-mediated transfer of human endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs. *Circulation* 1998;98:919-926.
- [42] Vassalli G, Agah R, Qiao R, Aguilar C, Dichek DA. A mouse model of arterial gene transfer: antigen-specific immunity is a minor determinant of the early loss of adenovirus-mediated transgene expression. *Circ Res* 1999;85:e25-e32.
- [9] Xiao X, Li J, Samulski RJ. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 1996;70:8098-8108.
- (40) Zheng C, Goldsmith CM, O'Connell BC, Baum BJ. Adenoviral vector cytotoxicity depends in part on the the transgene encoded. *Biochem Res Commun* 2000;274:767-771.